



Gammaherpesviren bei kleinen Wiederkäuern, Zoo- und Wildtieren

CHRISTINE FÖRSTER

INAUGURAL-DISSERTATION

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



edition 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 2011

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 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

Gammaherpesviren bei kleinen Wiederkäuern, Zoo- und Wildtieren

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

eingereicht von

Christine Förster
Tierärztin aus Gießen

Gießen, 2011

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

Prof. Dr. Manfred Reinacher

Tag der Disputation: 01.06.2011

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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 sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Christine Förster

Teile dieser Arbeit wurden als Publikation, Vortrag oder Poster präsentiert:

AVID-Tagung Virologie, Bad Staffelstein, September 2006 (Vortrag)

Christine Förster, Matthias König, Bjoern Jacobsen, Wolfgang Baumgärtner
“Bösartiges Katarrhalfieber bei Ziegen”

Jacobsen, B., Thies, K., von Altrock, A., Förster, C., König, M. and Baumgärtner, W. (2007). Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in three goats. *Vet Microbiol* 124 (3-4), 353-7.

1. Leipziger Labor Diagnostik Symposium, Leipzig, Juni 2007 (Vortrag)

Christine Förster, Matthias König, Jens-Ove Heckel
„Gammaherpesviren bei Zootieren und kleinen Wiederkäuern“

7th Congress of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Leipzig, Mai 2008 (Vortrag)

Christine Förster, Matthias König, Jens-Ove Heckel, Heinz-Jürgen Thiel
“Transmission of Gammaherpesviruses in different species of ruminants”

AVID-Tagung Virologie, Bad Staffelstein, September 2008 (Vortrag)

Christine Förster, Matthias König, Heinz-Jürgen Thiel
Serologischer und molekularbiologischer Nachweis von Gammaherpesviren bei Wiederkäuern

3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium, Greifswald, Mai 2009 (Poster)

Christine Förster, Matthias König, Jens-Ove Heckel, Heinz-Jürgen Thiel
“Transmission of Macaviruses in different species of ruminants”

3rd Symposium of the Belgian Wildlife Disease Society, Brüssel, Belgien, Oktober 2009 (Poster)

Christine Förster, Matthias König, Jens-Ove Heckel, Heinz-Jürgen Thiel
“Transmission of Macaviruses in different species of ruminants”

International conference on diseases of zoo and wild animals, Madrid,
Spanien, Mai 2010

Ijzer J., Kik M.J.L., Förster C.

„Challenges in diagnosing Malignant Catarrhal Fever in Prince Alfred deer
(*Cervus alfredi*) and an American Moose (*Alces alces americanus*)“

„Entdecken heißt sehen, was jeder gesehen hat, und dabei denken, was
niemand gedacht hat.“

Albert von Szent-Györgyi, ungarischer Biochemiker und Nobelpreisträger,
1893 – 1986

Meinen Eltern und Bernd

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	9
Einleitung	12
Literaturübersicht	14
Taxonomie Herpesviren	14
Morphologie, Morphogenese und Genomorganisation	16
Biologische Eigenschaften	20
Bösartiges Katarrhalfieber (BKF).....	20
BKF auslösende Viren	20
Pathogenese und Wirtsspektrum	21
Empfänglichkeit unterschiedlicher Indikatorwirte	21
Klinik des Bösartigen Katarrhalfiebers	23
Mögliche Übertragungswege	27
Übertragung von OvHV-2 und AIHV-1	27
Übertragung von CpHV-2 und OvHV-2 bei Ziegen	28
Differenzialdiagnosen	29
Diagnostik.....	29
ELISA	29
Serumneutralisationstest	30
Virusanzucht und Kultivierung von LGL-Zellen	30
Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
Experimentelle Infektionen	32
Prophylaxe und Therapie	32
Material und Methoden	35
Material	35
Probenmaterial	35
Viren	37
Zellen	38
Medien und Puffer	38
Vorgefertigte Systeme (Kits)	40
Sonstige Chemikalien und Reagenzien	40
Oligonukleotide und Sonden	41
Geräte	44
Verbrauchsmaterialien	45
Methoden	46
Nukleinsäureaufarbeitung aus Probenmaterial	46
Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
Analyse der PCR-Produkte	48
Gelextraktion von DNS-Fragmenten	49
Klonierung und Sequenzierung	49
Phylogenetische Analyse	52
Diskriminierende Echtzeit PCR	53
Anzucht von Ziegen-Lymphozyten	53
Virusanzucht auf verschiedenen Zelllinien	54
Transfektion	55
BKF-AK-ELISA	55
Serumneutralisationstest	56
Ergebnisse	58
Etablierung neuer Testmethoden	58

Inhaltsverzeichnis

Troubleshooting bei der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR.....	60
„PAN-PCR“	61
Analyse von nicht gammaherpesviralen Sequenzen	71
Etablierung einer Echtzeit PCR und deren Anwendung	74
ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Macaviren	82
Serumneutralisationstest.....	85
Prävalenz von OvHV-2 und CpHV-2 bei Schafen und Ziegen.....	89
Bösartiges Katarrhale Fieber bei Hauptwirten	89
Ziegen mit mutmaßlicher BKF-Erkrankung	89
BKF durch CpHV-2.....	91
BKF durch CpHV-2 bei Wildtieren	91
BKF durch CpHV-2 bei zwei Wildrindern	95
Klonierung und Sequenzierung mit phylogenetischer Analyse.....	95
Widersprüchliche Ergebnisse bei Proben von einem Gayal (Wasserbüffel, Bos gaurus frontalis)	104
Virusanzucht auf verschiedenen Zelllinien	106
Anzucht von Ziegen-Lymphozyten	107
Transfektion.....	111
Diskussion	114
Haupt- und Indikatorwirte	116
Diagnostik.....	117
Genomnachweis	117
Antikörpernachweis	122
Vermehrung von CpHV-2	123
Zusammenfassung	124
Summary	126
Literaturverzeichnis.....	128
Danksagung.....	144
Anhang	146

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acc-Nr.	<i>Accession-number</i> , GenBank-Zugangsnummer
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AIHV	Alcelaphines Herpesvirus
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
BEL	<i>bovine embryonic lung</i> (bovine embryonale Lungenzellen)
BKF	bösartiges Katarrhalfieber
Blastn	<i>basic local alignment search tool nucleotides</i>
BoHV	Bovines Herpesvirus
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BTV	Virus der Blauzungenerkrankung (<i>bluetongue virus</i>)
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe Virus
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD (4, 8, 2, 25)	Oberflächenantigene von Lymphozyten (<i>cluster of differentiation</i>)
CHV	Canines Herpesvirus
CpHV	Caprines Herpesvirus
CvHV	Cervine Herpesvirus
Ct	<i>Cycle threshold</i> – Schwellenwert-Zyklus
dd H ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHDV	Virus der epizootischen hämorrhagischen Erkrankung der Hirsche (<i>epizootic hemorrhagic disease virus</i>)
EHV	Equines Herpesvirus
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELP	Erythrozyten Lysis Puffer
et al.	und andere
Europ.	Europäisch
Fa.	Firma
FeHV	Felines Herpesvirus
FKS	Fetales Kälberserum
FMDV	Virus der Maul- und Klauenseuche (<i>foot and mouth disease virus</i>)
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GHV	Gammaherpesvirus

Abkürzungsverzeichnis

H	Stunde
HHV	Humanes Herpesvirus
HiHV	Hippotragines Herpesvirus
HUSAR	<i>Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources</i>
IBR	Infektiöse bovine Rhinotracheitis
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IL-2	Interleukin 2
IU	Internationale Einheiten (<i>international units</i>)
IZW	Institut für Zoo- und Wildtierforschung
JLU	Justus-Liebig-Universität
kBp	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
LANA	<i>latency-associated nuclear antigen</i>
Lat.	Lateinisch
LB-Medium	Luria-Bertani Broth-Medium
LGL	<i>large granular lymphocytes</i>
Ln.	Lymphknoten
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	<i>Mucosal disease</i>
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Min.	Minuten
n.b.	nicht bekannt
n.d.	nicht durchgeführt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND ₅₀	neutralisierende Dosis bei 50 % der Replikate
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NTC	<i>non template control</i> - Negativkontrolle Echtzeit PCR
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
OvHV	Ovines Herpesvirus
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PHYLIP	<i>phylogeny inference package</i>
PK	Positivkontrolle
rRhV	ruminantes Rhadinovirus
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunden
SNT	Serumneutralisationstest
sog.	sogenannt
SuHV	Suid Herpesvirus
T	Thymin
TCID ₅₀	<i>Tissue culture infectious dose</i> bei 50 % der Replikate
UV-Licht	ultraviolettes Licht

Abkürzungsverzeichnis

V	Volt
VGv	Virusgebrauchsverdünnung
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WTD-MCFV	<i>White-tailed-deer-malignant-catarrhal-fever-virus</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
zpE	zytopathischer Effekt

Einleitung

Bösartiges Katarrhalfieber (BKF) ist eine in Deutschland meldepflichtige Krankheit von Paarhufern, die in 90-100 % der Fälle zum Tod führt. Dennoch wurde dieser Erkrankung bisher relativ wenig Beachtung geschenkt, da die wirtschaftliche Bedeutung eher gering eingeschätzt wird. In der Regel sind nach langer Inkubationszeit nur Einzeltiere betroffen. Zurzeit bestehen weder kausale Therapieansätze noch Impfmöglichkeiten. Im Rahmen der Verbreitung der Blauzungenkrankheit (*Bluetongue-disease*) seit 2006 in Deutschland ist das Interesse an der BKF-Diagnostik stark gestiegen, da BKF als wichtige Differenzialdiagnose angesehen werden muss. Sowohl betroffene Tierarten als auch klinische Symptome und pathologisch-anatomische Merkmale überschneiden sich. Seit 1993 wird in vielen Instituten zur BKF-Diagnostik eine Polymerasekettenreaktion („*polymerase chain reaction*“ - PCR) für den Nachweis von Ovinem Herpesvirus 2 (OvHV-2), einem Gammaherpesvirus (GHV), (Baxter et al., 1993) eingesetzt, welches in Europa als Verursacher von BKF bei Rindern nachgewiesen wurde. Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass neben den bekannten Erregern OvHV-2 und Alcelaphines Herpesvirus 1 (AIHV-1) mindestens fünf weitere Vertreter der Macaviren (*malignant catarrhal fever viruses*) bei verschiedenen Wirtsspezies eine BKF-Erkrankung auslösen können. In diesem Zusammenhang sind weitere Haupt- und Indikatorwirte erkannt worden, zum Beispiel Ziegen, Schweine und diverse Wildwiederkäuer.

Ungezielte, nicht für ein bestimmtes Virus spezifische Diagnostikmethoden wie Virusanzucht in der Zellkultur und Elektronenmikroskopie führen bei BKF meist nicht zum Erfolg; eine „Zufallsdiagnose“ ist also eher unwahrscheinlich. Gezielte Methoden, zum Beispiel die PCR, werden in der Regel nur bei konkretem Verdacht auf BKF eingesetzt. Mit den etablierten Testverfahren konnte jedoch in der Regel nur OvHV-2 oder AIHV-1 nachgewiesen werden, andere Erreger blieben unberücksichtigt. Bereits 1996 wurde eine PAN-Herpesvirus-PCR (PAN: „alle“) zur Detektion aller Herpesviren von vanDevanter et al. (1996) beschrieben, die zumindest die Option der Detektion weiterer Gammaherpesviren einschließt. Die Nutzung dieser Technik beschränkte sich aber weitgehend auf wissenschaftliche Arbeiten.

Das 2001 parallel in den USA und in Deutschland entdeckte Caprine Herpesvirus 2 (CpHV-2) scheint in Ziegenbeständen weit verbreitet zu sein, bleibt im Rahmen der BKF-Diagnostik allerdings in der Regel unberücksichtigt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen der Routinediagnostik bessere Möglichkeiten zum Nachweis

Einleitung

unterschiedlicher BKF-Erreger zu schaffen. Dies sollte vor allem durch die Entwicklung von PCR-Verfahren geschehen, die möglichst alle als BKF-Erreger in Frage kommenden GHV erfassen.

Weiterhin sollte der Verbreitung von BKF-Erregern bei anderen Wirtsspezies Beachtung geschenkt werden. Bislang werden vor allem Proben von Rindern und Schafen auf OvHV-2 getestet. Verluste durch BKF treten aber auch im Wildtier- und Zootierbereich auf. Durch den Kontakt unterschiedlicher Tierarten können Infektionen mit verschiedenen Macaviruspezies stattfinden. Da es sich hier nicht immer um den typischen Symptomkomplex in Verbindung mit dem erwarteten Schaf-Rind-Kontakt handelt, stellen solche Krankheitsfälle eine besondere diagnostische Herausforderung dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proben von Wildwiederkäuern, Ziegen und Schafen zunächst mittels verschiedener diagnostischer Methoden getestet und anschließend Nukleinsäuresequenzierungen und phylogenetische Analysen durchgeführt.

Literaturübersicht

Taxonomie Herpesviren

Der Begriff Herpesvirus stammt ursprünglich aus dem Griechischen („ερπειν“ – herpein) und bedeutet kriechen, schleichen. Dies bezog sich vor allem auf die Art und Entstehung der häufig bei Infektionen des Menschen auftretenden Hautveränderungen (M. Schwyzer, 2005).

Herpesviren kommen bei vielen Tierarten und beim Mensch vor. Bei der Analyse der Genomsequenzen dieser Viren werden in weiten Bereichen Übereinstimmungen, also Homologien, beobachtet. Dennoch findet man Unterschiede, anhand derer sich Herpesviren bei Säugetieren, Fischen, Amphibien und Mollusken voneinander abgrenzen lassen. Dies hat das „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV) kürzlich dazu bewogen, der Familie *Herpesviridae* eine eigene Ordnung zuzuweisen, die *Herpesvirales*. Dieser Ordnung gehören außer den *Herpesviridae* noch die *Alloherpesviridae* (Herpesviren bei Fischen und Amphibien) und die *Malacoherpesviridae* (Ostreid Herpesvirus 1 bei Austern) an (Davison et al., 2009).

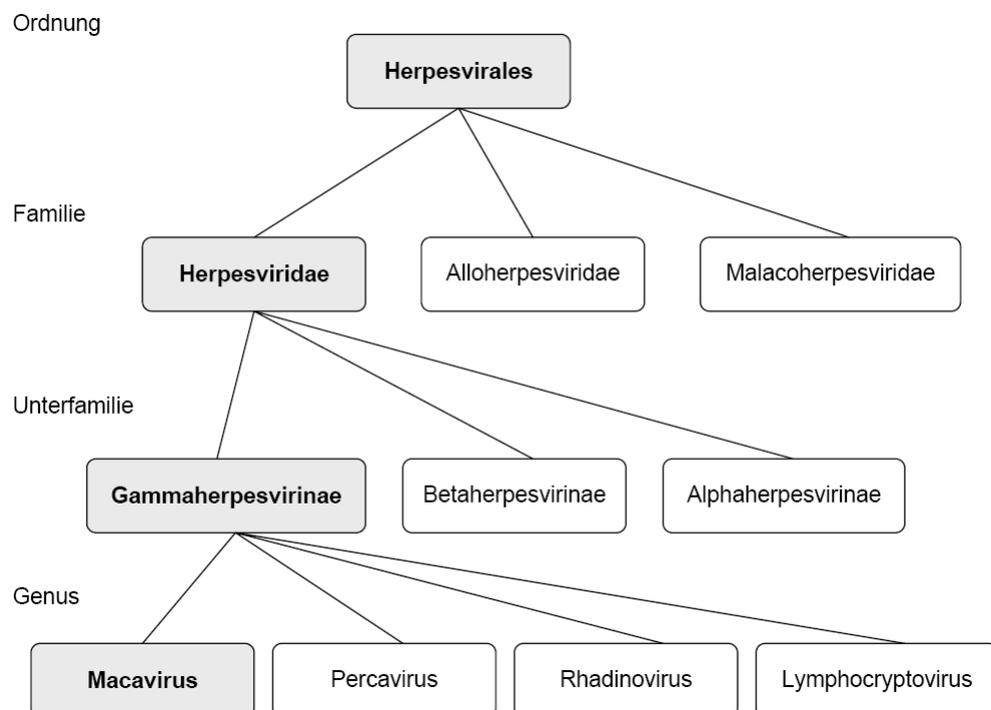


Abbildung 1: Taxonomie der Herpesviren

Die Familie *Herpesviridae* umfasst drei Unterfamilien: *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae*. Die Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* wird seit 2009 allerdings in vier Genera unterteilt: *Lymphocryptovirus*, *Percavirus*, *Rhadinovirus*

Literaturübersicht

und *Macavirus*. Die in dieser Arbeit behandelten Auslöser für Bösartiges Katarrhalische Fieber wurden früher dem Genus *Rhadinovirus* zugeordnet, kürzlich jedoch einem eigenen Genus *Macavirus* [Malignant Catarrhal Fever Viruses]. Da das Alcelaphine Herpesvirus 1 (AIHV-1) das am besten charakterisierte Macavirus mit einer seit 1997 bekannten kompletten Genomsequenz darstellt, gilt es als Typspezies für dieses Genus. Weiterhin werden das Ovine Herpesvirus 2 (OvHV-2), das Caprine Herpesvirus 2 (CpHV-2), das Bovine Herpesvirus 6 (BoHV-6, vorher Bovine Lymphotropic Herpesvirus), das Alcelaphine Herpesvirus 2 (AIHV-2, Isolate aus Proben von Kuh- und Leierantilopen (*Alcelaphus buselaphus*, *Damaliscus lunatus*)), das Hippotragine Herpesvirus 1 (HiHV-1, Isolate aus Proben von Pferdeantilopen (*Hippotragus equinus*)) und Suid Herpesviren 3,4 und 5 (SuHV-3,4,5, vorher Porcine Lymphotropic Herpesviruses 1,2,3) dieser Gruppe zugeordnet. Von weiteren Gammaherpesviren sind bislang nur sehr kurze Sequenzen des Genoms bekannt, so dass noch keine offizielle Zuordnung möglich ist. Hierzu gehört unter anderem das White-tailed-deer-malignant-catharral-fever-virus (WTD-MCFV) und nicht klassifizierte Gammaherpesviren bei Impalas (*Aepyceros melampus*), Springböcken (*Antidorcas marsupialis*) (Pagamjav et al., 2005), Oryx-Antilopen (*Oryx gazella*), Moschusochsen (*Ovibos moschatus*), Mährenspringern (*Ammotragus lervia*) und nubischen Steinböcken (*Capra nubiana*) (Li et al., 2003 und 2005). Das Gammaherpesvirus, welches bei Oryx-Antilopen gefunden wurde, ist dem HiHV-1 der Pferdeantilopen sehr ähnlich.

Früher war die Namensgebung durch Entdecker, erkrankte Spezies oder klinische Symptomatik geprägt. Heute wird im Rahmen der ständig wachsenden Zahl der Herpesviren bei Säugetieren von der ICTV folgende Nomenklatur empfohlen: Wissenschaftliche Bezeichnung der Familie bzw. Unterfamilie des Primärwirtes und die Endsilbe „id“ oder „ne“. Werden hier mehrere Vertreter gefunden, können in der Reihenfolge der Erstisolierung arabische Ziffern angehängt werden (z.B. Suid Herpesvirus 3).

Zur phylogenetischen Einordnung werden in der Regel konservierte Teilsequenzen des Genoms analysiert, z.B. DNS-Polymerase, Glykoprotein B und Terminase.

Während beim Menschen bisher acht Herpesviren gefunden wurden, sind bei Säugetieren mehr als 100 Herpesviren bekannt. Es wird angenommen, dass sich Herpesviren parallel zu ihren Primärwirten im Laufe der Evolution entwickelt haben; dies wird im Allgemeinen als Cospeziation und Coevolution bezeichnet. Vergleiche phylogenetischer Stammbäume auf der Basis unterschiedlicher Herpesvirusgene und z.B. des mitochondrialen Cytochrom B-Gens bei den Primärwirten ergeben einen sehr ähnlichen Aufbau und vergleichbare Anordnung der einzelnen Äste und

Literaturübersicht

Astlängen (Li et al., 2005). Gammaherpesviren lassen sich nicht optimal in dieses Schema einordnen. Es spiegelt sich aber auch hier ein grundsätzlich ähnlicher Aufbau der phylogenetischen Stammbäume von Primärwirt und Virus wider (Mc Geoch et al., 2000 und 2005, Ehlers et al., 2008, Li et al., 2005).

Morphologie, Morphogenese und Genomorganisation

Herpesvirionen haben einen Durchmesser von 120 bis 250 nm und ein sphärisches bis pleomorphes Erscheinungsbild.

Abbildung 2 zeigt ein elektronenmikroskopisches Bild von Herpesviren im Negativkontrastverfahren. Virionen bestehen aus einer Lipidhülle, einer proteinhaltigen Zwischenschicht, dem Tegument, und dem Innenkörper (Core).

Das Nukleokapsid zeigt eine ikosaedrale Symmetrie (T=16). Es weist einen Durchmesser von etwa 100 nm auf und besteht aus 162 Kapsomeren (ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>). In die Lipidhülle sind Glykoproteine und nichtglykosylierte Polypeptide eingebettet, die kleine Oberflächenprojektionen bilden und sowohl bei Adsorption als auch Penetration in die Wirtszelle eine wichtige Rolle spielen. Die Glykoproteine der Hülle reagieren mit zellulären Rezeptoren und vermitteln die Fusion zwischen der viralen Membran und der zellulären Membran, was als Hauptweg des Herpesviruseintritts in die Zelle gilt; es wurde allerdings auch Rezeptor-vermittelte Endozytose als Eintrittsweg für Herpesviren beschrieben. Nach der Expression viraler Gene und der DNS-Synthese gelangen Kapsidproteine vom Zytoplasma zum Kern, wo ein autokatalytisches *self-assembly* zu präformierten Kapsiden stattfindet. Durch Knospung (*budding*) an der inneren Kernmembran, das sog. *primary envelopment*, erhalten die Kapside ihre erste Hülle, welche sie bei der Fusion mit der äußeren Kernmembran (*deenvelopment*) wieder verlieren. Die ins Zytoplasma entlassenen Kapside erhalten mehr als 15 Tegumentproteine und durch das folgende *budding* in Golgi-Vesikel mehr als 10 Hüllproteine. Letztendlich verschmilzt die Vesikelmembran mit der Plasmamembran der Zelle, und es werden reife Herpesvirionen entlassen (Mettenleiter, 2006).

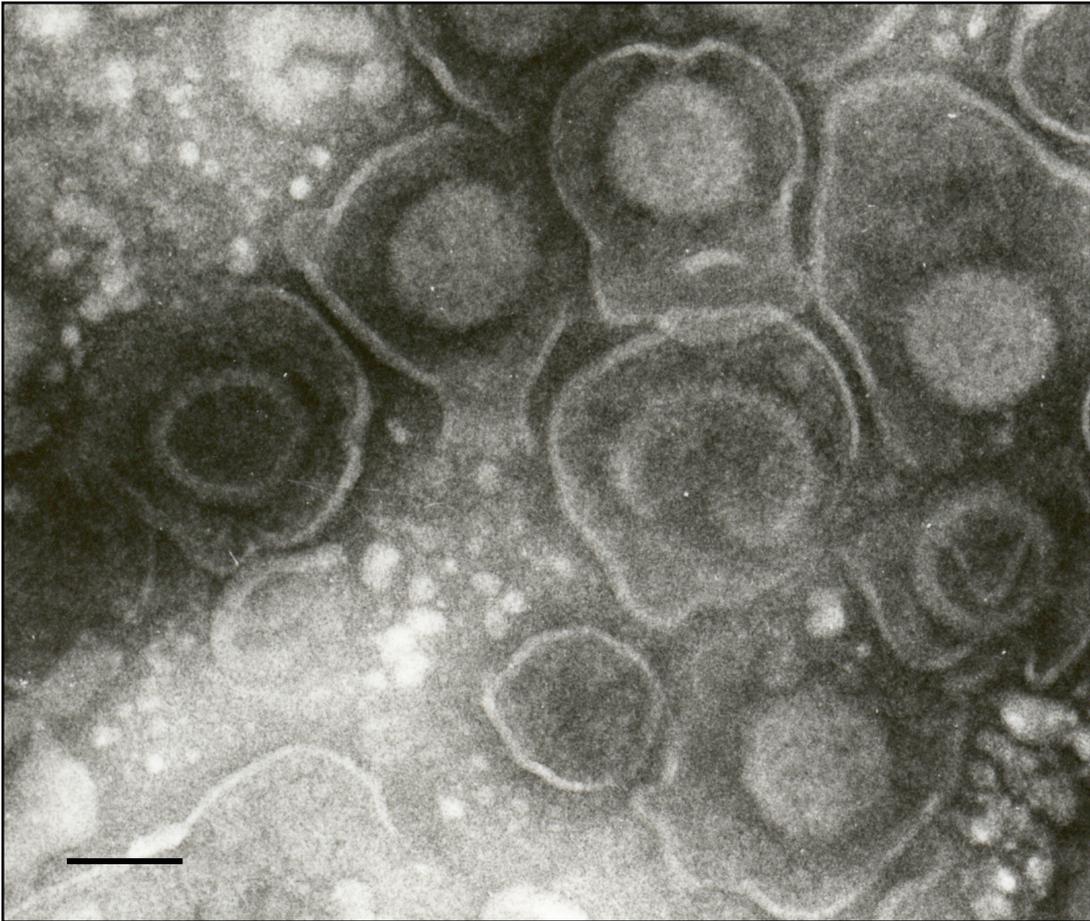


Abbildung 2 Elektronenmikroskopisches Bild von Herpesviren (Negativkontrastverfahren) (mit freundlicher Genehmigung von Matthias König, Giessen) (Größenmarker entspricht 100 nm)

Das Core beherbergt das Genom, bestehend aus einer nicht segmentierten linearen doppelsträngigen DNS mit 120.000 – 300.000 Basenpaaren. Das Genom weist einen Guanosin-Cytosin-Gehalt von etwa 56% auf und kodiert für 70-200 Proteine. An den 5'- und 3'-Enden befinden sich repetitive Sequenzen. Bisher sind komplette Genomsequenzen von mindestens 51 Herpesviren (NCBI, Januar 2010) bekannt.

Vertreter der Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* lassen sich häufig nur sehr schlecht oder gar nicht in Zellkultur vermehren. Dies hat zur Folge, dass von relativ wenigen Gammaherpesviren vollständige Sequenzen zur Verfügung stehen. Während für das AIHV-1 die komplette Genomsequenz bereits 1997 veröffentlicht wurde (Ensser et al., 1997), ist die Sequenz für das nicht in Zellkultur kultivierbare OvHV-2 erst seit wenigen Jahren bekannt (Hart et al., 2007). Die etwa 130.000 Basenpaare (Bp) der beiden Genome werden von terminalen Wiederholungssequenzen flankiert (AIHV-1 etwa 1100 Bp, OvHV-2 etwa 4200 Bp). Beim Vergleich der beiden Genome findet man 71 offene Leseraster bei AIHV-1 und 73 bei OvHV-2 (siehe Abbildung 3). Dabei gibt es Sequenzabschnitte, die Homologien mit Sequenzen anderer Gammaherpesviren aufweisen und

Literaturübersicht

dementsprechend benannt wurden. Die innerhalb der Gammaherpesviren konservierten Gene sind nach dem Schema für Herpesvirus saimiri benannt (Hart et al., 2007). Andere Gene sind spezifisch für AIHV-1 bzw. OvHV-2, hierzu gehören „Ov2/A2, Ov3/A3, Ov5/A5, Ov6/A6, Ov7/A7, Ov8/A8, Ov9/A9 und Ov10/A10“. Außerdem existieren zwei Bereiche, die nur bei AIHV-1 („A1 und A4“) und vier, die nur bei OvHV-2 („Ov2.5, Ov3.5, Ov4.5 und Ov8.5“) zu finden sind (siehe Abbildung 3).

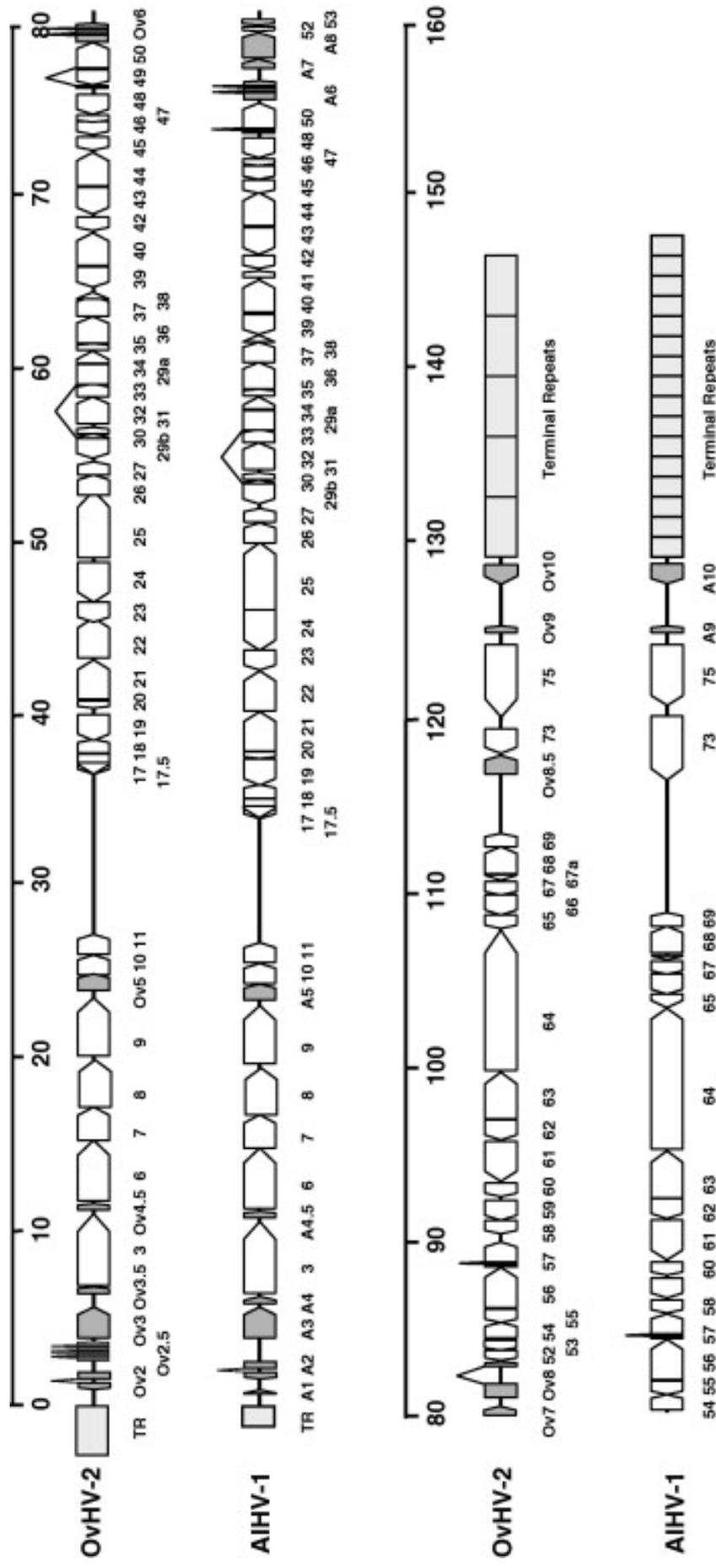


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genome von OvHV-2 und AIHV-1. Die Position und Orientierung verschiedener Gene wurden mit Hilfe von Pfeilen dargestellt. Konservierte Gene innerhalb der Gammaherpesviren sind weiß abgebildet und entsprechend dem Schema für Herpesvirus saimiri benannt. OvHV-2- und AIHV-1-spezifische Gene erscheinen als graue Pfeile und tragen das Präfix A für AIHV-1 und Ov für OvHV-2. Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch Russel et al., 2009

Biologische Eigenschaften

Herpesviren werden meistens mit einem einzigen Hauptwirt in Verbindung gebracht. Dabei kann eine Wirtstierspezies jedoch Hauptwirt verschiedener Herpesviren sein. Bei einer Übertragung vom Hauptwirt auf eine andere Spezies kommt es häufig zum Auftreten schwerwiegender Symptome.

Ein weiteres typisches Merkmal der Herpesviren ist die Ausbildung einer latenten Infektion. Hierbei verbleibt das Virusgenom in der Wirtszelle, aber es werden keine Viruspartikel gebildet. Durch bestimmte Einflussfaktoren wie Stress, Medikamente oder Schwächung des Immunsystems, kann das Virus reaktiviert werden. Es kommt zur Virusausscheidung oder sogar zur Erkrankung. Je nach Herpesvirus-Unterfamilie gibt es bevorzugte Zielzellen für eine Latenz, wie z.B. Nervenzellen (Alphaherpesviren), sekretorische Drüsen und lymphoretikuläres Gewebe (Betaherpesviren) oder mononukleäre Blutzellen (Gammaherpesviren) (Schwyzer, 2005).

Da es sich bei Herpesviren um behüllte Viren handelt, sind sie relativ empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen, weisen also eine niedrige Tenazität auf. Zellosoziierte Viren verlieren ihre Infektiosität nach etwa 72 h, während zellfreies Virus in feuchter Umgebung bis zu 13 Tage überleben kann (OIE, *Technical disease cards*). Durch UV-Licht findet eine schnelle Inaktivierung statt.

Wie bereits erwähnt lassen sich Gammaherpesviren im allgemeinen schlecht oder gar nicht in Zellkulturen vermehren. Dies trifft auch auf die Gruppe der Macaviren zu. Nur für alcelaphines und hippotragines Herpesvirus ist die Anzucht in Zellkultur bisher gelungen. Für OvHV-2 besteht bis dato nur die Möglichkeit der Vermehrung von infizierten Lymphozyten (siehe S.29 Virusanzucht und Kultivierung von LGL-Zellen).

Bösartiges Katarrhalfieber (BKF)

Die Erkrankung BKF ist bereits seit dem Altertum bekannt. Allerdings brachte erst 1930 die Idee von Götze und Liess, wonach gesunde Schafe als Überträger fungieren, hinsichtlich der Ätiologie einen Erkenntnisgewinn (Rosenberger, 1994).

BKF auslösende Viren

BKF wird durch Vertreter des Genus *Macavirus* der Unterfamilie *Gammaherpesvirinae* hervorgerufen. In der Regel wird die Erkrankung beim Rind mit dem AIHV-1 (Afrika, Zoos und Wildparks, „Gnu-assoziiertes BKF“) bzw. dem

Literaturübersicht

OvHV-2 (weltweit verbreitet, „Schaf-assoziiertes BKF“) als Erreger in Verbindung gebracht. In den letzten Jahren wurden allerdings weitere Erreger und Indikatorwirte gefunden (siehe Abbildung 4), was die bisher durchgeführten Erregernachweise und die untersuchten Tierarten in ein völlig neues Licht rückt. Mindestens fünf weitere Macaviren wurden inzwischen im Zusammenhang mit einer BKF-Erkrankung detektiert: BKF bei Hirschen durch das CpHV-2 (Chmielewicz et al., 2001; Li et al., 2001), BKF bei Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) durch das WTD-MCFV (Li et al., 2000, Kleiboeker et al., 2002), experimentell ausgelöstes BKF beim Kaninchen durch HiHV-1 (Isolat aus der Zellkultur einer Pferdeantilope (*Hippotragus equinus*)), BKF bei einer Bongo-Antilope (*Tragelaphus eurycerus*) durch ein Steinbock-assoziiertes Virus (Okeson et al., 2007) und BKF bei Berberhirschen (*Cervus elaphus barbarus*) durch ein AIHV-2-ähnliches Virus (Isolat aus Proben von Kuhantilopen (*Alcelaphus bucelaphus jacksoni*)) (Klieforth et al., 2002).

Pathogenese und Wirtsspektrum

An BKF erkranken unterschiedliche Spezies von Artiodactyla, insbesondere Wiederkäuer. Die Gnu-assoziierte (AIHV-1) und die Schaf-assoziierte (OvHV-2) Form von BKF werden anhand ihres Hauptwirtes unterschieden. Der Hauptwirt erkrankt nicht, ist jedoch Überträger und lebenslang infiziert.

Im Gegensatz zum Schaf scheidet das Gnu vorwiegend zur Kalbungszeit Virus aus. Nach transplazentarer Übertragung erfolgt die Ausscheidung über Nasensekret und Tränenflüssigkeit des Kalbes direkt nach der Geburt (Plowright, 1965). Dadurch ist in Afrika eine gewisse Saisonalität der Erkrankung zu beobachten. Hingegen ist bei neugeborenen Schaflämmern bis zu einem Alter von drei bis sechs Monaten im Allgemeinen kein Virusgenom nachweisbar. Beim Schaf sind kurze Ausscheidungsperioden (ca. 24 h) bekannt, die ohne Assoziation zur Trächtigkeit auftreten. Hier wird vorwiegend von einer Ausscheidung infektiöser Viruspartikel über Nasensekret ausgegangen. Die Hauptansteckungsquelle sind sechs bis neun Monate alte infizierte Lämmer (Li et al., 2004). In der Regel findet eine horizontale Übertragung statt; vertikale Übertragung wird jedoch nicht ausgeschlossen. So beschreibt Rossiter 1981 das Vorkommen von Antikörpern gegen BKF-Viren im Serum gnotobiotischer und spezifisch-pathogen-freier Lämmer.

Empfänglichkeit unterschiedlicher Indikatorwirte

Empfänglich für die Erkrankung sind vor allem Rind, Bison, Banteng (südostasiatisches Wildrind), Hirsch und Elch, aber auch bei Ziegen und Schweinen wurden typische Symptome im Zusammenhang mit dem Nachweis von OvHV-2

Literaturübersicht

gefunden. Erste Beschreibungen von BKF bei Schweinen stammen aus Norwegen (Løken T. et al., 1998); inzwischen wurde die Erkrankung auch bei Schweinen in Deutschland, Italien, Schweiz, Schweden und Nordamerika dokumentiert (Albini et al., 2003, Alcaraz et al., 2009). Die erste Veröffentlichung über BKF bei Ziegen in Deutschland stammt aus dem Jahr 2007 (Jacobsen et al., 2007).

Costa et al. (2009) beschrieben erstmals eine BKF-ähnliche Erkrankung bei einem Fohlen, also einem „Nicht-Paarhufer“, in Brasilien. Das Fohlen zeigte zentralnervöse Störungen, schwere Dyspnoe und verstarb innerhalb eines Tages. Histopathologisch wurden BKF-charakteristische Veränderungen gefunden und OvHV-2 DNS konnte sowohl aus Organen des Fohlens als auch aus Leukozyten von drei adulten Pferden und acht Ziegen dieses Bestands nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Laser Mikrodissektion wurden Zellen aus dem Bereich der lymphohistiozytären Vaskulitis der Leberarteriolen des Fohlens gewonnen. Nach Nukleinsäurepräparation konnte in diesen Zellen OvHV-2 DNS nachgewiesen werden, wodurch eine Kolo-kalisation von viraler DNS und histologischen Veränderungen bestätigt werden konnte.

Nach experimenteller Infektion von z.B. Kaninchen und Hamstern mit AIHV-1 oder OvHV-2 kommt es zu ähnlichen Erkrankungserscheinungen wie beim Rind mit rascher Todesfolge.

Die Empfänglichkeit der sogenannten Indikatorwirte ist sehr unterschiedlich. So gilt z.B. das Bison als etwa 1000fach empfänglicher als das Rind. Li et al. (2006) berichten über einen Ausbruch auf einer Bison-Farm in Idaho, bei der eine Schafherde 19 Tage in der Nachbarschaft von 1610 Bisons und 4000 Rindern weidete. Es starben 825 Bisons an BKF, während nur ein einziges Rind erkrankte. Da bei ca. 20 % der Bisons zwar Antikörper gegen Macaviren, aber keine Erkrankungen vorliegen, scheinen bei dieser Tierart Differenzen in der Empfänglichkeit zu bestehen. Die erwähnte hohe Empfänglichkeit bei einer Gruppe von Bisons läßt sich möglicherweise auf Haplotypen im MHC II a-Bereich zurückführen (Traul et al., 2005 und 2007). Durch einen Polymorphismus in diesem Bereich kann es zu Unterschieden in der Antigenpräsentation und damit zur variierenden Empfänglichkeit gegenüber BKF kommen. Traul et al. untersuchten mehrere MHC II a-Allele bei Bisons einer Herde zum Zeitpunkt eines BKF-Ausbruchs. Die Sequenzen wurden mit bereits bekannten Sequenzen von Rindern verglichen. Die Autoren konnten anhand des DRB3 Allels 6 Kategorien von Genotypen aufstellen und in resistent (R), empfänglich (E) und neutral (N) einteilen: N/N, N/R, N/E, R/E, R/R und E/E.

Literaturübersicht

Einige Hirscharten wie Weißwedelhirsch und Davidshirsch gelten ebenfalls als extrem empfänglich, während andere wie das Damwild als relativ resistent angesehen werden.

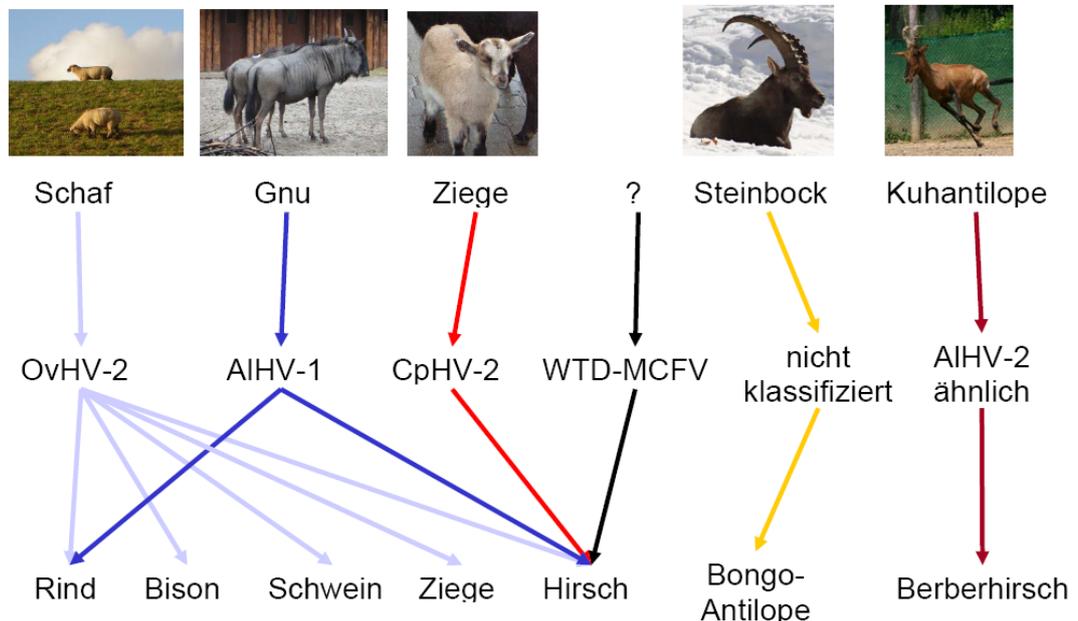


Abbildung 4: Darstellung der Hauptwirte (obere Reihe) und Indikatorwirte (untere Reihe) mit den jeweiligen Macaviren (mittlere Reihe). Foto Kuhantilope mit freundlicher Genehmigung von Kim van de Put, Burgers Zoo, Arnhem, Niederlande

Bei Rindern tritt BKF meist als Einzeltierkrankung mit einer Inkubationszeit von 10 Tagen bis zu neun Monaten auf. Im Allgemeinen wird vorberichtlich ein direkter Kontakt zu Hauptwirten beschrieben. Dies ist allerdings nicht immer der Fall. So soll ein indirekter „Kontakt“ über Entfernungen bis 5 km zwischen Haupt- und Indikatorwirt bei einer Bisonherde in Nordamerika zu Erkrankungen geführt haben (Li et al., 2008). Indikatorwirte werden als sogenannte Endwirte (*dead end host*) angesehen, die das Virus nicht auf andere Tiere übertragen. Nur bei Hirschen ist bisher eine mögliche Übertragung untereinander beschrieben worden (Russel et al., 2009). Für das WTD-MCFV konnte bisher noch kein Hauptwirt als Überträger gefunden werden (s. Abbildung 4). Es wird diskutiert, dass in Endwirten Virus zwar zellassoziiert repliziert, aber kein zellfreies Virus gebildet wird (Russell et al., 2009).

Klinik des Bösartigen Katarrhalfiebers

Klinisch werden vier Formen unterschieden:

- Perakute Form mit charakteristischem raschem Tod
- Kopf-Augen-Form
- Hautform
- Darmform



Abbildung 5: Augenveränderungen bei einer Kuh mit BKF

Außerdem sind auch subklinische Infektionen möglich. Es konnte beispielsweise OvHV-2-spezifische Nukleinsäure in Proben gesunder Rinder aus Beständen mit BKF-Fällen nachgewiesen werden (Strohbücker, 2005).

Bei Rindern tritt am häufigsten die Kopf-Augen-Form auf. Hierbei kommt es zu hohem Fieber, Inappetenz, nicht eitriger Meningoenzephalitis, Entzündungen der oberen Atemwege mit Nasen- und Augenausfluß sowie bilateraler Hornhauttrübung (siehe Abbildung 5), die sich zentripetal ausbreitet. Alle Schleimhäute des Kopfbereichs können betroffen und die Entzündungen mit Erosionen und Nekrosen vergesellschaftet sein. Oberflächliche Lymphknoten sind in der Regel stark vergrößert. Im Rahmen einer Meningoenzephalitis können zentralnervöse Symptome wie Inkoordination, Tremor, Nystagmus, Ataxie, Konvulsion und Hyperästhesie auftreten.

Hautveränderungen zeigen sich in Form von Erythemen, Hyperkeratosen, Alopezie und Ulzerationen, besonders an Perineum, Euter und Zitzen, teilweise auch bis zum Ausschuheln des Klauenhorns. Durchfall und hämorrhagische Gastroenteritis mit Hämaturie werden ebenfalls beobachtet.

Die Symptome können je nach Tierart, Erreger und Krankheitsdauer variieren. So werden z.B. bei Hirschen nach Infektion durch CpHV-2 häufig chronische

Literaturübersicht

Hautveränderungen und Gewichtsverlust beobachtet (Crawford et al., 2002; Keel et al., 2003, Li et al., 2003), während beim Bison oft ein akuter Verlauf mit purulenter Rhinitis und Keratokonjunktivitis ohne Lymphknotenvergrößerung auftritt.

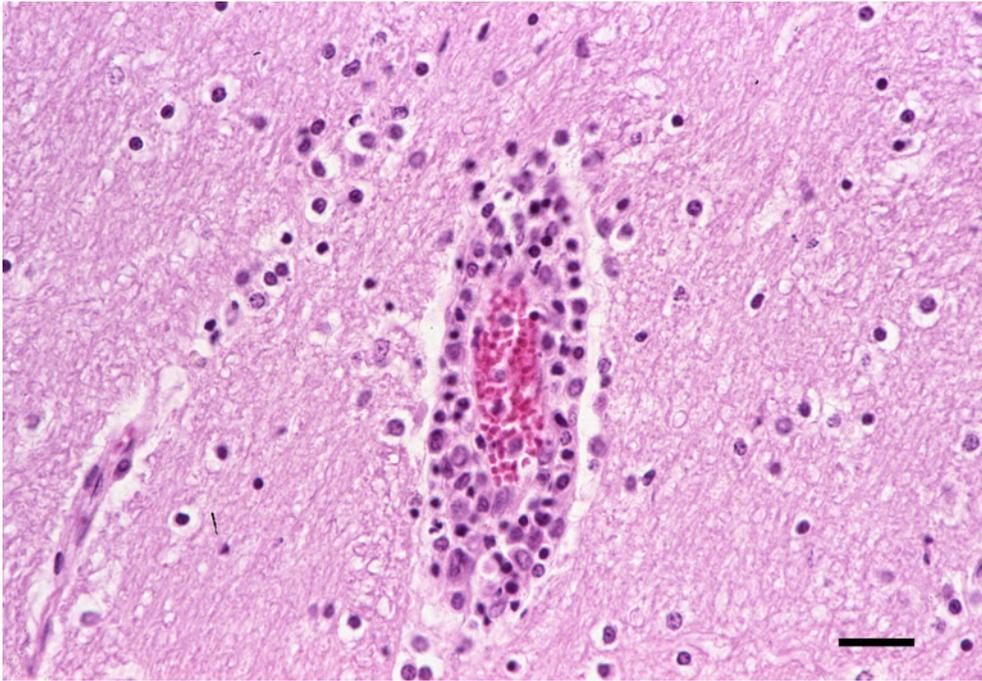
Bislang wurden nur bei Rindern Spontanheilungen und chronische Infektionen nachgewiesen. Das Auftreten serologisch positiver Tiere ohne klinische Vorgeschichte deutet darauf hin, dass auch unter Wildwiederkäuern subklinische Infektionen vorkommen (Zarnke et al., 2002).

Pathologisch-anatomisch lassen sich petechiale Hämorrhagien an Schleimhäuten des Respirations-, Gastrointestinaltrakts und der Harnblase nachweisen, sowie weiße Foci auf der Nierenoberfläche (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: weiße Foci auf der Oberfläche einer Niere. Ziege mit BKF-Symptomatik und OvHV-2-Nachweis; Foto mit freundlicher Genehmigung der Veterinär-Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Typisch für BKF sind außerdem lymphohistiozytäre Infiltrate in mehreren Organen, häufig im Zusammenhang mit Vaskulitis (siehe Abbildung 7) und nekrotischen Läsionen.



**Abbildung 7: Vaskulitis im ZNS einer Ziege mit BKF-Symptomatik, Vergrößerung 40x;
Foto mit freundlicher Genehmigung der Veterinär-Pathologie der Tierärztlichen
Hochschule Hannover**

Mögliche Übertragungswege

Übertragung von OvHV-2 und AIHV-1

Als natürlicher Übertragungsweg wurde beim Schaf vorwiegend die Ausscheidung von OvHV-2 über Nasensekret angesehen. Weiterhin wurde die Möglichkeit einer Übertragung mittels Sperma beschrieben (Hüssy et al., 2002). Für AIHV-1 wurde eine transplazentare Übertragung beim Gnu beschrieben (Nishimori et al., 2004). Den Hauptübertragungsweg stellen Augen- und Nasensekret dar.

Beim Schaf wurden mittels Echtzeit PCR quantitative Messungen von OvHV-2-DNS aus dem Nasensekret durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass Schafe sehr kurze Virus-Ausscheidungsperioden (ca. 24 h) zeigen, und dass die höchsten Konzentrationen viraler DNS bei Lämmern im Alter von sechs bis neun Monaten vorliegen (Kim et al., 2003, Li et al., 2004). Mittels eines Nuklease-Resistenztests konnte das Vorhandensein intakter Virionen im Nasensekret von Schafen gezeigt werden (Kim et al., 2003); hierbei werden ungeschützte Nukleinsäureketten enzymatisch abgebaut. Wird nach DNase-Behandlung virale Nukleinsäure per PCR nachgewiesen, liegt der Rückschluß nahe, dass diese Nukleinsäure vorher in intakten Viruspartikeln verpackt war. Bei Schafen, die sich nicht in einer „Ausscheidungsphase“ befanden, führte die PCR nach einer DNase-Behandlung zu einem negativen Ergebnis. Hingegen führten Nasensekretproben von Tieren in der „Ausscheidungsphase“ auch nach DNase-Behandlung zu positiven Ergebnissen. Aufgrund der kurzen Phase der Virusausscheidung wird vermutet, dass das Virus im Respirationstrakt nur einen einzigen Vermehrungszyklus durchläuft und dann den Zelltyp von epithelialen Zellen zu Lymphozyten wechselt (Li et al., 2006). Die Lunge ist der Ort der primären Manifestation einer OvHV-2-Infektion (Li et al., 2008). Der erste Wechsel der Zielzellen findet demnach vom Lungengewebe zu Lymphozyten statt; letztere sind auch Zielzellen für die Latenz-Phase. Von den Lymphozyten findet ein erneuter Wechsel zu Turbinalzellen als dem Ort der Ausscheidung statt. Erstaunlicherweise besteht keine Korrelation zwischen der Menge der OvHV-2-DNS im Nasensekret und in peripheren Leukozyten (Li et al., 2004). Bei einer Neuinfektion kann zunächst OvHV-2-DNS im Blut nachgewiesen werden, erst kurze Zeit später im Nasensekret (Li et al., 2001).

Inzwischen wurde dieses Wissen genutzt, um erfolgreich Infektionsversuche mit dem Nasensekret von „Ausscheider-Schafen“ bei verschiedenen Tierarten, unter anderem Bison (O'Toole et al., 2007), Schaf (Taus et al., 2005), Rind (Taus et al., 2006) und Kaninchen (Gailbreath et al., 2008), durchzuführen. Dabei wurde eine

Literaturübersicht

gewisse Korrelation zwischen der Infektionsdosis und klinischen Symptomen festgestellt. So konnte bei Bisons beobachtet werden, dass sich nach Infektion mit niedriger Dosis zwar Antikörper entwickelten, aber keine Erkrankung. Die unterschiedliche Empfänglichkeit der einzelnen Tierarten kam darin zum Ausdruck, dass unterschiedliche Virusmengen zum Auslösen einer Erkrankung benötigt wurden, beispielsweise beim Bison 1000fach weniger als beim Rind. Mit entsprechend hoher Dosis ließ sich auch bei Schafen mit OvHV-2 eine BKF-artige Erkrankung auslösen, obwohl diese Tiere üblicherweise als Hauptwirt gelten und nicht erkranken (Li et al, 2005). BKF-ähnliche Veränderungen bei Schafen wurden schon 1994 in Kanada beschrieben (C.A. Rae, 1994). Da keine spezifische PCR durchgeführt wurde, blieb die Ursache in diesem Fall ungeklärt.

Übertragung von CpHV-2 und OvHV-2 bei Ziegen

In einer Studie von Li et al. (2005) wird die Separation von 14 Ziegenlämmern aus einem CpHV-2-positiven/OvHV-2-negativen Bestand beschrieben. Präkolostral konnten bei den Lämmern weder Antikörper (AK) gegen Macaviren noch virale DNS nachgewiesen werden. Nach Kolostrumaufnahme waren 100 % AK-positiv. Die Abtrennung erfolgte im Alter von einer Woche, und EDTA-Blut-Proben der 14 Tiere blieben über ein Jahr in der PCR negativ. Danach wurden fünf Ziegen aus der Gruppe in die CpHV-2-positive Herde zurückverbracht; sie infizierten sich dort im Lauf von 14 Wochen. Fünf weitere Tiere wurden mit einer OvHV-2-positiven Schafherde zusammen gehalten, und die restlichen vier dienten als Negativkontrolle. Bis zur ersten Detektion von OvHV-2 DNS bei den Ziegen dauerte es zwischen sieben und zehn Monate. Interessanterweise gelang es nicht, durch das Verbringen Macavirus-freier Ziegen in einen OvHV-2-positiven Ziegenbestand eine Übertragung von OvHV-2 von Ziege zu Ziege nachzuweisen. Eine Ausscheidung infektiöser Viruspartikel scheint nur beim jeweiligen Hauptwirt vorzuliegen. Eine Virusübertragung von OvHV-2 von Ziegen auf andere Tiere ist demnach ebenfalls eher unwahrscheinlich. Alternativ könnte auch die Dosis der ausgeschiedenen Viruspartikel nicht ausreichend für eine Neuinfektion gewesen sein. Die Anzahl der Versuchstiere in dieser Studie war für eine statistisch signifikante Aussage nicht ausreichend, daher bleiben für Ziegen als Hauptwirte weitere Fragen offen.

Ob eine Übertragung von OvHV-2 oder CpHV-2 durch Ziegen auf Rinder möglich ist, ist weiterhin ungeklärt.

Literaturübersicht

Differenzialdiagnosen

Als Differenzialdiagnose zu BKF sind u.a. folgende Erkrankungen von Bedeutung: Infektiöse bovine Rhinotracheitis (IBR), Epizootische Hämorrhagische Erkrankung der Hirsche (EHD), Blauzungenkrankheit (BT), Maul- und Klauenseuche (MKS), Bovine Virus Diarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD), Vesikuläre Stomatitis (VS), Rinderpest, EHV-9-Infektion, Vergiftungen mit Mykotoxinen oder ätzenden Substanzen.

Diagnostik

Für die Diagnostik lassen sich generell der indirekte Infektionsnachweis über Antikörper (AK) und der direkte Infektionsnachweis mittels Detektion von Virus einschließlich viraler Nukleinsäure unterscheiden.

Der Nachweis von Antikörpern über Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Serumneutralisationstest (SNT) oder indirekte Immunfluoreszenz beruht in allen verfügbaren Nachweissystemen auf der Kreuzreaktion zwischen AIHV-1 und anderen Macaviren (Li et al., 1994). Zu beachten ist, dass bei perakuten Verläufen mitunter keine Antikörper gebildet werden.

Eine Virusanzucht in Zelllinien ist bisher nur beim Alcelaphinen und Hippotraginen Herpesvirus gelungen. Für das OvHV-2 ist eine Kultivierung von LGL-Zellen (large granular lymphocytes) aus gerinnungsgehemmten Blut- oder Organproben an BKF erkrankter Tiere möglich (Schock et al., 1998).

Die ursprünglich als Mittel der Wahl geltende pathologisch-histologische Diagnose ist inzwischen um die PCR erweitert worden. In der Literatur sind vor allem Methoden zum Nachweis von OvHV-2 und AIHV-1 beschrieben, aber auch eine PAN-Herpesvirus-PCR und diverse Primerkombinationen für andere Macaviren. Außerdem besteht die Möglichkeit der Echtzeit PCR für OvHV-2 (Hüssy et al., 2001) und diverse Macaviren (Cunha et al., 2009).

Proben von latent infizierten Tieren können unter Umständen in der PCR, seltener im serologischen Nachweis, negativ ausfallen.

ELISA

Ein kommerziell verfügbarer Test basiert auf einem monoklonalen Antikörper (mAK) gegen ein konserviertes Macavirus-Epitop (15A-Epitop) (Li et al., 2001). Mit Hilfe des mAKs konnte ein Kompetitions-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen alle potentiellen BKF-auslösenden Viren entwickelt und im Laufe der Jahre optimiert

Literaturübersicht

werden (Li et al., 1994, 1995, 1996, 2001). Müller-Doblies et al. (1998) beschreiben eine Validierung des ELISA-Tests gegenüber Histopathologie und PCR an Proben von gesunden und an BKF erkrankten Kühen. Dabei wurde eine Sensitivität von 56-87 % und eine Spezifität von 91-100 % ermittelt. Der kompetitive AK-ELISA ist inzwischen auch in Deutschland erhältlich (VMRD, Pullman, USA über Labordiagnostik Leipzig). Als Antigen zur Beschichtung der Platten wird das Minnesota-Isolat verwendet. Ursprünglich als Isolat aus einem Rind mit Schaf-assoziiertem BKF beschrieben, stellte sich das Virus später als AIHV-1 heraus. Es wird vermutet, dass es sich dabei um eine Laborkontamination mit AIHV-1 in Proben von Schaf-assoziierten BKF-Ausbrüchen handelte (Li et al., 2001). Im Immunoblot lassen sich mit dem 15A-mAK Anteile eines viralen Glykoproteinkomplexes mit Molekulargewichten von 115, 110, 105, 78 und 45 kDa nachweisen.

Außerdem wurde ein direkter ELISA beschrieben, bei dem der AIHV-1-Stamm WC11 zur Beschichtung der ELISA-Platten genutzt wird (Fraser et al., 2006).

Serumneutralisationstest

Für den Serumneutralisationstest (SNT) werden Verdünnungsreihen von Seren angelegt und mit einer bestimmten Dosis AIHV-1 für zwei Stunden bei 37°C inkubiert (Flach et al., 2002). Als Testzellen werden bovine Turbinalzellen hinzugegeben. Das Ergebnis wird durch Beurteilung des zytopathischen Effekts (zpE) nach etwa sieben Tagen ermittelt.

Virusanzucht und Kultivierung von LGL-Zellen

Die Kultivierung von AIHV-1 erfolgt in der Regel auf bovinen Turbinalzellen, ist aber auf unterschiedlichen Zelllinien möglich. 1964 wurde der verbreitete Stamm WC11 aus Leukozyten eines Gnukalbs durch Anzucht auf bovinen Nierenzellen gewonnen (Kalunda et al., 1981). Nach Passagen in bovinen Nieren- und Thyreoidzellen wurde das Isolat für serologische Untersuchungsmethoden eingesetzt.

Eine Attenuierung des Virus erfolgte bereits nach wenigen Passagen in Zellkultur. Es kam zu Veränderungen des viralen Genoms, die ein gewisses Muster erkennen lassen (Wright et al., 2003). In der Regel erfolgt eine Translokation bestimmter Regionen aus der Genommitte zu Arealen in der Nachbarschaft oder innerhalb der terminalen Wiederholungssequenzen.

Nach längerer Passagezeit (30 Passagen) in Zellkultur kommt es zu einer ausgeprägten Attenuierung; die zellfreie Virusfraktion könnte für eine Vakzineproduktion genutzt werden.

Literaturübersicht

Large granular lymphocyte (LGL)-Kulturen werden aus Geweben (Lymphknoten) oder gerinnungsgehemmten Blutproben BKF-erkrankter Tiere, z.B. aus Rinder-, Hirsch- oder Kaninchenzellen gewonnen. Die Zellen lassen sich über eine Dichtegradientenzentrifugation (z.B. LymphoprepTM, Axis Shield, Oslo) abtrennen. Die LGL-Zellen zeigen zytotoxische Aktivität und haben den Phänotyp von T-Zellen oder natürlichen Killerzellen. Sie exprimieren teilweise CD8, CD4, CD2 und CD25 und wachsen nur in Anwesenheit von Interleukin 2 (Schock et al., 1998, Burrells and Reid, 1991). Es bestehen Unterschiede in der viralen DNS und Genexpression zwischen OvHV-2-infizierten Zellen von Rind, Schaf und Kaninchen (Rosbottom et al., 2002; Thonur et al., 2006). Während in den Rinder- und Schafzellen das Virusgenom vor allem zirkulär vorliegt, was für eine latente Infektion spricht, wird bei Kaninchen-LGLs ein großer Anteil linearer Virus-DNS gefunden, was auf eine produktive Infektion hinweist. Aus einer Kaninchen-LGL-Präparation gelang auch der bisher einzige elektronenmikroskopische Nachweis von OvHV-2-Kapsiden (Rosbottom et al., 2002). In LGL-Zellen vom Schaf werden Latenz-assoziierte Genomabschnitte wie z.B. ORF73 („*latency-associated nuclear antigen*“ (LANA)) transkribiert. Im Gegensatz dazu lässt sich in Rinder- und Kaninchen-LGL-Zellen auch Genexpression eines produktiven Zyklus nachweisen, wie z.B. ORF9 und ORF50 („*productive cycle regulator*“). Dennoch wurden keine Virionen in diesen Zellen detektiert (Thonur et al., 2006). Es wird vermutet, dass die virale Replikation nur unvollständig abläuft.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die erste beschriebene PCR für den Nachweis von OvHV-2 stammt von Baxter et al. (1993). Bei der „semi-nested“ PCR handelt es sich um den Nachweis eines 423 Bp und eines 238 Bp großen Fragments aus dem für das Tegument kodierenden Genombereich. In der Folge wurden zahlreiche weitere Methoden in der Literatur beschrieben, die vor allem Primer aus den für die Polymerase und das Glykoprotein B kodierenden Bereichen verwenden (Hüssy et al., 2001; Müller-Doblies et al., 1998; Keel et al. 2003; Kim et al., 2003; Lahijani et al. 1994; Coulter and Reid, 2002; Tham et al. 1994; vanDevanter et al., 1996; Li et al., 2001). Bei der PCR von vanDevanter et al. handelt es sich um eine Kombination aus fünf degenerierten Primern, die als sogenannte PAN-Herpes-PCR für alle Herpesviren eingesetzt werden kann.

Experimentelle Infektionen

Experimentelle Infektionen von Hamstern und Kaninchen werden schon seit längerer Zeit durchgeführt und zwar durch intravenöse Inokulation von Blut oder Gewebe BKF-erkrankter Tiere, z.B. von Rindern oder Hirschen mit OvHV-2, oder Zellkulturmaterial (AIHV-1) (Burrells und Reid, 1991; Buxton und Reid, 1980; Reid et al., 1986; Anderson et al., 2007). Auch intracraniale, intraperitoneale und intrakardiale Injektionen wurden beschrieben (Kalunda et al., 1981; Jacoby et al., 1988). Kaninchen werden häufig als Versuchsmodell für BKF genutzt, da sie ähnliche klinische Symptome und pathologisch-histologische Veränderungen entwickeln wie empfängliche Wiederkäuer, allerdings mit einer deutlich kürzeren Inkubationszeit von 16-38 Tagen. Gailbreath et al. (2008) beschreiben eine intranasale Inokulation bei Kaninchen mit OvHV-2-haltigem Nasensekret (Kopienzahl von 10^7 /Tier), gewonnen von Ausscheider-Schafen.

Die Übertragung von Nasensekret Virus ausscheidender Schafe kommt dem vermuteten natürlichen Übertragungsweg von OvHV-2 am nächsten. Bei Verwendung einer hohen Dosis (Kopienzahl von 3×10^9 /Tier) lässt sich sogar eine Erkrankung bei Schafen hervorrufen (Li et al., 2005). Die experimentelle Infektion von Kälbern mittels OvHV-2-haltigem Nasensekret war ineffizient (Taus et al., 2006). So erkrankte nur eins von acht Kälbern, welches mit der höchsten Kopienzahl infiziert wurde (Kopienzahl von 10^6 bis 10^8 /Tier). Dies weist zum einen auf die geringe Empfänglichkeit von Rindern und zum anderen auf eine Dosisabhängigkeit der Erkrankung hin. Außerdem wurden im Rahmen dieses Versuchs infizierte Tiere mehrfach mit Dexamethason behandelt (0,1 mg/kg/Tag), um eine Immunsuppression hervorzurufen. Dies führte jedoch nicht zum Ausbruch von BKF.

Prophylaxe und Therapie

Der Prophylaxe ist sicher die größte Bedeutung beizumessen, wobei insbesondere auf eine strikte Trennung von Haupt- und Indikatorwirten zu achten ist. Da unter Schafen und Ziegen eine relativ hohe Prävalenz von OvHV-2 und CpHV-2 herrscht, sollten diese Tierarten getrennt von empfänglichen Tierspezies gehalten werden. Dies gilt nicht nur für landwirtschaftliche Betriebe, sondern auch für Tierkliniken, wo häufig alle Arten von Klautieren gemeinsam aufgestellt werden. Eine besondere Gefahr für gefährdete Tierarten stellen Zoos und Wildgehege dar, wo mitunter potentielle Haupt- und Indikatorwirte aufeinandertreffen. Lässt sich eine räumliche Nähe der Haltung nicht vermeiden, so kann versucht werden, eine Macavirus-freie

Literaturübersicht

Herde von Hauptwirten aufzubauen. Für Schafe ließ sich durch eine Trennung der Lämmer von den Muttertieren in einem Alter von etwa acht Wochen und mehrmalige Kontrollen mittels PCR und ELISA (im Alter von zwei, drei, fünf Monaten und danach jährlich) ein Macavirus-freier Bestand aufbauen (Li et al., 1999). Ein ähnlicher Ablauf wird für Ziegenlämmer, allerdings mit einer Trennung im Alter von 10 Tagen, von Li et al. (2005) beschrieben.

Bisherige Impfversuche mit vermehrungsfähigen oder inaktivierten Vakzinen auf der Basis eines attenuierten AIHV-1-Stammes haben zwar zu nachweisbarer Produktion von Antikörpern, nicht aber zum kompletten Schutz vor der Erkrankung bei Rindern geführt (Haig et al., 2008). Bisher ist noch kein Impfstoff gegen Gammaherpesviren auf dem Markt.

Bei der Entwicklung von Impfstoffen gegen Gammaherpesviren sind mehrere Schwierigkeiten zu überwinden, unter anderem das mehrfach erwähnte Problem der Virusanzucht in Zellkultur.

Ein allgemeines Problem bei Herpesvirus-Infektionen stellt die Etablierung einer Latenz und die mögliche Reaktivierung dar. Der Feldeinsatz von Impfstoffen gegen Alphaherpesviren wie bovines Herpesvirus 1 (BoHV-1) oder Pseudorabiesvirus (SuHV-1) bietet keinen Schutz gegen die Entstehung der Latenz (Li et al., 2006).

Versuche zur Entwicklung neuer Impfstoffe werden zudem durch die variable Empfänglichkeit der Indikatorwirte erschwert. Hieraus folgt der Mangel aussagekräftiger Challengemodelle (Infektion nach Vakzinierung) für die Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen.

Problematisch stellt sich weiterhin die Kosten-Nutzen-Rechnung dar. Da es sich bei BKF-Erkrankung von Rindern in der Regel um einzelne betroffene Tiere handelt, ist das kommerzielle Interesse an einem BKF-Impfstoff relativ gering. Zielgruppen sind eher Minderheiten wie Bison- und Hirschhalter in Nordamerika und Neuseeland sowie Zoologische Gärten und Wildparks.

Bisher gibt es keine kausale Therapiemöglichkeit für BKF. Eine unterstützende Behandlung ist jedoch möglich. So können z.B. nicht steroidale Antiphlogistika und antibiotische Augensalben eingesetzt werden. Die Anwendung von Cortisonpräparaten ist umstritten, da hiermit auch körpereigene Abwehrreaktionen unterdrückt werden. Die Atemwege sollten frei gehalten und die Futter- und Wasseraufnahme möglichst erleichtert werden. Über eine antivirale Chemotherapie mit Nukleosid-Analoga oder Pyrophosphat-Analoga wie bei anderen Herpesviren ist im Zusammenhang mit BKF in der Literatur bisher nichts bekannt. Angriffspunkt dieser Pharmazeutika ist in der Regel die DNS-Polymerase oder die Herpesvirus-

Literaturübersicht

Thymidin-Kinase. Studien an mit felinem Herpesvirus 1 (FeHV-1) und equinem Herpesvirus 1 (EHV-1) infizierten Tieren haben zwar eine gewisse Wirksamkeit von Acyclovir, Penciclovir und Cidofovir gezeigt, allerdings teilweise mit schlechter oraler Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit (Field et al., 2006).

Material und Methoden

Material

Probenmaterial

Wildtiere

Es wurden insgesamt Proben von 276 Wildtieren aus 59 Tierarten untersucht. Diese wurden unter anderem von Tierärzten aus Zoologischen Gärten zur virologischen Diagnostik an das Institut für Virologie gesandt. Weitere Proben stammten vom Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) Berlin. Es handelt sich um Serum-, Liquor, EDTA-Blut-, Tupfer- und Organproben. Nur bei einem geringen Anteil der Proben wurde die Verdachtsdiagnose BKF erwähnt. Die Mehrzahl der Proben stammte von Paarhufern mit unterschiedlichen Vorberichten. Die 59 Tierarten gehörten zu den Familien der Hornträger (*Bovidae*), Kamele (*Camelidae*), Hirsche (*Cervidae*), Hirschferkel (*Tragulidae*) und Giraffenartigen (*Giraffidae*). In Tabelle 1 sind die untersuchten Gattungen unter Angabe von Art/Unterart, Familie und Unterfamilie aufgelistet. Bei einigen Tieren fehlte im Untersuchungsantrag eine genaue Angabe der Spezies (siehe z.B. „Hirsch“ oder „Antilope“).

Tabelle 1: Probenübersicht der Wildwiederkäuer, n.b. =nicht bekannt

Art/ Unterart	Lateinische Bezeichnung	Gattung	Unterfamilie	Familie	Anzahl
n.b.	n.b.	Antilope	n.b.	Bovidae	38
n.b.	Connochaetes	Gnu	Alcelaphinae	Bovidae	2
Streifengnu	Connochaetes taurinus	Gnu	Alcelaphinae	Bovidae	2
n.b.	Madoqua	Dikdik	Antilopinae	Bovidae	2
Gerenuk	Litocranius walleri	Gazelle	Antilopinae	Bovidae	1
Mhorrgazelle	Gazella dama mhorr	Gazelle	Antilopinae	Bovidae	3
Thomson Gazelle	Eudorcas thomsoni	Gazelle	Antilopinae	Bovidae	5
n.b.	n.b.	Gazelle	Antilopinae	Bovidae	1
Klippspringer	Oreotragus oreotragus	Oreotragus	Antilopinae	Bovidae	1
Bongo-Antilope	Tragelaphus euryceros	Drehörner	Bovinae	Bovidae	4
Nilgau-Antilope	Boselaphus tragocamelus	Boselaphus	Bovinae	Bovidae	1
Sitatunga	Tragelaphus spekii	Drehörner	Bovinae	Bovidae	4
Banteng	Bos javanicus	Banteng	Bovinae	Bovidae	2

Material und Methoden

Art/ Unterart	Lateinische Bezeichnung	Gattung	Unterfamilie	Familie	Anzahl
Wisent	<i>Bison bonasus</i>	Bison	Bovinae	Bovidae	9
Präriebison	<i>Bison bison bison</i>	Bison	Bovinae	Bovidae	9
Waldbison	<i>Bison bison athabascae</i>	Bison	Bovinae	Bovidae	1
Gayal	<i>Bos gaurus frontalis</i>	Rind	Bovinae	Bovidae	2
Kerabau	<i>Bubalus bubalis</i>	Büffel	Bovinae	Bovidae	1
Moschusochse	<i>Ovibos moschatus</i>	Ovibos	Bovinae	Bovidae	2
Wasserbüffel	<i>Bubalus bubalis arnee</i>	Büffel	Bovinae	Bovidae	1
Watussirind	<i>Bos taurus</i>	Rind	Bovinae	Bovidae	1
Yak	<i>Bos grunniens</i>	Rind	Bovinae	Bovidae	3
Zwergzebu	<i>Bos primigenius indicus</i>	Rind	Bovinae	Bovidae	8
n.b.	<i>Rupicapra rupicapra</i>	Gemse	Caprinae	Bovidae	1
Mähnenspringer	<i>Ammotragus lervia</i>	Ammotragus	Caprinae	Bovidae	3
Mittelchin. Goral	<i>Naemorhedus goral arnouxianus</i>	Goral	Caprinae	Bovidae	1
Mufflon	<i>Ovis orientalis musimon</i>	Schaf	Caprinae	Bovidae	8
n.b.	<i>Capra ibex</i>	Ziege	Caprinae	Bovidae	5
Alpensteinbock	<i>Capra ibex ibex</i>	Ziege	Caprinae	Bovidae	1
Nubischer Steinbock	<i>Capra ibex nubiana</i>	Ziege	Caprinae	Bovidae	4
Westkaukasischer Steinbock	<i>Capra caucasica</i>	Ziege	Caprinae	Bovidae	2
Gelbrückenducker	<i>Cephalophus silvicultor</i>	Schopfducker	Cephalophinae	Bovidae	1
Rotducker	<i>Cephalophus natalensis</i>	Schopfducker	Cephalophinae	Bovidae	1
Arab. Oryx	<i>Oryx leucoryx</i>	Oryx	Hippotraginae	Bovidae	12
Säbelantilope	<i>Oryx dammah</i>	Oryx	Hippotraginae	Bovidae	1
Bergriedbock	<i>Redunca fulvorufula</i>	Riedbock	Reduncinae	Bovidae	4
Riedbock	<i>Redunca redunca</i>	Riedbock	Reduncinae	Bovidae	1
Ellipsenwasserbock	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Wasserbock	Reduncinae	Bovidae	3
Alpaka	<i>Lama pacos</i>	Lama	-	Camelidae	22
Dromedar	<i>Camelus dromedarius</i>	Großkamel	-	Camelidae	3
n.b.	n.b.	Großkamel	-	Camelidae	1
Lama	<i>Lama glama</i>	Lama	-	Camelidae	3
Trampeltier	<i>Camelus bactrianus</i>	Großkamel	-	Camelidae	4

Material und Methoden

Art/ Unterart	Lateinische Bezeichnung	Gattung	Unterfamilie	Familie	Anzahl
Vikunja	<i>Vicugna vicugna</i>	Vikunja	-	Camelidae	2
n.b.	n.b.	Hirsch	n.b.	Cervidae	4
Elch	<i>Alces alces</i>	Elch	Capreolinae	Cervidae	6
n.b.	Pudu	Pudu	Capreolinae	Cervidae	5
Europ. Reh	<i>Capreolus capreolus</i>	Reh	Capreolinae	Cervidae	17
Rentier	<i>Rangifer tarandus</i>	Rentier	Capreolinae	Cervidae	5
Bucharahirsch	<i>Cervus elaphus bactrianus</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	1
Damhirsch	<i>Dama dama</i>	Damhirsch	Cervinae	Cervidae	5
Davidshirsch	<i>Elaphurus davidianus</i>	Davidshirsch	Cervinae	Cervidae	2
Dybowski-Sikahirsch	<i>Cervus nippon dybowskii</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	1
Indischer Axischirsch	<i>Axis axis axis</i>	Fleckenhirsch	Cervinae	Cervidae	2
Indischer Schweinhirsch	<i>Axis porcinus</i>	Fleckenhirsch	Cervinae	Cervidae	1
Leierhirsch	<i>Cervus eldii</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	4
Mesopotamischer Damhirsch	<i>Dama dama mesopotamica</i>	Damhirsch	Cervinae	Cervidae	2
Prinz-Alfred-Hirsch	<i>Cervus alfredi</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	15
Rothirsch	<i>Cervus elaphus</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	2
Sambarhirsch	<i>Cervus unicolor</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	6
Timorhirsch	<i>Cervus timorensis</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	6
Vietnam. Sikahirsch	<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	3
Weißlippenhirsch	<i>Cervus albirostris</i>	Edelhirsch	Cervinae	Cervidae	1
Netzgiraffe	<i>Giraffa camelopardalis reticulata</i>	Giraffe	-	Giraffidae	2

Kleine Wiederkäuer

Es wurden Proben von 230 Ziegen und 58 Schafen gesammelt und untersucht. Die Proben der kleinen Wiederkäuer wurden zum Teil gezielt für diese Studie gesammelt und teilweise zur Routinediagnostik ins Institut für Virologie eingesandt.

Viren

Alcelaphines Herpesvirus 1, Stamm WC11, Passage 3. Gi, erhalten von Prof. Dr. Armin Ensser, Erlangen.

Material und Methoden

Zellen

MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) *Bos taurus* – American Type Culture Collection (ATCC CCL-22)

BEL-26 (Bovine Embryonic Lung) – erhalten von B. Makoschey, Fa. Intervet

SFT-R (Sheep Fetal Thymus) – SFT-R/CCL-5 Rie043: von Dr. Riebe, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems

PT-Zellen (Schafzellen) - von Dr. Riebe, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems

BL-3 (Bovine Lymphomzellen) - von Julia F. Ridpath, Agricultural Research Service, Ames, IA 50010, USA

RK-13 (Rabbit Kidney) - von Dr. Riebe, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems

REB (Rabbit embryonal brain) – von Dr. S. Herzog, JLU Gießen

CUVEC (Caprine umbilical vein endothelial cells) – von C. Hermosilla, Institut für Parasitologie der JLU Giessen, transformiert von Dr. B. Bank-Wolf, Expression des SV40 T-Antigens

Top 10 chemisch kompetente *E. coli* – Fa. Invitrogen

Medien und Puffer

10 x Erythrozyten Lysis Puffer (ELP): 1,5 M NH_4Cl (80,2 g/l), 100 mM NaHCO_3 (8,4 g/l), 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (3,7 g/l); Substanzen lösen in Aq dd und pH mit 1 M HCl/ 1 M NaOH auf 7.4 einstellen. Puffer sterilfiltrieren (0,2 μm Filter) und für maximal 3 Monate bei 2 – 8 °C lagern.

DNS-Auftragepuffer für Agarosegele: 0,1 % (w/v) Orange G, 5 % (w/v) Ficoll 400 in 5 x TAE-Puffer

DNS-Größenmarker: 40 μg DNS (1 Kb 100 Bp DNS-Größenmarker, Fa. Invitrogen), 250 μl DNS-Auftragepuffer, 1 ml TE-Puffer

Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zellen: 10 % (v/v) DMSO in FKS

Medium für Lymphozytenkultur: 200 ml CCM-34, 100 ml F10 Nutrimix, 100 ml F12 Nutrimix, 75 ml FKS, 5 ml 1 M HEPES in PBS, 5 ml Glutamax I, 1,75 ml β -Mercaptoethanol in PBS, 1 ml Pen/Strep (Penicillin: 50.000 IU/ml, Streptomycin: 50 mg/ml), ad 500 ml Aqua bidest

Material und Methoden

Hypoxanthin-Lösung: 0,25 g Hypoxanthin, 4 ml HCl (1 M) zu 130 ml Aqua bidest zugeben und das Hypoxanthin bei 60 °C darin auflösen. Mit Aqua bidest auf 260 ml auffüllen und gleich verwenden.

LB-Medium (Luria-Bertani Broth): 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8 g/l NaCl, in Aqua bidest gelöst, pH 7,5 (mit NaOH), autoklaviert, Lagerung bei 2-8 °C

LB-Medium mit Ampicillin: 500 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin

Orange G *loading buffer* (0,25 %): 2,5 ml Orange G 1 % (w/v), 3 ml Glycerin, 4,5 ml H₂O

PBS deficient: 10 g/l NaCl, 0,25 g/l KCl, 0,25 g/l KH₂PO₄, 1,8 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O in 950 ml Aqua bidest gelöst, autoklaviert, bei 2-8 °C gelagert.

Polyacrylamidlösung 4 %: 30 ml Seqagel XR, 7,5 ml Sequagel Puffer, 400 µl DMSO, 300 µl Ammoniumperoxidsulfat (APS)

SOC-Medium: 2 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

TAE-Gelelektrophorese-Puffer (50 x): 2 M Tris, 0,25 M Na-Acetat, 0,05 M EDTA-Na₂ x 2 H₂O, mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt, autoklaviert

TBE-Puffer „Long Run“ (10 x): 60,05 g Tris, 30,91 g Borsäure, 7,44 g EDTA-Na₂ ad 1 l, pH 8,0, autoklaviert

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, in Aqua bidest gelöst

Trypanblaulösung: 0,25 % (w/v) Trypanblau, 0,15 M NaCl in Aqua bidest, filtriert (0,2 µm), bei 2-8 °C gelagert

Trypsin-Lösung: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 2,5 g/l Trypsin, 1:300, 0,16 g/l Phenolrot in Aqua bidest gelöst, sterilfiltriert (0,1 µm) bei 2-8 °C gelagert

X-Gal-Lösung: 40 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid), gelöst in Dimethylformamid (DMF)

10 x PCR-Puffer, Fa. NaTuTec

Zellkulturmedium CCM-34: 4,5 g/l DMEM-Pulver, 200 µM L-Alanin, 225 µM L-Aspartat, 933 µM Glycin, 510 µM L-Glutamat, 217 µM L-Prolin, 184 µM Hypoxanthin, 0,1 mg/l Biotin, 44 mM NaHCO₃, sterilfiltriert, Lagerung bei 2-8 °C

Material und Methoden

Vorgefertigte Systeme (Kits)

DNA Sequenzierungskit Thermo Sequenase *fluorescent labelled primer cycle sequencing kit*, Fa. Amersham

METAFECTENE®, Biontex Laboratories

OPTI-MEM® + Glutamax, Fa. Gibco

QIAamp DNA Mini Kit, Fa. Qiagen

QIAprep Miniprep Kit, Fa. Qiagen

QIAquick Gel Extraction Kit, Fa. Qiagen

TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix Fa. Applied Biosystems

TaqMan® Universal PCR Master Mix, Fa. Applied Biosystems

TOPO TA Cloning Kit, Fa. Invitrogen

Sonstige Chemikalien und Reagenzien

Agar-Agar, Fa. Difco

Agarose (Elektrophorese), Fa. Gibco-BRL

Ammoniumperoxidsulfat (APS, 10 %), Fa. AmpliChem

Ampicillin, Fa. Roth

Biotherm Taq-Polymerase 5 U/μl, Fa. NaTuTec

Bovines Serumalbumin (BSA), Fa. Gibco-GRL

Desoxynukleotide, Fa. Roche, Mannheim

Dimethylsulfoxid (DMSO), Fa. Sigma

EcoRI – Restriktionsendonuklease (4 U/ml), Fa. New England Biolabs

EcoRI-Puffer (Restriktionsverdau, 20000 U/ml), Fa. TaKaRa

Ethidiumbromid (10 mg/ml Ethidiumbromidstammlösung), Fa. Roth

Fetales Kälberserum (FKS): PAA Laboratories

Glycin, Fa. Roth

Hepes, Fa. Sigma

Hum. Rekomb. Interleukin 2, Jena Bioscience

NUT.MIX F10 (HAM) WITH GLUTAMAX I, Fa. Invitrogen

NUT.MIX F12 (HAM) WITH GLUTAMAX I, Fa. Invitrogen

Material und Methoden

Penicillin/ Streptomycin: Penicillin (Sigma P 3032) 50.000 IU/ml (2,89g / 100ml);

Streptomycin (Sigma S 9137) 50 mg/ml (5g / 100ml)

Seqagel XR, Fa. National Diagnostics

Sequagel Puffer, Fa. National Diagnostics

Triton X-100, Fa. Fluka

Trypanblau, Fa. Serva

Trypsin 1:250, Fa. Invitrogen

Ultra Pure Sequa Gel Complete Puffer, Fa. National Diagnostics

Xylol, Fa. Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

Oligonukleotide und Sonden

Primer aus der Literatur

Angaben zur Position erfolgen für OvHV-2 bezogen auf das Isolat BJ1035 (komplette Genomsequenz), Accession-Nr. AY839756; für AIHV-1 im Bezug auf Isolat C500 (komplette Genomsequenz), Accession-Nr. AF0053750 und für CpHV-2 bezogen auf eine Teilsequenz (1-3623) mit der Accession-Nr. AF283477.

Tabelle 2 „Wobbel“, die anstelle mehrerer Basen eingesetzt werden können

Wobbel	Guanin	Adenin	Thymin	Cytosin
M		A		C
R	G	A		
W	G	A	T	C
S	G		T	C
Y			T	C
K	G		T	
V	G	A		C
H		A	T	C
D	G	A	T	
B	G		T	C
N	G	A	T	C

Material und Methoden

PAN-Herpes-PCR (Polymerase-Bereich) (VanDevanter et al., 1996; Li, H. et al., 2000)

Name	Sequenz (5'-3')	Position OvHV-2
DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	22573-22592
ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA	22835-22862
KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT	23312-23287
TGV	TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT	22870-22898
IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	23100-23077

OvHV-2-PCR (Tegument-Bereich) (Baxter et al., 1993)

Name	Sequenz (5'-3')	Position OvHV-2
BKF1	AAGATAAGCACCCAGTTATGCATCTGATAAA	121106-121135
BKF2	TTCTGGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTT	121292-121318
BKF3	AGTCTGGGGTATATGAATCCAGATGGCTCTC	121528-121498

1. Runde: BKF1 und BKF3, Fragmentgröße 423 Bp

2. Runde: BKF2 und BKF3, Fragmentgröße 238 Bp

ORF73-PCR (ORF73-Bereich) (Coulter and Reid, 2002)

Name	Sequenz (5'-3')	Position OvHV-2
75U1	CCAGCTGTAAACCTGAACCTGATTGAAT	121049-121021
75U4	ATGGGGTTAGTTGAAGGAAATTAACATT	120630-120603
75U5	GCTACAAAATGGTGCTTTTACGAAGTGG	120541-120514
22L3	CCGCTAGAAGGGCCTTCCATAGGGTCTT	119422-119449
22L4	GGCTTCCTTTAATGTAGGGTCCCAAATA	119313-119340
22L5	GGTTGAAAGGTAAAGATGGAGTAAGTGG	119054-119081
22L6	TATTACAGAAGCACACAGTATCTATTACCTCA	118984-119015
73L1	TTCTTCCTCTCCTCCAGGACCTCC	119724-119747

AIHV-1-PCR, Tham et al. 1994

Name	Sequenz (5'-3')	Position AIHV-1
AIHV-1	TCAATGCAGCTTACTGTGCT	39615-39634
AIHV-2	AATCGAGCGAAGCGTGTGTGT	40028-40008
AIHV-3	TTCCATCCAAACCACCATGC	39655-39674

Material und Methoden

1. Runde: AIHV-1 und AIHV-2, Fragmentgröße 413 Bp

2. Runde: AIHV-2 und AIHV-3, Fragmentgröße 373 Bp

(C gekennzeichnet, Änderung gegenüber Literaturangabe)

Eigene Primer und Sonden

Die Auswahl geeigneter Genombereiche fand mittels Vergleich unterschiedlicher Gammaherpesvirussequenzen aus der GenBank statt (siehe Abbildung 13). Die Primer- und Sondensequenzen wurden mit Hilfe der Primer Express Software der Firma ABI, Langen ermittelt und weiter optimiert. Die Sonden wurden von der Firma ABI bezogen, die Primer als Lyophilisat von Eurofins MWG Operon.

PAN-Macavirus-Polymerase-PCR (Polymerase-Bereich)

Name	Sequenz (5'-`3)	Position OvHV-2
2973F1	CACAACCTGTGCTACTCCACC	22609-22629
3597R1	CAACAGACACTGRAACACCTT	23232-23212
3272F2	GCATGCTKCCCTGCCT	22907-22922
3534R2	CTGGTGTGGGMGGCCA	23171-23156

1. Runde: 2973F1 und 3597R1, Fragmentgröße 624 Bp

2. Runde: 3272F2 und 3534R2, Fragmentgröße 264 Bp

PAN-Macavirus-Glykoprotein B-PCR (Glykoprotein B-Bereich)

Name	Sequenz (5'-`3)	Position OvHV-2
GlyB R01	ACCGTGCTCATGCGCTT	20058-20042
GlyB F02	TCYGCCAAGCGMATCG	19634-19649
GlyB F01	GTGGACCAGCAVAGCGT	19682-19698
GlyB F03	GTGGACCAGCAVAGCGT	19742-19760
OvHV-2GB-R ¹	GGTTCAGCACGATAAAGGTGTCTA	19962-19985

1. Runde: GlyB F02 und GlyB R01, Fragmentgröße 424 Bp

2. Runde: GlyB F01 und GlyB R01, Fragmentgröße 376 Bp oder

2. Runde GlyB F03 und GlyB R01, Fragmentgröße 316 Bp

¹ Nur für Sonderfall Gayal

Material und Methoden

Interne Primer für unspezifisches Fragment der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR

Name	Sequenz (5'-3')
Teg1F	AGCCCAACACCAGGACAAAC
Teg2R	CATCCCTTTCCTGGCGTTAG

Primer und Sonden für Echtzeit PCR

Multiplex Echtzeit PCR (Glykoprotein B-Bereich)

Name	Sequenz (5'-3')	Position OvHV-2
COHV-2F	GTACTTTTACAARAAYTACAGGCACGT	19903-19929
COHV-2R	GGTTCAGCACGATRAAGGTGT	19985-19964
Sonde	Sequenz (5'-3')	Position OvHV-2
OvHV-GlyB	FAM-TACCCGTGAGCGCTGTCCG	19938-19956
Sonde	Sequenz (5'-3')	Position CpHV-2
CpHV-2	VIC-CCGGTGACGGACGTGGCCA	331-349

Primer zur Sequenzierung markiert mit IRD 800 (infrared dye 800)

M13IR 5'-ACGTTGTAACGACGGCCAG-3

M13Rev 5'-TTCACAGGAAACAGCTATGAC-3

Geräte

Analysenwaage, Fa. Sartorius

Bakterienschüttler, Fa. Heraeus

Brutschrank (mit CO₂-Begasung) Stericult 200, Fa. Forma Scientific

Brutschrank (ohne CO₂-Begasung), Fa. WTC Binder

DNA-Sequenzier Modell 4000L®, Fa. Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA

ELISA-Reader SLT Spectra II, Fa. Tecan/SLT

Kühl- und Gefriergeräte, Fa. Liebherr, Fa. Bosch

Gelkammern, Werkstatt Mehrzweckinstitut (MZI) der JLU Gießen

Gel Print 2000I Dokumentationssystem, Fa. MWG-Biotech

Heizblock, Werkstatt Mehrzweckinstitut (MZI) der JLU Gießen

Kühlzentrifuge Kendro Megafuge 1,0R, Fa. Heraeus

Minishaker MS1 IKA, Fa. IKA-Labortechnik

PCR-Kabinett Holten Lamin Air/PCR Mini Typ HVPCR, Fa. Holten

Material und Methoden

PCR-Maschine Thermal Cycler 2720 (96 Proben), Fa. Applied Biosystems

PCR-Maschine GeneAmp PCR System 2400 (24 Proben), Fa. Applied Biosystems

ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System, Fa. Applied Biosystems

Photometer Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Fa. Biotech

Zentrifuge BHG Hermle Z364, Hermle GmbH, Gosheim

Reinstwasseranlage Purelab Plus UF, Fa. USF Deutschland GmbH

Stromquelle Bio Rad Power Pac Basis 041BR, Fa. Bio Rad

Stromquelle Electrophoresis Power Supply EPS 600, Fa. Pharmacia Biotech

Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf

UV-Leuchtplatte, Fa. Bachofer

Wasserbad WB10, Fa. Memmert GmbH & Co.KG

Zelleinfrierapparat „Mr. Frosty“, Fa. Nalgene

Zentrifuge (4 °C) Biofuge Fresco, Fa. Heraeus

Zentrifuge (ohne Kühlung) Biofuge 13, Fa. Heraeus

Verbrauchsmaterialien

Ein- und Mehrkanalpipetten: 0,1-2 µl, 2-10 µl, 10-20 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, Fa. Biohit, Fa. Gilson, Fa. Micronic

Gewebekulturschalen, -platten, Fa. Falcon BD

Handschuhe (Latex und Nitril), Fa. Roth

Kryoröhrchen, Fa. Nalgene

Pipettenspitzen, Fa. Biozym

Pipettenspitzen aerosolresistent, nukleasefrei, Fa. Nerbe

Reaktionsgefäße, Fa. Eppendorf, Fa. Falcon BD

Spritzenfilter aufschraubbar, 0,45 µm, Fa. Fisher Scientific

Spritzenfilter aufschraubbar, 0,2 µm, Fa. Fisher Scientific

Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal, Fa. Brand GmbH & Co KG, Wertheim

Zählkammer nach Neubauer, Fa. Brand GmbH & Co KG, Wertheim

Methoden

Nukleinsäureaufarbeitung aus Probenmaterial

Die DNS-Gewinnung aus Probenmaterial erfolgte unter der Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits der Firma QIAGEN gemäß Herstellerangaben.

Vorbereitung gerinnungsgehemmter Blutproben

Aus gerinnungsgehemmten Blutproben (2,5 ml) wurde zunächst mit Hilfe von Erythrozytenlysispuffers (ELP) ein Leukozytenpellet gewonnen. Hierfür wurden ELP und die Blutprobe im Verhältnis 4:1 vermischt, für ca. 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 1500 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Schritt wiederholt (Mischverhältnis 2:1). In einem letzten Schritt wurde das gewonnene Pellet mit 1,5 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde das gereinigte Pellet in 200 µl PBS aufgenommen und für die Nukleinsäurepräparation eingesetzt.

Vorbereitung von Tupferproben

Tupferproben wurden mit etwa 0,5 ml PBS defizient versetzt und für mindestens 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Die gewonnene Flüssigkeit wurde zur weiteren Präparation verwendet.

Vorbereitung von Paraffinschnitten

Von einem Tier (Hirsch „llongo“) standen nur Paraffinschnitte als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Vom Institut für Pathologie, FB10 der JLU Gießen wurden von jedem Block 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Jeweils drei bis vier dieser Schnitte wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und zur Entparaffinierung mit 1000 µl Xylol für 5 Minuten bei Raumtemperatur in einem Thermoschüttler geschüttelt. Danach wurden die Proben 3 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und die bis dahin durchgeführten Schritte wiederholt. Der Überstand wurde erneut abpipettiert, verworfen und 1000 µl Ethanol wurden zugefügt. Nach erneuter Inkubation im Thermoschüttler und Zentrifugation wurde auch dieser Schritt mit Ethanol wiederholt. Das Sediment wurde zum vollständigen Trocknen in eine Vakuum-Zentrifuge gegeben. Anschließend wurde das erhaltene Pellet mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K über Nacht bei 56 °C im Thermoschüttler inkubiert. Dieser Schritt wird auch für frische oder tiefgefrorene Organe eingesetzt, dabei genügt im allgemeinen eine ein- bis dreistündige Inkubationszeit. Am nächsten Morgen konnte

Material und Methoden

entsprechend den Herstellerangaben (QIAGEN) das Protokoll zur Organaufarbeitung fortgesetzt werden.

Bei der Aufarbeitung wurde eine negative Kontrolle (PBS) mitgeführt, als positive Kontrolle diente Organmaterial eines an BKF erkrankten Rindes.

Das gewonnene Nukleinsäure-Eluat wurde entweder direkt verwendet oder bei ≤ -18 °C gelagert.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR besteht im Wesentlichen aus drei mehrmals aufeinander folgenden Schritten, die zyklisch wiederholt werden:

- Denaturierung zum Aufschmelzen des DNS-Doppelstrangs (bei 94 °C),
- Primeranlagerung (Annealing, Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur der Primer, hier 56 °C) und
- Strangverlängerung (Elongation), bei der durch die thermostabile Taq-DNS-Polymerase vom 3'-Ende des Primers ausgehend Nukleinsäure synthetisiert wird (72 °C).

Dadurch erfolgt je Zyklus eine Verdopplung des zu amplifizierenden Fragments und damit eine exponentielle Vermehrung über 30-40 Zyklen. Dies ermöglicht auch den Nachweis sehr geringer Mengen von viraler DNS. Der Nachweis von Genomabschnitten BKF-auslösender Viren in infizierten Zellen gelingt mittels PCR, ohne dass eine Virusanreicherung erfolgen muss.

Die Durchführung der PCR erfolgte mit Ausnahme der PAN-Herpes- und der ORF73-PCR nach einem Standardprotokoll des Diagnostischen Labors des Instituts.

Ansatz des Mastermixes je Probe:

5,0 µl	10 x Puffer (15 mm MgCl ₂)
0,4 µl	dNTP-Mix (Fa. Roche)
0,5 µl	Primer A (50µM)
0,5 µl	Primer B (50µM)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
40,9 µl	Aqua bidest

Im Anschluss wurden den 47,5 µl Mastermix je 2,5 µl präparierte Nukleinsäure zugesetzt und die erste Runde nach folgendem Protokoll inkubiert:

Material und Methoden

94 °C für 3 Min.

30 Zyklen: 94 °C für 30 Sek., 56 °C für 30 Sek., 72 °C für 30 Sek.

72 °C für 10 Min.

Die zweite Runde wurde mit einer Annealing-Temperatur von 60 °C gemäß dieses Protokolls durchgeführt.

Die PAN-Herpes- und ORF73-PCR wurden in Anlehnung an die Angaben der jeweiligen Literaturstellen entsprechend angesetzt und gegebenenfalls modifiziert.

Der Ansatz des Mastermixes erfolgte nach dem oben aufgeführten Modell.

Bei der PAN-Herpes-PCR ist in der ersten Runde ein weiterer Primer vorhanden. Außerdem wurden zusätzlich 2,5 µl DMSO je Probe zugegeben. Die Menge an Aqua bidest muss dementsprechend verringert werden, um 47,5 µl Mastermix zu erhalten. Die Inkubationen sahen wie folgt aus:

94 °C für 3 Min.

35 Zyklen: 94 °C für 30 Sek., 46 °C für 30 Sek., 72 °C für 45 Sek.

72 °C für 10 Min.

Die Bedingungen für die zweite Runde der PAN-Herpes-PCR unterschieden sich nur in der Inkubationszeit für die Elongation, hier wurde nur 30 Sek. bei 72 °C inkubiert.

Für die ORF73-PCR wurde das Standard-Protokoll des Diagnostischen Labors des Instituts verwendet. Die einzige Änderung erfolgte aufgrund der Fragmentlänge für die Elongationszeit. Die Inkubation bei 72 °C erfolgte für 60 Sek.

Analyse der PCR-Produkte

Die Produkte beider PCR-Runden wurden auf ein 1,5 % (w/v) horizontales Agarosegel (Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen (8 µl PCR-Produkt + 2 µl Auftragepuffer) und 30-40 Minuten in 1x TAE-Puffer mit 0,1 mg/l Ethidiumbromid bei 9 V/cm gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe von ultraviolettem Licht (254 nm Wellenlänge) wurden die entstandenen Banden sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten (GelPrint 2000 Dokumentationssystem, MWG Biotech). Zur Validierung der PCR mussten die Positivkontrollen Banden in der erwarteten Größe aufweisen, während bei den Negativkontrollen keine Banden in dieser Größe auftreten durften.

Gelextraktion von DNS-Fragmenten

Die für die Klonierung vorgesehenen Amplifikate wurden erneut auf ein horizontales 1-1,5 % (w/v) Agarosegel aufgetragen (40 µl PCR-Produkt + 10 µl Auftragepuffer) und aufgetrennt. Auf einem Transilluminator (320 nm Wellenlänge) konnten die Banden sichtbar gemacht und mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten werden. Das extrahierte Gelstück wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die darauffolgende Gelextraktion erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen, gemäß den Angaben des Herstellers. Zunächst wurde das Gewicht des Gelabschnitts bestimmt und QG-Puffer in dreifacher Menge des Gelvolumens hinzugegeben. Daraufhin erfolgte eine mindestens 10- minütige Inkubation bei 50 °C auf dem Thermoschüttler. Im Anschluss wurde die einfache Volumenmenge Isopropanol hinzugegeben, gemischt und auf eine QIAquick Spin® Säule überführt und zentrifugiert (10000 x g / 1 Min.). Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule einmal mit 500 µl QG-Puffer und einmal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Mit Hilfe eines Elutionspuffers (30 µl) wurde schließlich die DNS aus der Säulenmembran gelöst und ein letztes Mal zentrifugiert. Die hierbei eluierte DNS konnte entweder direkt zur Klonierung verwendet oder bei ≤ -18 °C tiefgefroren werden. Zur Kontrolle der erfolgreichen Extraktion und Abschätzung der Menge für die nächsten Schritte wurden Teilmengen der eluierten Produkte (4 µl + 5 µl Auftragepuffer) erneut auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese beurteilt und fotografisch dokumentiert.

Klonierung und Sequenzierung

Ligation

Die Klonierung von PCR-Amplifikaten wurde mit Hilfe des TOPO® TA Cloning Kits der Firma Invitrogen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei der Ligation wird die zu sequenzierende DNS in eine bekannte linearisierte Vektor-DNS „eingebaut“. Die Basis dieses Kits stellt das Enzym DNS-Topoisomerase I aus dem Vaccinia-Virus dar, welches sowohl als Restriktionsenzym als auch als DNS-Ligase reagieren kann. Dieses Enzym erkennt spezifisch die Sequenz 5'-(C/T)CCTT-3'. Topoisomerase I ist kovalent an 3'-Phosphate der TOPO®-Vektoren gebunden, was dem Vektor ermöglicht in kurzer Zeit an kompatible Enden der gewünschten DNS-Sequenzen zu ligieren. Durch eine Verlängerung der Elongationszeit am Ende der PCR auf 10 Minuten werden mit Hilfe der Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase vermehrt Adenosinreste an das 3'-Ende des PCR-Produkts angehängt. Der linearisierte Vektor (pCR®2.1-TOPO®) weist am 3'-Ende einen Thymidin-Überhang

Material und Methoden

auf, was somit die Ligation ermöglicht. Entsprechend der Beurteilung der Bandenstärke nach der Gelextraktion wurden zwischen 0,5 µl und 4 µl DNS eingesetzt, jeweils 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektor hinzugegeben und das Volumen mit sterilem Wasser auf 6 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Transformation

Bei der Transformation wird die ligierte DNS in Bakterien eingeschleust. Hierfür wurden chemisch kompetente E.coli („One shot chemically competent E.Coli Top 10®“, Fa. Invitrogen) verwendet und 2 µl des Ligationsmix hinzugegeben. Zur Transformation folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis, die durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden beendet wurde. Danach wurden 250 µl SOC-Medium dazugegeben und die Bakterien bei 37 °C auf einem Inkubator für eine Stunde geschüttelt. SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl und 20mM Glucose) ist ein reichhaltiges Medium und maximiert die Transformationseffizienz kompetenter Zellen. Zwischenzeitlich konnten die LB-Agar-Platten (+100 µg/ml Ampicillin) vorbereitet werden, in dem je 40 µl X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid, 40 mg/ml) ausgestrichen wurden. X-Gal ermöglicht eine blau-weiß-Selektion der Bakterien-Kolonien. Durch den Einbau eines PCR-Fragments in den Vektor wird die Gensequenz für das Enzym β-Galaktosidase unterbrochen. Dadurch kann das X-Gal nicht mehr enzymatisch gespalten werden und eine Blaufärbung unterbleibt. Kolonien mit erfolgreicher Ligation und Transformation erscheinen daher weiß. Pro Ligations-Ansatz wurden jeweils einmal 40µl und einmal 100 µl ausplattiert. Während der Übernachtinkubation bei 37 °C konnten dank der Ampicillin-Resistenz des Vektors und des lac-Z-Gens (kodiert für β-Galaktosidase) sowohl blaue als auch weiße Kolonien wachsen. Weiße Kolonien entsprechen den erwünschten Produkten, bei denen eine Insertion stattgefunden hat. Für die weitere Verwendung wurden jeweils 4-7 weiße Kolonien gepickt und in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Mini-Präparation von Plasmid-DNS

2 ml des Bakterienansatzes wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 Minuten bei 2000 g/RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet für die weitere Präparation mittels QIAprep Spin Miniprep Kit®, Fa. QIAGEN, nach den Angaben des Herstellers genutzt. Zunächst wurde das Pellet in 250 µl Puffer P1 (RNase A enthalten) resuspendiert, danach 250µl Puffer P2

Material und Methoden

hinzugegeben und schließlich eine Denaturierung von Proteinen und Präzipitation von Zellbestandteilen durch Zugabe von 350µl Puffer N3 hervorgerufen. Die Ansätze wurden 10 Min. bei 17900 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand auf QIAprep Spin® Säulen pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde mit Hilfe von 750 µl Puffer PE gewaschen, 1 Min. zentrifugiert und die Säule in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. 50 µl Elutionspuffer EB lösten die an die Matrix gebundene DNS effizient nach 1 Min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur und erneuter Zentrifugation für 1 Min. Die gewonnene Plasmid-DNS wurde zunächst durch einen Kontroll-Verdau überprüft und dann bei ≤ -18 °C aufbewahrt, bzw. zur Sequenzierung eingesetzt.

Restriktionsenzymspaltung

Je 2 µl der Plasmid-DNS wurden mit einem Mix aus 5,8 µl ddH₂O, 1 µl BSA, 1 µl *EcoRI*-Puffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) und 0,2 µl *EcoRI* (4 U/ml) für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach mit 4 µl Auftragepuffer auf ein 1,5 % (w/v) horizontales Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter Analyse der PCR-Produkte beschrieben. War die Klonierung erfolgreich, erschienen bei der Auswertung mindestens 2 Banden, eine davon in der Größe des Vektors und eine in der Größe des amplifizierten Fragments. *EcoRI* spaltet das Plasmid in Vektor und Insert, da die Schnittstellen das Insert flankieren. In seltenen Fällen bestanden zusätzliche *EcoRI*-Schnittstellen innerhalb der PCRzielsequenz, so dass zusätzliche Banden auftraten, die insgesamt der erwarteten Größe entsprachen.

Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde auf der Grundlage des Sanger-Protokolls durchgeführt (Sanger et al., 1977). Die Methode ist als Kettenabbruch- oder Dideoxy-Sequenzierung bekannt. Zusätzlich zu den einzelnen Deoxynukleotiden werden der Reaktion Dideoxynukleotide zugesetzt. Werden diese in eine Sequenz eingebaut, verhindern sie die Anlagerung weiterer Nukleotide, da keine Phosphodiesterbindung mehr möglich ist. So entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge.

Ansatz Mix 1:

2 µl Primer (M13IR oder M13Rev) (1 pMol/µl)

14-23 µl Minipräp-DNS

auf 25 µl mit Aqua dd auffüllen

Von Mix 1 werden jeweils 6 µl zum jeweiligen Nukleotidmix pipettiert:

2 µl Mix ddGTP, bzw. ddATP, bzw. ddTTP oder ddCTP

Jeder Ansatz erfolgt doppelt, mit den Primern M13IR und M13Rev.

Material und Methoden

Amplifikationsbedingungen:

Denaturierung: 94 °C für 2 Min.

30 Zyklen: Denaturierung: 94 °C für 15 Sek.

Annealing: 56 °C für 15 Sek.

Elongation: 70 °C für 30 Sek.

14 °C für 10 Min.

Zu jedem Ansatz wurden 4 µl Fluoreszenzladepuffer pipettiert, gefolgt von einer erneuten Denaturierung 70 °C für 2 Min. und anschließendem Abkühlen auf 4 °C, gegebenenfalls Aufbewahrung bei ≤ -18 °C.

1,2 µl der Reaktionen wurden auf ein 40 cm Polyacrylamidgel (6 % w/v) aufgetragen und mit TBE-Longrun-Puffer ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung der Primer (IRD 800) am 5'-Ende konnten diese durch Laseranregung und Detektion im Li-COR 4000L Sequenzierer detektiert und mit Hilfe einer gerätespezifischen Software ausgewertet werden.

Im Allgemeinen (auch beim Versand von Proben zu Sequenzierung) wurden jeweils drei voneinander unabhängige Klone einer positiven Probe sequenziert.

Versand von Proben zur Sequenzierung

Ein Teil der Proben wurde durch den QIAGEN Sequencing Service als Easy Read oder als Basic Read bearbeitet.

Auswertung der Sequenzierung

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des HUSAR-Programm-Pakets (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) Heidelberg ausgewertet. Ein Vergleich der drei unabhängigen Klone einer Probe in beiden Leserichtungen führte jeweils zu einer Consensus-Sequenz, die zunächst mit bereits bekannten Sequenzen verglichen werden konnte. Im Anschluss erfolgte eine phylogenetische Analyse.

Phylogenetische Analyse

Die phylogenetischen Analysen wurden ebenfalls mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets durchgeführt. Hierfür steht das von Joe Felsenstein entwickelte PHYLIP-Programm (phylogeny inference package) zur Verfügung (Felsenstein, 1993). Durch ein Alignment der Nukleinsäuresequenzen mittels „Pileup“ wurden die gewünschten Sequenzen miteinander abgeglichen. Der Grad der genetischen Distanz wurde auf dieser Basis durch paarweise Vergleiche nach der Kimura 2-Parameter Methode berechnet (Kimura, 1980). Aus der resultierenden Distanzmatrix konnte dann mittels „Neighbor-Joining-Methode“ (Saitou und Nei,

Material und Methoden

1987) ein phylogenetischer Baum erstellt werden. Zur statistischen Absicherung der erhaltenen Gruppierungen wurden Bootstrap-Analysen mit je 1000 Replikaten durchgeführt (Felsenstein, 1985, 1988; Hedges, 1992; Efron et al. 1996).

Diskriminierende Echtzeit PCR

Mit Hilfe der Primer-Express-Software, Fa. Applied Biosystems, wurden gemeinsame Primer für OvHV-2 und CpHV-2 aus einem konservierten Abschnitt des Glykoprotein B-Bereichs ausgewählt. Außerdem wurde durch den Vergleich von OvHV-2 und CpHV-2-Sequenzen ein Abschnitt zur Diskriminierung der beiden Viren über spezifische SONDENSEQUENZEN ausgewählt (siehe Abbildung 13). Für die Ansätze wurde das TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) benutzt und das Standard-Fast-Echtzeit-Protokoll leicht modifiziert. Für jeden Ansatz wurden jeweils 10 µl 2 x Fast Universal PCR Master Mix und je 2 µl der beiden Primer und der beiden Sonden gemischt. Dazu kamen pro Ansatz 2 µl Proben-DNS. Die Proben wurden als Duplikate oder als Triplikate angesetzt. Zur Validierung wurde eine absolute Quantifizierung mit Verdünnungsreihen von Plasmid-DNS durchgeführt. Das AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems) wurde im Modus „Absolute Quantification“ wie folgt programmiert: Phase 1: 95 °C 20 Sek., Phase 2 40 Zyklen: 95 °C 1 Sek., 60 °C 30 Sek. Die TaqMan®-Sonden sind an beiden Enden mit Fluorochromen markiert (Reporter und Quencher). Durch die in dieser PCR verwendete Taq DNS-Polymerase wird die Sonde während der Primerverlängerung durch deren exonukleolytische Aktivität hydrolysiert. Durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher entsteht bei Anregung die messbare Fluoreszenz. Die Messung der entsprechenden Signale ist proportional zur amplifizierten DNS. Auf diese Weise kann eine absolute Quantifizierung im Zusammenhang mit einer Verdünnungsreihe einer bekannten Plasmidkonzentration durchgeführt werden. Zur Auswertung wird ein Schwellenwert bestimmt, bei dem sich jede Einzelreaktion in der exponentiellen Phase befindet, der sogenannte Schwellenwert, bzw. Ct-Wert (*Cycle threshold*). Die Bewertung erfolgte durch die gerätespezifische Software und wurde hinsichtlich Baseline und Threshold optimiert.

Anzucht von Ziegen-Lymphozyten

Die Anzucht von Ziegen-Lymphozyten wurde gemäß der Beschreibung von Schock et al., 1998 durchgeführt. Die Präparation der Lymphozyten erfolgte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Lymphoprep™ (Axis Shield, Oslo).

Material und Methoden

Das gerinnungsgehemmte Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS defizient verdünnt. In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurden zunächst 15 ml Lymphoprep gegeben und dann vorsichtig mit 30 ml des Blut-PBS-Gemischs überschichtet. Anschließend erfolgte eine Dichtezentrifugation für 30 Minuten bei 20 °C und 1000 g. Die Lymphozyten konnten danach aus der Interphase abgesaugt werden. Es folgten zwei Waschschriffe mit CCM34-Medium (ohne FKS) und darauffolgender Zentrifugation für 10 Minuten bei 600 g und 20 °C. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden teilweise in Einfriermedium (FKS + 10 % DMSO (v/v)) in Portionen á $1-3 \times 10^7$ eingefroren, zunächst bei ≤ -70 °C in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox („Mr Frosty“, Fa. Nalgene), nach drei Tagen über flüssigem Stickstoff.

Für die Kultivierung wurde zunächst 50 µg humanes rekombinantes Interleukin 2 (IL-2, $1,7 \times 10^7$ IU/mg, Jena Biosciences) in 500 µl 20 mM Essigsäure (100 mM 1:5 verdünnt + 0,1 % BSA (w/v)) resuspendiert und dem Medium in einer Endkonzentration von 150 IU/ml zugegeben, danach folgte eine Sterilfiltration durch einen 0,2 µm Filter.

Die Ziegen-Lymphozyten wurden zu Beginn in einer 96 well Rundbodenplatte in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen. Hierbei wurden zunächst 100 µl Medium in die Reihen 2-12 vorgelegt und in Reihe 1 200 µl Zellsuspension pipettiert. Mit einer Mischpipette wurden je 100 µl in die nächste Reihe gegeben. Im Anschluss an die Verdünnung wurden die Vertiefungen mit 100 µl Medium, teilweise mit und teilweise ohne Interleukin 2, aufgefüllt. Die Zellen wurden arbeitstäglich mikroskopisch beurteilt. Zweimal wöchentlich fand ein partieller Mediumwechsel statt. Zellen, die zu dicht erschienen wurden umgesetzt. In unregelmäßigen Abständen wurden die Zellen und der Überstand mittels PCR auf Macavirus-spezifische DNS untersucht.

Virusanzucht auf verschiedenen Zelllinien

Organsuspensionen, Leukozytenpellets und Tupferproben der BKF-erkrankten Hirsche mit CpHV-2-Infektion wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (100 µl, 20 µl und 4 µl pro well) auf 24well-Platten mit Rinder-, Kaninchen- und Schafzelllinien aufgetragen. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit CCM34-Zellkulturmedium ohne FKS gewaschen. Danach wurden 200 µl dieses Mediums pro well vorgelegt und die jeweiligen Proben aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde aus der Vertiefung mit 100 µl Probe der Überstand abgenommen. Daraufhin wurde jedes well mit 1 ml

Material und Methoden

CCM34-Zellkulturmedium mit 5 % FKS (v/v) aufgefüllt. Eine mikroskopische Beurteilung erfolgte arbeitstäglich. Außerdem wurden die oben erwähnten Ziegen-Lymphozyten zu einem Anzuchtversuch herangezogen. Eine Kultivierung von ZNS-Suspension zweier Hirsche mit Ziegen-Lymphozyten wurde über mehrere Passagen aufrechterhalten.

Transfektion

Für den Transfektionsversuch wurden zunächst PT-Zellen (Schafzellen) in 6well-Platten ausgesät, die zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 60-80 % konfluent sein sollten. Der Transfektionszusatz bestand aus 70 µl Optimem-Medium (ohne FKS) und 10 µl METAFECTENE® (Biontex Labs). Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden unterschiedliche Konzentrationen von DNS, bzw. Plasmid zugesetzt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Vertiefung fungierte als Negativkontrolle (ohne METAFECTENE®-Mix), eine wurde mit METAFECTENE®-Mix ohne Nukleinsäure behandelt. Als Grundlage zur DNS-Präparation diente ZNS-Material eines mit CpHV-2 infizierten Hirsches. Es wurden 3 µg, 5 µg und 10 µg Gesamt-DNS eingesetzt, sowie als Positivkontrolle ein Plasmid mit einem CpHV-2-Fragment einer positiven Ziege. Während der Inkubationszeit wurde die Platte mit PBS gewaschen und die Vertiefungen jeweils mit 1 ml Medium (mit 10 % FKS) aufgefüllt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Nach vier Stunden im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden in der Folge über vier Passagen gehalten und mikroskopisch beurteilt. Bei jedem Umsetzen wurden jeweils Überstand und Zellen aufgearbeitet und mittels Echtzeit PCR auf ihren Gehalt an viraler DNS überprüft.

BKF-AK-ELISA

Der BKF-AK-ELISA wurde von der Firma VMRD, Pullman, USA über Labor Diagnostik GmbH Leipzig bezogen und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Test basiert auf mit Macavirus-Ag beschichteten ELISA-Platten. Hierbei wird AIHV-1 verwendet, welches in Zellkultur vermehrt werden kann. Es handelt sich um einen kompetitiven ELISA. Der Wettbewerbsschritt wird mit einem monoklonalen Maus-Antikörper (15-A-AC) durchgeführt, der an Merettichperoxidase gekoppelt ist. Die im Serum enthaltenen Antikörper konkurrieren mit diesem Antikörper um die Bindung an der Platte. Im nächsten Schritt wird Substrat dazugegeben, wobei es nach einer bestimmten Inkubationszeit zum Farbumschlag kommt und die Reaktion mit H₂SO₄ gestoppt wird. Die Ablesung erfolgt photometrisch mittels eines ELISA-Platten-Lesegeräts. Anhand der ermittelten OD-Werte (Werte für die optische Dichte) wird der Test validiert und eine Bewertung der Proben in positiv und negativ

Material und Methoden

durchgeführt. Der Ansatz der Negativkontrolle wurde als Triplikat, der der Positivkontrolle als Duplikat durchgeführt. Ein Test war dann valide, wenn der Mittelwert der Negativkontrolle größer als 0,4 und kleiner als 2,1 und der Mittelwert der Positivkontrolle eine optische Dichte von weniger als 75 % des Mittelwerts der Negativkontrolle erreichte. Für die Proben wurde der Wert der Inhibition gegenüber des Mittelwerts der Negativkontrolle berechnet. Proben mit einer Hemmung von mehr als 25 % wurden als positiv bewertet, darunter liegende als negativ.

Hierbei wurden insbesondere Proben von kleinen Wiederkäuern getestet und die Ergebnisse teilweise mit denen des Serumneutralisationstests verglichen.

Serumneutralisationstest

SNTs werden zum Nachweis neutralisierender Antikörper eingesetzt. Die Test- und Kontrollseren wurden vor der Verwendung für 30 Min. bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert, um thermolabile Inhibitoren (wie z.B. Komplement) zu entfernen. In jedem Test wird ein positives und ein negatives Kontrollserum mitgeführt. Die Serumproben wurden direkt in Duplikaten auf 96well Gewebekulturplatten in Dreierschritten in Kulturmedium verdünnt und mit einer definierten Menge Testvirus (100-300 TCID₅₀/well AIHV-1, Stamm WC11) inkubiert. Zur Titration der Virusgebrauchsverdünnung (VGV) wurde eine Verdünnungsreihe in Vierschritten angelegt. Die Inkubationszeiten lagen in den verschiedenen Ansätzen bei einer Stunde, bzw. vier Stunden. Außerdem wurde ein SNT mit dem Zusatz von 3 % (v/v) Meerschweinchen-Komplement zur VGV getestet. Die Aktivität neutralisierender Antikörper kann teilweise komplementabhängig sein. In einigen Fällen lässt sich durch Zugabe von Meerschweinchen-Komplement eine Steigerung des neutralisierenden Potentials erreichen (Ferris und Donaldson, 1983).

Für jedes Serum wurde zusätzlich eine Toxizitätskontrolle ohne VGV angelegt. Nach Abschluss der Inkubation wurden Indikatorzellen (2x10⁵/ml MDBK-Zellen, 50 µl/well) zugegeben und die Ansätze für 7-10 Tage im Gewebekulturinkubator kultiviert. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch Beurteilung des induzierten zytopathischen Effekts (zpE). Die Titer, bzw. Dosis neutralisierender Antikörper in den Serumproben und der VGV wurden nach Spaerman-Kärber berechnet:

$$\text{Titer} = D^{-(R + 0,5)}$$

$$\text{Dosis} = \log_{10} D^{(R + 0,5)} \text{ [} \log_{10} \text{ND}_{50} \text{] bzw. [} \log_{10} \text{TCID}_{50} \text{]}$$

R = Summe der Reaktionswerte (geschützte Mikrokulturen bzw. Mikrokulturen mit zpE (VGV)/Anzahl der Replikate in einer Verdünnungsstufe)

D = Verdünnungsfaktor

Material und Methoden

Die Ergebnisse 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 Wert der VGV wurde als $\log_{10}TCID_{50}$ angegeben. Im Falle toxischer Effekte eines Testserums erfolgte die Titerangabe wie folgt: Titer \leq kleinster ablesbarer Wert; Verdünnungsstufen x bis y nicht auswertbar.

Ergebnisse

Etablierung neuer Testmethoden

Ein Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Einsendungen von Ziegenproben an das Institut für Virologie der JLU Gießen. Die Tiere zeigten laut Vorbericht sowohl klinisch als auch pathologisch-histologisch typische Veränderungen einer BKF-Erkrankung. Mit Hilfe der OvHV-2-PCR von Baxter et al. (1993) konnte in allen eingesandten Probenmaterialien OvHV-2-spezifische DNS nachgewiesen werden. Dies stellte die erste Beschreibung einer BKF-artigen Erkrankung bei Ziegen dar (Jacobsen et al., 2007). Weiterhin sollte die gleichzeitige Anwesenheit weiterer Macaviren (**malignant catarrhal fever virus**) überprüft werden. Außer den seit langem bekannten OvHV-2 und AIHV-1 sind inzwischen mindestens fünf weitere Vertreter der Unterfamilie *Gammaherpesvirinae* als Auslöser von BKF nachgewiesen worden. Daher wurden Primer aus den vergleichsweise konservierten Genen für Glykoprotein B und Polymerase ausgewählt, um mittels PCR möglichst alle potentiellen Erreger („PAN-Macavirus-PCR“) zu detektieren (siehe Abbildung 9).

Die Etablierung einer PAN-Macavirus-PCR bildete auch die Grundlage für die Untersuchung von Wildtieren. Im Dezember 2006 wurden Proben von zwei Prinz-Alfred-Hirschen (*Cervus alfredi*) mit typischer BKF-Symptomatik an das Institut für Virologie geschickt. Hierbei handelt es sich um eine sehr seltene philippinische Hirschespezies (siehe Abbildung 8). Auf zwei von fünf philippinischen Inseln leben weniger als 2500 Tiere dieser Art. Im Rahmen einer Zusammenarbeit von europäischen Zoos und der Regierung der Philippinen (Department of Environment and Natural Resources, Government of the Philippines und Zoo Mulhouse, Frankreich) wurde 1990 zwecks Arterhaltung ein Zuchtprogramm begonnen. Ende 2006 bestand die Population dieses Zuchtprogramms bereits aus etwa 250 Tieren und ein Auswilderungsprogramm wird angestrebt (<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/4273/0>).

Bei beiden Tieren mit klinischem BKF-Verdacht konnte mit Hilfe der neu etablierten PCR-Verfahren CpHV-2 nachgewiesen werden. Damit war die Basis zur vorliegenden Arbeit gelegt, deren Ziele darin bestehen, neue Detektionsmethoden für unterschiedliche Macavirus-Spezies bei verschiedenen Tierarten zu etablieren, sowie Hinweise auf die Prävalenz von CpHV-2 zu gewinnen.

Ergebnisse



Abbildung 8: Männlicher Prinz-Alfred-Hirsch (*Cervus alfredi*) eines Zuchtzentrums auf den Philippinen; Foto mit freundlicher Genehmigung von J.-O. Heckel, Zoo Landau

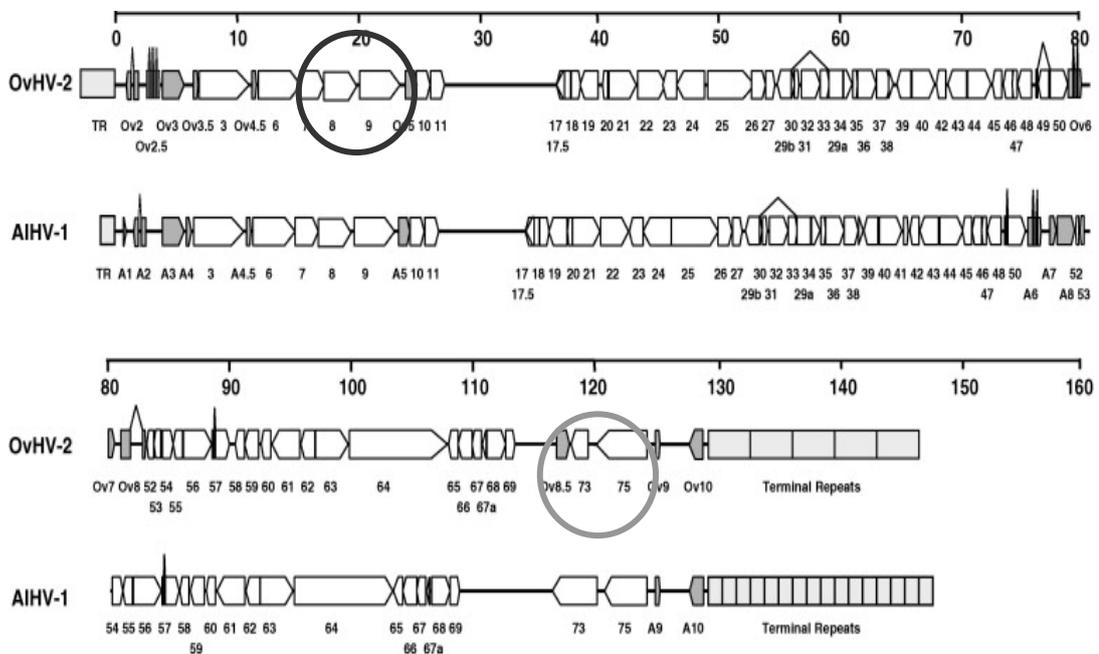


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Genome von OvHV-2 und AIHV-1 im Vergleich. Legende siehe Abbildung 3. Dunkelgraue Ellipse: ORF8 (Glykoprotein B) und ORF9 (DNS-Polymerase); hellgraue Ellipse: ORF73 (latency associated nuclear antigen-LANA) und ORF75 (Tegument-Protein). Aus den umringelten Bereichen wurden

Ergebnisse

Primersequenzen ausgewählt und für PCR-Methoden genutzt. Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch Russel et al., 2009.

Troubleshooting bei der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR

Die OvHV-2-spezifische Tegument-PCR mit den Primern von Baxter et al. (1993) erwies sich bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Studie für die Proben von gesunden Schafen und für die Proben der meisten BKF-Verdachtsfälle als geeignet. Es handelt sich um eine semi nested PCR. Damit kann eine Verbesserung der Spezifität des Verfahrens erreicht werden. Innerhalb des in der ersten Runde amplifizierten Fragments wird ein neuer Primer ausgewählt und mit einem Primer aus der ersten Runde der PCR kombiniert. Dadurch kann die Spezifität des Fragments aus der ersten Runde abgesichert werden. Sowohl bei Schafen als auch bei anderen erkrankten Wiederkäuern traten nur selten unspezifische Banden auf, während positive Proben zuverlässig nachgewiesen wurden. Dies konnte auch in Vergleichsuntersuchungen mit anderen Laboren demonstriert werden. Außerdem wurden Ergebnisse durch Sequenzierungen der Amplifikate bestätigt.

Im Gegensatz dazu trat insbesondere bei Proben von Ziegen und teilweise auch bei Proben von Hirschen in der zweiten Runde der PCR häufig eine ausgeprägte Bande in der Größe von 365 Bp auf (siehe Abbildung 10); diese entspricht zwar nicht der erwarteten Größe von 238 Bp, kann aber fälschlicherweise als positives Ergebnis interpretiert werden.

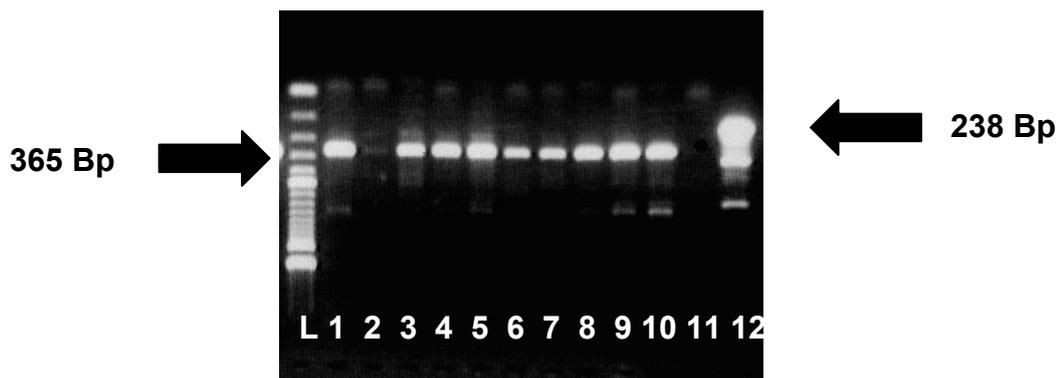


Abbildung 10: Geldokumentation von Ziegenproben (aus EDTA-Blut): 12= Positivkontrolle OvHV-2, 11= Negativkontrolle, 1-10= Proben von Ziegen, L=100 Bp-Marker

Das 365 Bp große Fragment wurde aus dem Gel extrahiert, kloniert und sequenziert. Im Vergleich mit Daten aus der GenBank konnte es keiner bekannten Sequenz zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich hier um genomische

Ergebnisse

DNS. Bei Sequenzanalysen nicht Virus-spezifischer Banden aus unterschiedlichen Herpesvirus-PCR-Methoden wurden mitunter Ähnlichkeiten zu genomischer DNS verschiedener Wiederkäuer-Spezies nachgewiesen (siehe Tabelle 7).

Als Fazit ist festzuhalten, dass bei Durchführung dieser PCR im Rahmen der Diagnostik immer eine genaue Kontrolle der Bandengröße erfolgen sollte, um eine falsch positive Beurteilung von Ziegen- und Hirschproben auszuschließen.

„PAN-PCR“

„PAN-Herpesvirus-PCR“

Im Rahmen der Suche nach bereits bekannten Sequenzen diverser Gammaherpesviren bei Wildwiederkäuern wurde festgestellt, dass in der GenBank vorwiegend Sequenzen aus dem Polymerase-Bereich zugänglich sind. Dies war der Anlass zur Etablierung einer PCR auf Basis des Polymerasegens. Die bereits bekannten Sequenzen entstammen der von vanDevanter et al. (1996) veröffentlichten „PAN-Herpesvirus-PCR“. Um Primer an nicht komplett übereinstimmende Sequenzen anzupassen, besitzen diese sogenannte „Wobbel“ (degenerierte Primer); die „Wobbel“ stehen für mehrere Nukleotide an einer Position des Primers. Zunächst wurden die stark degenerierten Primer von vanDevanter et al. (1996) mit Proben von Wildtieren getestet, die in mindestens einer anderen Methode zu positiven Ergebnissen geführt hatten. Dabei ließ sich nicht für jedes bis dahin erhaltene „Macavirus-Isolat“ ein entsprechendes Fragment amplifizieren. Daher wurde die Spezifität der PAN-Herpesvirus-PCR mit Hilfe einiger Herpesvirus-Positivkontrollen aus unserem Institut getestet. Dabei wurde festgestellt, dass in der ersten Runde nur EHV-1, EHV-2, AIHV-1, FeHV-1 und BoHV-4 detektiert wurden, in der zweiten Runde der PCR außerdem auch EHV-4, BoHV-5, CHV-1, OvHV-2 und CpHV-2. Die für diese Arbeit besonders relevanten Virusspezies CpHV-2 und OvHV-2 führten zu einem eher unbefriedigenden Ergebnis hinsichtlich der Bandenstärke (siehe Tabelle 3).

Ergebnisse

Tabelle 3: Ergebnisse der PAN-Herpesvirus-PCR nach vanDevanter et al. (1996) mit unterschiedlichen Herpesviren

	Bande in der 1. Runde	Bande in der 2.Runde
EHV-1	+	+
EHV-4	-	+
EHV-2	+	+
BoHV-1	-	-
BoHV-4	+	+
BoHV-5	-	+
FeHV	+	+
CHV	-	+
AIHV-1	+	+
OvHV-2	-	(+)
CpHV-2	-	(+)

Berichte aus den USA zeigen, dass dort die Prävalenz von CpHV-2 bei Ziegen mit der von OvHV-2 bei Schafen vergleichbar ist. Da für Deutschland bisher nur sehr wenig über die Verbreitung von CpHV-2 bekannt ist, sollte ein Verfahren für die Detektion von diesem Virus optimiert werden. Ein Vergleich der bis zu siebenfach degenerierten Primer mit der Polymerasesequenz von CpHV-2 aus der GenBank zeigte erhebliche Unterschiede in den Nukleotidsequenzen (siehe Abbildung 11).

Ergebnisse

```
CpHV-2 GACTTTGCCAGCCTGTACCC
      | | : | | : | | : | | : | | : | |
DFA    GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC

CpHV-2 TTTTGGACAAGCAGCAGCTGGCCATCAA
      | ■ | | | | | | | | | | : : : | | : : | ■ | |
ILK    TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA

CpHV-2 GTCTACGGAGACACCGACTCCCTG
      . | : | | : | | : | | . | | | | | . . | |
IYG    ATHTAYGGNGAYACGGACTCTGTG

CpHV-2 TGCAACTCAGTGTACGGGTTACAGGGGT
      | | . | | | | | . | | | | : | | : | | : | | : | |
TGV    TGTAACTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT

CpHV-2 ACCGTGGTAAACGTGGTGAGCAGCAT
      | . . | . : | | : . | : . | | | | | | | . . | .
KG1    AARGGNGTNGANCTGGTGAGCAAGAC
```

Abbildung 11: Vergleich einer CpHV-2-Sequenz mit den Polymerase-Primern (DFA, ILK, IYG, TGV und KG1) der PAN-Herpes-PCR von vanDevanter et al. (1996). Die sogenannten „Wobbel“ Y (T und C), R (G und A), N (G, A, T und C), S (G und C), M (A und C) und H (A, T und C) stehen jeweils für verschiedene Kombinationen mehrerer Nukleotide. Übereinstimmende Nukleotide sind mit einem Strich verbunden, nicht übereinstimmende mit einem Punkt, teilweise passende „Wobbel“ mit zwei Punkten.

Neben den fehlenden Übereinstimmungen erschien die Anzahl der degenerierten Nukleotide redundant. Auf der Basis bekannter Macavirus-Sequenzen dieses Genomsegments wurden neue Primer aus dem Polymerase-Bereich ausgewählt. Beide PCR-Verfahren beziehen sich auf den gleichen Abschnitt im Genom. Die Ergebnisse können also im Rahmen der phylogenetischen Analyse gut mit bereits vorhandenen Sequenzen verglichen werden.

„PAN-Macavirus-Polymerase-PCR“

Die Auswahl geeigneter Genombereiche fand mittels Vergleich unterschiedlicher Gammaherpesvirussequenzen aus der Genbank statt (siehe Abbildung 12). Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Primer Express Software der Firma ABI, Langen, ermittelt und optimiert.

Ergebnisse

```
af181468.gb_ ACAGTT
ay212111.gb_ ACGGTT
ay212112.gb_ ACTGTG
af276433.gb_ CGTGTG
ay057986.gb_ CGCGTG
af275941.gb_ ACCGTG
af327831.gb_ ACAGTGGTGTATGGGGACACTGACTCTCTATTTCATCAACTGCGAGGGTTTTGACATGGAC
af283477.gb_ ACCGTGGTCTACGGAGACACCGACTCCCTGTTTCATAAACTGCGAGGGTTTTCCACATTGAC

af327831.gb_ ACAGTTCTAG-AGTTCAGTGACAGGTTGGCCTCCCACACCAGC-AGCCTC-CTATTTTCG
af283477.gb_ ACAGTGCT-GCAATTTAGCGACAGGCTGGCCGCCACACCAGC-AGCCTC-CTGTTCCCG

af327831.gb_ GCCCCTATTAACTGGAGTCAGAAAAGGTGTTTCAGTGTCTGCTGTTACTCACAAAAAAG
af283477.gb_ GACCCGATTAACTGGAGTCGGAGAAGGTGTTCCAGTGTCTGTTGCTGCTGACAAAAAAG
```

Abbildung 12: Lage der Primer für den Polymerase-Bereich auf der Basis von Sequenzen von: AIHV-2, ruminant type 1 Rhadinovirus (Oryx-Antilope), HiHV-1 (Pferdeantilope), WTD-MCFV (Weißwedelhirsch), ruminant type 1 Rhadinovirus (Moschusochse), ruminant type 1 Rhadinovirus (nubischer Steinbock), Caprines lymphotropes Herpesvirus, Bison Gammaherpesvirus, CpHV-2, OvHV-2 (Genbankzugangsnummern in Tabelle 14). PAN-Macavirus-Primer sind unterstrichen.

„PAN-Macavirus-Glykoprotein B-PCR“

Für die Auswahl dieser Primer wurde ebenfalls ein Vergleich von Sequenzen unterschiedlicher Macaviren aus der GenBank vorgenommen. Während das Spektrum der „PAN-Macavirus-Polymerase-PCR“ möglichst breit angelegt sein sollte, wurde die Glykoprotein B-PCR besonders auf die Detektion von CpHV-2 ausgerichtet.

Um die Sensitivität zu untersuchen, wurden für die Validierung beider PCR-Verfahren Verdünnungsreihen von Positivkontrollen hergestellt. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit einige Klonierungen und Sequenzierungen durchgeführt, um die Spezifität von Amplifikaten zu verifizieren.

Schließlich wurden beide Verfahren mit dem 1993 von Baxter et al. beschriebenen Verfahren der „Tegument-PCR“ aus demselben Ausgangsmaterial verglichen. Für einige Proben wurde auch ein Vergleich mit der vanDevanter et al.-Methode (1996) durchgeführt. Die positiven Ergebnisse sind getrennt nach Wildtieren (siehe Tabelle 4) und kleinen Hauswiederkäuern aufgelistet. Eine Auflistung aller getesteten Tiere mit allen unterschiedlichen Verfahren findet sich im Anhang.

Ergebnisse

Wildtiere

Tabelle 4: Zusammenfassung der positiven Ergebnisse der konventionellen PCR-Verfahren bei verschiedenen Wildtierspezies. Fälle, in denen laut Vorbericht eine BKF-Erkrankung vorlag, sind mit einem * gekennzeichnet. Positive Ergebnisse sind hellgrau dargestellt. N.d.=nicht durchgeführt.

Spezies	Spezies (lat.)	Teg-PCR	PAN-Herpes	Maca-GlyB-PCR	Maca-Pol-PCR
Alpensteinbock	Capra ibex	-	N.d.	+	+
Bison *	Bison bonasus	+	N.d.	+	+
Bison *	Bison bonasus	+	N.d.	+	+
Banteng *	Bos javanicus	-	N.d.	+	+
Banteng *	Bos javanicus	-	N.d.	+	+
Davidshirsch *	Elaphurus davidianus	+	N.d.	+	+
Elch *	Alces alces	+	N.d.	+	+
Elch *	Alces alces	+	N.d.	+	+
Elch *	Alces alces	-	N.d.	+	+
Ellipsen-Wasserbock	Kobus ellipsiprymnus	-	N.d.	-	+
Gayal	Bos gaurus frontalis	+	-	-	-
Hirsch *		+	-	+	+
Mufflon	Ovis orientalis orientalis	+	N.d.	-	+
Mufflon	Ovis orientalis orientalis	+	N.d.	-	-
Mufflon	Ovis orientalis orientalis	+	N.d.	+	+
Mufflon	Ovis orientalis orientalis	+	N.d.	+	+
Nubischer Steinbock	Capra ibex nubiana	-	-	+	+
Nubischer Steinbock	Capra ibex nubiana	-	-	+	+
Nubischer Steinbock	Capra ibex nubiana	-	-	+	+
Nubischer Steinbock	Capra ibex nubiana	-	-	+	+
Prinz-Alfred-Hirsch *	Cervus alfredi	-	+	+	+

Ergebnisse

Spezies	Spezies (lat.)	Teg-PCR	PAN-Herpes	Maca-GlyB-PCR	Maca-Pol-PCR
Prinz-Alfred-Hirsch *	<i>Cervus alfredi</i>	-	N.d.	+	+
Prinz-Alfred-Hirsch *	<i>Cervus alfredi</i>	-	N.d.	+	+
Prinz-Alfred-Hirsch *	<i>Cervus alfredi</i>	+	N.d.	+	+
Prinz-Alfred-Hirsch *	<i>Cervus alfredi</i>	+	N.d.	+	+
Prinz-Alfred-Hirsch *	<i>Cervus alfredi</i>	+	N.d.	+	+
Prinz-Alfred-Hirsch *	<i>Cervus alfredi</i>	+	N.d.	+	+
Reh *	<i>Capreolus capreolus</i>	+	-	+	+
Sikahirsch *	<i>Cervus nippon</i>	+	N.d.	+	+
Sikahirsch *	<i>Cervus nippon</i>	+	N.d.	+	+
Steinbock	<i>Capra ibex</i>	-	N.d.	+	+
Steinbock	<i>Capra ibex</i>	-	N.d.	+	+
Thomson-Gazelle	<i>Eudorcas thomsoni</i>	-	+	-	-
Thomson-Gazelle	<i>Eudorcas thomsoni</i>	-	+	-	-
Thomson-Gazelle	<i>Eudorcas thomsoni</i>	-	+	-	-
Thomson-Gazelle	<i>Eudorcas thomsoni</i>	-	+	-	-
Waldbison *	<i>Bison bison athabasca</i>	+	+	+	+
Westkaukasischer Steinbock	<i>Capra caucasica</i>	-	N.d.	+	+
Westkaukasischer Steinbock	<i>Capra caucasica</i>	-	N.d.	+	+

Es wurden 276 Wildtiere mit Hilfe der unterschiedlichen PCR-Verfahren getestet. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht alle Verfahren etabliert waren, wurden mittels PAN-Macavirus-Polymerase-PCR 188 (69 %) Wildtiere getestet. Die PAN-Herpesvirus-PCR wurde nur zu Beginn der Studie und in Sonderfällen eingesetzt.

Proben von insgesamt 276 Tieren führten in 39 Fällen in mindestens einem Verfahren zu einem positiven Ergebnis (siehe Tabelle 4), das entspricht 14 %. Tiere, bei denen laut Vorbericht eine BKF-Erkrankung vorlag (19 Tiere) sind in der Tabelle mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Teilweise handelte es sich um

Ergebnisse

Einsendungen aus verschiedenen Laboren, eine genaue Anamnese war nicht immer verfügbar. Einige Proben wurden von Zoos oder Wildparks eingesandt, um den Macavirus-Trägerstatus zu bestimmen.

Auf Proben von vier Thomson-Gazellen wird hier nicht näher eingegangen. Durch Klonierung, Sequenzierung und Virusanzucht konnte kein Macavirus, sondern ein Alphaherpesvirus identifiziert werden, das nahe verwandt zu EHV-1 und EHV-9 war.

Da die positiven Ergebnisse der beiden PAN-Macavirus-PCR-Verfahren keine Aussage über die Virusspezies zulassen, wurden die Amplifikate kloniert und sequenziert. Dies erfolgte auch für die Proben, die in der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR positiv waren, da eine Doppelinfektion nicht ausgeschlossen werden kann. Wurden Proben mehrerer Wildtiere einer Spezies aus einem Bestand zum gleichen Zeitpunkt eingesandt, erfolgte eine Sequenzierung meist nur von einem dieser Tiere.

Positive Proben von Wildtieren und deren Macavirusspezies

Der größte Teil der positiven Proben von Wildtieren ließ sich mittels Sequenzanalyse OvHV-2 zuordnen. Von den 19 OvHV-2-positiven Tieren waren drei Bisons, acht Hirsche, zwei Elche und ein Reh an BKF erkrankt; vier Mufflons können als Hauptwirt angesehen werden; bei einem Gayal ist eine BKF-Erkrankung denkbar, bei dem laut Vorbericht Paratuberkulose-Verdacht vorlag. Es könnte sich bei dem Gayal auch um die Darmform von BKF gehandelt haben.

Bei insgesamt 18 von 39 positiven Proben von Wildtieren traten ausschließlich Amplifikate in einer oder beiden PAN-Macavirus-PCR-Verfahren, nicht jedoch in der Tegument-PCR auf. Das entspricht 6 % aller Wildtiere und 47 % der insgesamt positiven Proben von Wildwiederkäuern.

Durch Klonierung und Sequenzierung konnte bei 15 Wildtieren CpHV-2 bzw. CpHV-2-ähnliche DNS nachgewiesen werden (38 % der positiven Wildwiederkäuer). Eine BKF-Erkrankung lag vorberichtlich bei drei Prinz-Alfred-Hirschen, zwei Banteng-Rindern und einem Elch vor. Proben von fünf Steinböcken (ein Alpensteinbock und vier Westkaukasische Steinböcke) enthielten zwar CpHV-2-DNS, es handelte sich aber um gesunde Tiere, die auf ihren Macavirus-Trägerstatus überprüft werden sollten.

Amplifikate von vier nubischen Steinböcken zeigten einen hohen Verwandtschaftsgrad zum CpHV-2 (siehe Tabelle 5), bildeten bei der phylogenetischen Analyse jedoch eine eigene Gruppe zusammen mit Sequenzen von einem Steinbock-Virus aus der GenBank. Diese Gruppe wurde vor der

Ergebnisse

offiziellen Änderung der Taxonomie als „Steinbock-assoziiertes Rhadinovirus“ bezeichnet.

Tabelle 5: Vergleich der Sequenzen von Proben eines nubischen Steinbocks mit einem „Steinbock-assoziiertem Rhadinovirus“, CpHV-2 und OvHV-2. Die Zahlen geben die Nukleotidübereinstimmungen in Prozent an.

	Steinbock-ass. Rhadinovirus (AY212112)	CpHV-2 (AF283477)	OvHV-2 (AF327831, bzw. AF385441)
Glykoprotein B	Keine Angaben	93	88
Polymerase	95	90	75

Proben eines Wasserbocks erbrachten nur in der PAN-Macavirus-Polymerase-PCR Amplifikate, die nach Sequenzierung große Ähnlichkeit zum Bovinen Herpesvirus 6 (BoHV-6) aufwiesen. Dieses Virus wurde ursprünglich als bovines lymphotropes Herpesvirus bezeichnet (BIHV).

Im Fall von drei Wildtieren, einem Gayal und zwei Mufflons waren die Ergebnisse der unterschiedlichen PCR-Verfahren nicht komplett übereinstimmend. Bei dem Gayal, der mit Verdacht auf Paratuberkulose euthanasiert wurde, erwies sich die OvHV-2-spezifische Tegument-PCR für alle Organe bereits in der ersten Runde als positiv, die beiden Macavirus-PCR-Verfahren als negativ. Dieser Fall wird im Abschnitt „Widersprüchliche Ergebnisse bei Proben von einem Gayal (Wasserbüffel, *Bos gaurus frontalis*)“ näher beschrieben.

Die negativen Ergebnisse mit Proben von zwei Mufflons im Vergleich zum positiven Resultat der Tegument-PCR sind wahrscheinlich auf eine etwas geringere Empfindlichkeit der PAN-Macavirus-PCR-Verfahren im Vergleich zur OvHV-2-spezifischen PCR zurückzuführen.

Ziegen und Schafe

Die vergleichsweise geringere Sensitivität der breit reagierenden „PAN-Macavirus“-PCR-Verfahren zeigt sich auch bei den Ergebnissen der Untersuchungen von Proben kleiner Hauswiederkäuer. Hierbei handelt es sich, ebenso wie beim Mufflon, in der Regel um persistent infizierte Hauptwirte. Bei zwei Ziegen und fünf Schafen konnte trotz eines positiven Ergebnisses in der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR kein positives Resultat in beiden PAN-Macavirus-Methoden erzielt werden.

Ergebnisse

Von den 230 Ziegen und 58 Schafen waren 31 Ziegen und 27 Schafe in der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR positiv. Das entspricht 13,5 % der untersuchten Ziegen und 46,6 % der Schafe.

Bei positiven Ergebnissen von Proben von Schafen mit einem der PAN-Macavirus-PCR-Ansätze war auch stets die OvHV-2-spezifische PCR positiv. Es konnte also in jedem Fall auf eine Infektion mit OvHV-2 geschlossen werden. Proben von sieben Schafen wurden aufgrund der Tatsache, dass nur Serum als Untersuchungsmaterial vorhanden war, nur mit Hilfe des ELISAs getestet.

Von 230 untersuchten Ziegen wurden 39 Tiere mit allen PCR-Verfahren, 25 mit den konventionellen PCR-Verfahren, 16 mittels Echtzeit PCR und 31 mittels ELISA getestet. Außerdem wurden einige Proben von Ziegen mit einem oder zwei der konventionellen PCR-Verfahren untersucht. Es waren 85 Proben in der PAN-Macavirus-Glykoprotein B-PCR positiv und davon 56 in der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR negativ. Mit Hilfe der PAN-Macavirus-Polymerase-PCR konnten unter 81 getesteten Ziegen 35 positive detektiert werden (Vergleich siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich beider PAN-Macavirus-PCR-Verfahren bei Proben von kleinen Wiederkäuern. n.d.= nicht durchgeführt

	PAN-Macavirus-Polymerase-PCR	PAN-Macavirus-Glykoprotein B-PCR	OvHV-2-spez. Tegument-PCR
1 Schaf	+	+	+
1 Schaf	-	-	+
1 Schaf	-	+	+
2 Schafe	n.d.	n.d.	-
4 Schafe	n.d.	-	+
7 Schafe	n.d.	n.d.	+
13 Schafe	n.d.	+	+
14 Schafe	-	-	-
1 Ziege	n.d.	-	+
1 Ziege	+	n.d.	-
1 Ziege	-	-	+
1 Ziege	+	n.d.	n.d.
1 Ziege	-	+	-

Ergebnisse

	PAN-Macavirus-Polymerase-PCR	PAN-Macavirus-Glykoprotein B-PCR	OvHV-2-spez. Tegument-PCR
1 Ziege	+	+	+
3 Ziegen	+	-	-
9 Schafe	n.d.	-	-
15 Ziegen	-	n.d.	-
26 Ziegen	n.d.	+	-
28 Ziegen	n.d.	+	+
29 Ziegen	-	-	-
29 Ziegen	+	+	-
47 Ziegen	n.d.	-	-

In einigen Fällen wurden Proben von Ziegen in einer PAN-Macavirus-PCR positiv getestet, während die OvHV-2-spezifische Tegument-PCR negativ war. In diesen Proben konnte CpHV-2 mit Hilfe der Echtzeit PCR und der Sequenzierung von Amplifikaten identifiziert werden. Der Verdacht auf eine CpHV-2-Infektion ist bei insgesamt 61 (32 %) aller untersuchten Ziegen aufgrund des negativen OvHV-2-Ergebnisses naheliegend.

Von den 230 untersuchten Ziegen zeigten zusammenfassend 92 (40 %) mindestens ein positives Ergebnis in der konventionellen PCR. Bei 61 dieser Tiere (66,3 %) konnte OvHV-2 nicht nachgewiesen werden.

Analyse von nicht gammaherpesviralen Sequenzen

Im Rahmen der verschiedenen PCR-Verfahren traten mitunter verdächtige Banden auf, die kloniert und sequenziert wurden. Hierbei handelte es sich nicht immer um Fragmente von Gammaherpesviren. In Tabelle 7 sind die Wirtsspezies mit der zugrundeliegenden PCR und dem Blastn-Ergebnis („basic local alignment search tool nucleotides“) nach Vergleich mit Sequenzen aus der GenBank dargestellt.

Besonders interessant war in diesem Rahmen der Nachweis eines Alphaherpesvirus aus Proben von vier Thomson-Gazellen (ID 6755), die mit Verdacht auf BKF eingesandt wurden. Durch Klonierung und Sequenzierung konnten große Ähnlichkeiten zum Equinen Herpesvirus 1 (EHV-1) festgestellt werden.

Ergebnisse

Tabelle 7: Analyse von Nukleotid-Sequenzen, Angabe von Wirt, PCR-Verfahren und Blastn-Ergebnis; die nicht als Gammaherpesvirus spezifisch identifiziert werden konnten. In hellgrau dargestellt: Ergebnis einer Sequenzierung von Proben einer Thomson-Gazelle mit Ähnlichkeit zu EHV-1.

Wirt (ID)	PCR	Blastn-Ergebnis	GenBank-Zugangsnr. (Acc. Nr.)
Trampeltier (237)	PAN-Macavirus-Polymerase	Homo sapiens chromosome 3 clone RP11-109J15 map	Ac066580
Arab. Oryx-Antilope (323)	PAN-Macavirus-Polymerase	Bos taurus BAC CH240-12E22	Ac149769
Steinbock (19066)	PAN-Macavirus-Polymerase	Human DNA sequence from clone RP11-547C13 on chromosome 9	AI162394
Mesopotam. Damhirsch (336)	PAN-Macavirus-Polymerase	Homo sapiens, unassigned DNA	Cq410412
Leierhirsch (337)	PAN-Macavirus-Polymerase	Homo sapiens, unassigned DNA	Ax198134
Gayal (394)	PAN-Macavirus-Polymerase	Homo sapiens, unassigned DNA	Ax198918
Antilope (741)	PAN-Macavirus-Polymerase	Human DNA sequence from clone RP11-66O21 on chromosome 9	AI160280
Antilope (737)	PAN-Macavirus-Polymerase	Homo sapiens chromosome 11	Ac111151
Antilope (3956)	PAN-Macavirus-Polymerase	Human DNA sequence from clone RP1-303A1 on chromosome 6	AI096800
Antilope (3956)	PAN-Macavirus-Polymerase	Nicotiana tabacum, unassigned DNA	CS224892

Ergebnisse

Wirt (ID)	PCR	Blastn-Ergebnis	GenBank-Zugangsnr. (Acc. Nr.)
Mähnspringer (20027)	PAN-Macavirus- Polymerase	Human DNA sequence from clone RP11-66O21 on chromosome 9	AI160280
Mähnspringer (20027)	PAN-Macavirus- Polymerase	Sheep satellite II DNA repeat unit	X03117
Thomson-Gazelle (6755)	PAN-Herpesvirus	EHV 1, Sequence 154 from Patent WO2004011677	CQ772553
Antilope (737)	PAN-Macavirus- Glykoprotein B	Homo sapiens chromosome 11	Ac111151
Antilope (741)	PAN-Macavirus- Glykoprotein B	Human DNA sequence from clone RP11-66O21 on chromosome 9	AI160280
Arab. Oryx-Antilope (323)	PAN-Macavirus- Glykoprotein B	Sheep satellite II DNA repeat unit	X03117
Schraubenziege (393)	PAN-Macavirus- Glykoprotein B	Homo sapiens BAC clone RP11-433O3	Ac093840
Riedbock (19065)	OvHV-2-spezifische Tegument-PCR	Homo sapiens 12 BAC RP11-43N5	Ac022513
Giraffe (328)	OvHV-2-spezifische Tegument-PCR	Human DNA sequence from clone RP1-63G5 on chromosome 22	Z94160
Moschusochse (296)	OvHV-2-spezifische Tegument-PCR	Homo sapiens chromosome 19 clone	Ac011474
Antilope (741)	OvHV-2-spezifische Tegument-PCR	Vitis vinifera contig VV78X240121	Am441631

Ergebnisse

Wirt (ID)	PCR	Blastn-Ergebnis	GenBank-Zugangsnr. (Acc. Nr.)
Gnu (26300)	OvHV-2-spezifische Tegument-PCR	Hippotragus equinus satellite 1 sequence	Af285415

Etablierung einer Echtzeit PCR und deren Anwendung

Die Echtzeit PCR hat in den letzten Jahren in vielen Fällen die konventionelle PCR ersetzt. Herausragende Vorteile der Echtzeit PCR sind schnelle Ergebnisse, hohe Spezifität, geringe Kontaminationsgefahr, Möglichkeit der Kombination mehrerer Nachweisverfahren in einer Multiplex-PCR, Verzicht auf Geldokumentation, Ergebnisse bereits während der Zyklen (daher *Echtzeit*) und die Möglichkeit zur Quantifizierung. Um auch im Rahmen des bearbeiteten Projektes größere Probenzahlen, beispielsweise ein Herdenscreening von Hauptwirten, effizienter bearbeiten zu können, wurde eine diskriminierende Echtzeit PCR für den Nachweis der in Europa hauptsächlich auftretenden Macaviren etabliert. Hierbei kann sofort zwischen OvHV-2, CpHV-2 und Doppelinfektionen unterschieden werden. Die Primer sind sowohl für OvHV-2 als auch für CpHV-2 geeignet, während die Sonden für die jeweilige Virusspezies spezifisch gewählt wurden (siehe Abbildung 13).

In der hier beschriebenen Echtzeit PCR wurden TaqMan®-Sonden verwendet. Um zwischen den beiden Virusspezies unterscheiden zu können, sind die Sonden mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und können so innerhalb eines Tests separat ausgewertet werden. TaqMan®-Sonden sind jeweils mit einem Sender- (*Reporter*-) am 5'-Ende und einem Empfänger-Fluorochrom (*Quencher*-) am 3'-Ende gekoppelt. Ist die Sonde intakt, wird nach Anregung des Reporters Energie durch FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) auf den *Quencher* übertragen und in Form von Wärme oder Licht hoher Wellenlänge emittiert. Die während der Amplifikationsphase der PCR an die DNS spezifisch gebundene Sonde wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert und setzt damit den Sender am 5'-Ende der Sonde frei. Durch die räumliche Trennung von Sender und Empfänger wird ein Signal erzeugt, welches proportional zur Menge der generierten DNS ist. Durch verschiedene Filter können während eines Durchlaufs unterschiedliche Signale detektiert werden; dies erlaubt die Möglichkeit zur Multiplex-Anwendung.

Ergebnisse

niedrige Ct-Werte weisen auf einen hohen Gehalt, hohe Ct-Werte auf einen besonders niedrigen Gehalt hin.

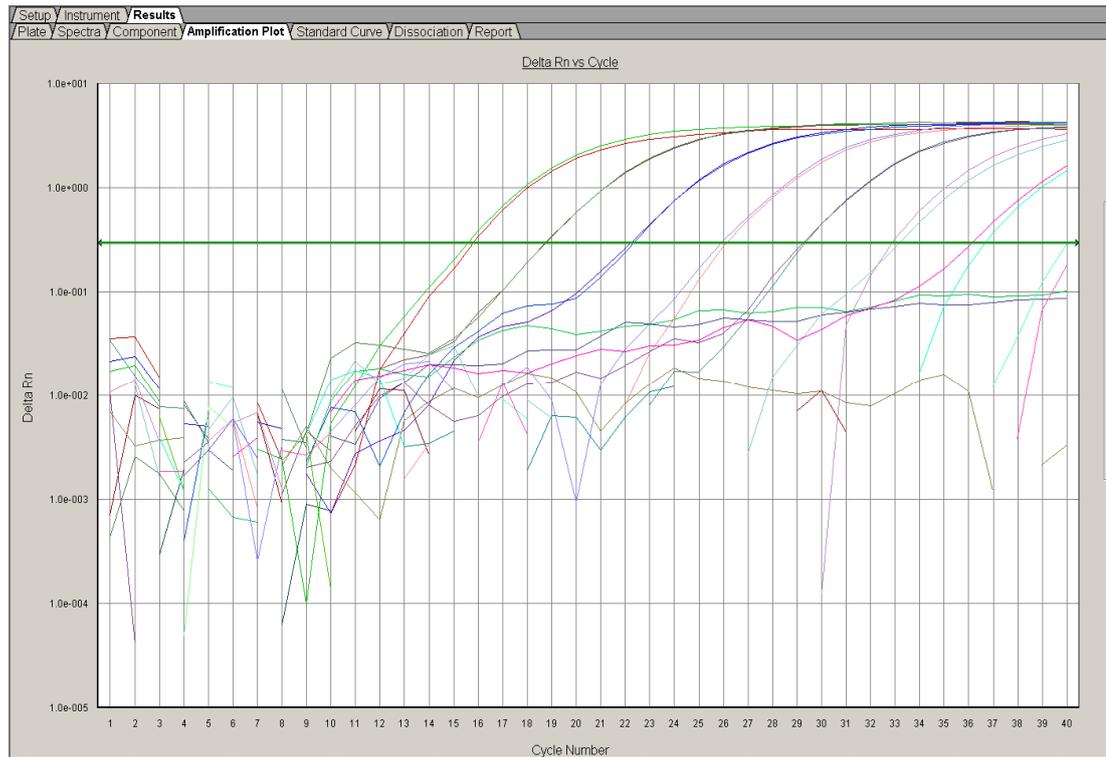


Abbildung 14: Echtzeitprotokoll einer Standardverdünnungsreihe (CpHV-2-Plasmid) über acht Verdünnungsstufen, bzw. Kopienzahl von 6,4 bis 640.000.000

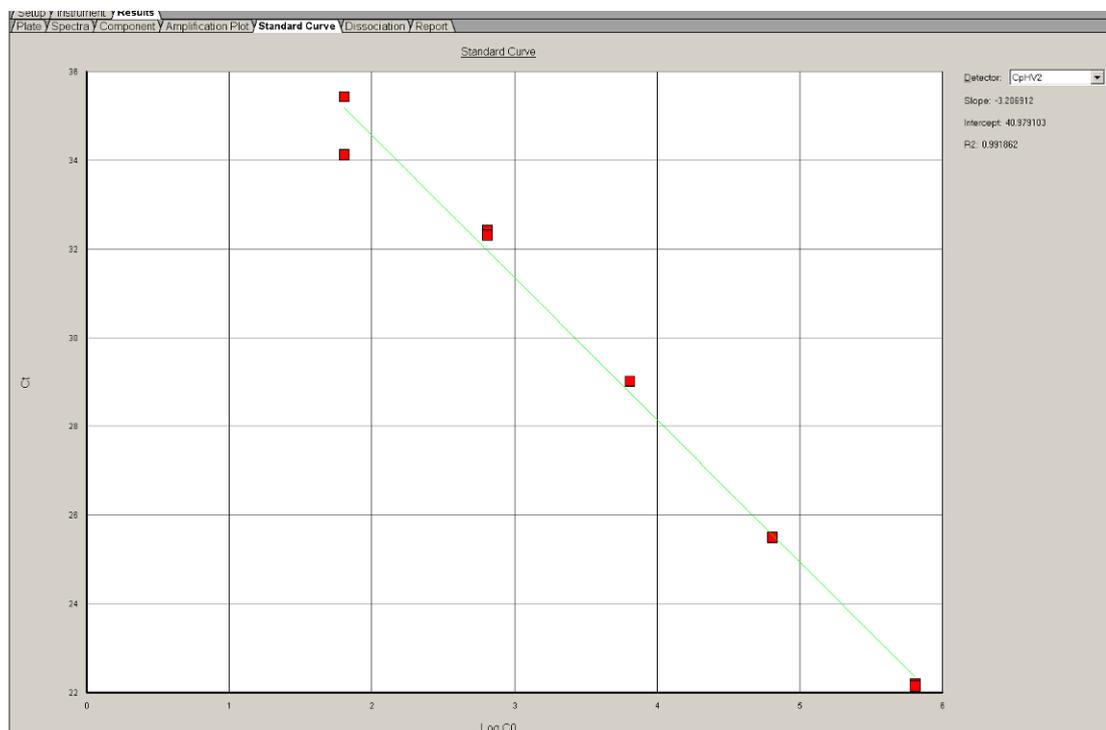


Abbildung 15: Standardkurve des CpHV-2-Plasmids mit fünf Verdünnungsstufen mit folgenden Eckdaten: Steigung: -3,2; Effizienz: 2,0; Korrelation R²: 0,99; nachweisbare Kopienzahl: 64 (Cycle threshold (Ct) 35)

Ergebnisse

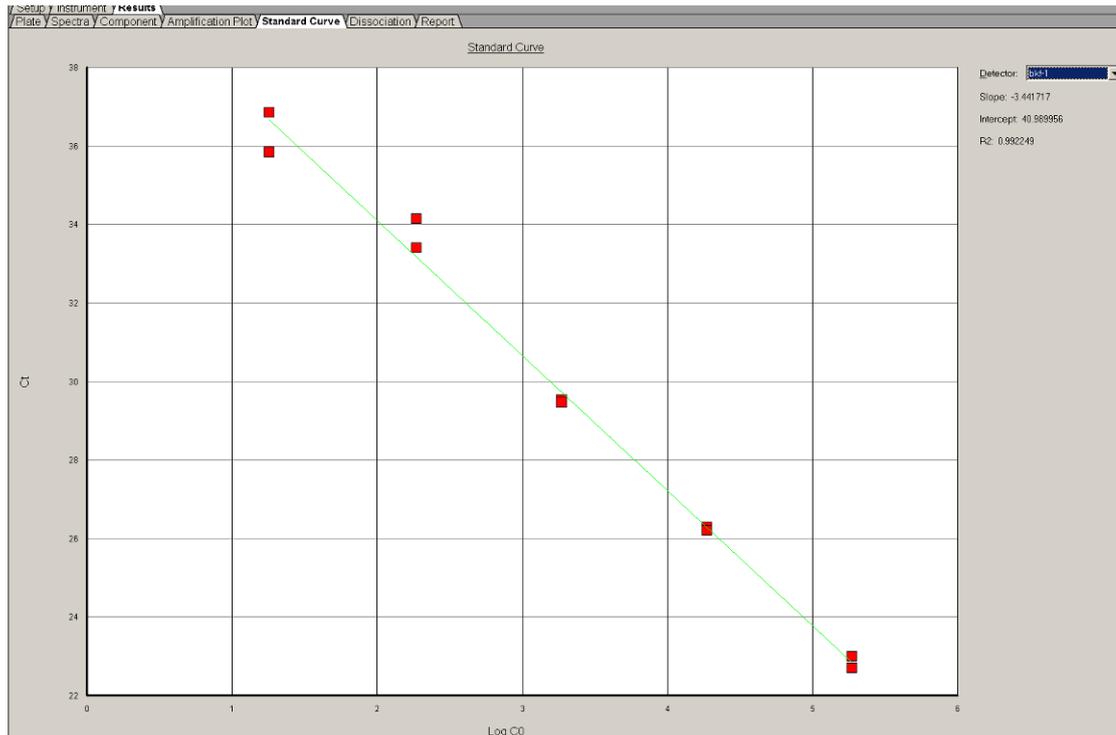


Abbildung 16: Standardkurve des OvHV-2-Plasmids mit fünf Verdünnungsstufen mit folgenden Eckdaten: Steigung:-3,4, Effizienz: 1,9; Korrelation R^2 : 0,99; nachweisbare Kopienzahl: 18 (Cycle treshold (Ct) 36)

Ergebnisse von Wildtierproben mittels Echtzeit PCR

Zur Validierung und Überprüfung wurden einige Wildtiere auch mittels OvHV-2-CpHV-2-diskriminierender Echtzeit PCR getestet. Die mit konventioneller PCR und Sequenzierung erzielten Ergebnisse konnten mit denen der Echtzeit PCR verglichen werden. In den meisten Fällen wurde eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse festgestellt (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9). Einen Sonderfall stellen auch hier Proben eines Gayals dar, bei denen bereits Unstimmigkeiten im Rahmen der konventionellen PCR aufgetreten sind; dies wird im Abschnitt „Widersprüchliche Ergebnisse bei Proben von einem Gayal (Wasserbüffel, *Bos gaurus frontalis*)“ noch näher behandelt.

Ergebnisse

Tabelle 8: Vergleichende Ergebnisse der konventionellen PCR und der CpHV-2-OvHV-2-diskriminierenden Echtzeit PCR mit Angabe des durchschnittlichen Ct-Wertes. Proben mit Ct-Werten über 38 wurden als negativ beurteilt, ein Ct-Wert von 37 als fraglich. Positiv = +, negativ = -, * laut Vorbericht an BKF erkrankt

Tierart	Bezeichnung	OvHV-2 Echtzeit	Konvent. PCR	CpHV-2 Echtzeit
Waldbison*	26961	Ct 20	OvHV-2 + Macavirus +	-
Elch*	27846	Ct 29	OvHV-2 + Macavirus +	-
Gayal	394/07	-	OvHV-2 + Macavirus -	-
Hirsch*	21114	Ct 31	OvHV-2 + Macavirus +	-
Prinz-Alfred- Hirsch*	24592	-	OvHV-2 - Macavirus +	Ct 27
Prinz-Alfred- Hirsch*	24594	-	OvHV-2 - Macavirus +	Ct 33
Prinz-Alfred- Hirsch*	3524	Ct 28	OvHV-2 + Macavirus +	-
Prinz-Alfred- Hirsch*	3525	Ct 20	OvHV-2 + Macavirus +	-
Prinz-Alfred- Hirsch*	3526	Ct 28	OvHV-2 + Macavirus +	-
Prinz-Alfred- Hirsch*	3527	-	-	-
Prinz-Alfred- Hirsch*	3528	Ct 21	OvHV-2 + Macavirus +	-
Pudu	3529	-	-	-
Mähnenschaf	24889	-	-	-
Nubischer Steinbock	20882	-	OvHV-2 - Macavirus +	Ct 37
Nubischer Steinbock	20885	Ct 36	OvHV-2 - Macavirus +	Ct 35
Alpensteinbock	40/08	-	OvHV-2 - Macavirus +	Ct 33

Die Probe eines Alpensteinbocks, die sich im Glykoprotein B-Bereich (300 Basenpaare) zu 100 % identisch zu CpHV-2 darstellt, wurde mit einem Ct-Wert von 33 detektiert. Hingegen wurden die Proben von einigen Steinböcken zwar von der CpHV-2-Sonde in relativ späten Zyklen (Ct 35 - 37) erkannt, waren phylogenetisch aber nicht eindeutig dem CpHV-2 zuzuordnen.

Zur Prüfung der Spezifität wurden mittels der CpHV-2-OvHV-2-diskriminierenden Echtzeit PCR das AIHV-1-Isolat WC11 und ein BoHV-4-Isolat untersucht. Beide konnten mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Als wichtige Eigenschaft für die mögliche Nutzung in der Routinediagnostik ist anzumerken, dass Macavirus-DNS bei Tieren, die laut Vorbericht eine BKF-Erkrankung aufwiesen, in allen Fällen eindeutig identifiziert werden konnte.

Nachweis von Macaviren in Proben kleiner Hauswiederkäuer mittels Echtzeit PCR

Interessanterweise konnten bei neun Ziegen (5, 13, 15, 17, 19, 26, 34, 40, 44) Doppelinfektionen mit OvHV-2 und CpHV-2 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9, dunkelgraue Markierung). Für die Ziege 17 konnte eine Doppelinfektion zusätzlich durch Klonierung und Sequenzierung bestätigt werden.

In zehn Fällen bei Proben von Ziegen war das Ergebnis der Echtzeit PCR negativ, obwohl mindestens eines der PAN-Macavirus-PCR-Verfahren positiv ausfiel (weiße Markierung in Tabelle 9). Bei 114 mittels Echtzeit PCR getesteten Proben von kleinen Wiederkäuern entspricht das einem Anteil von 8,8 %. Es ist anzunehmen, dass die diskriminierende Echtzeit PCR bei der Untersuchung von Hauptwirten nicht die gleiche Empfindlichkeit erreicht wie die konventionellen nested PCR-Verfahren.

Bei vier Ziegen traten Ct-Werte von 37-39 auf, obwohl sie mit konventionellen Methoden negativ getestet wurden. Hierbei handelt es sich um Ct-Werte, die nicht mehr als positives Ergebnis beurteilt werden sollten.

Im Vergleich zu den Proben der Wildwiederkäuer liegen die Ct-Werte insgesamt etwas höher. Vergleicht man die Werte der an BKF-erkrankten Tiere (Ct-Werte zwischen 20 und 33) mit denen der kleinen Hauswiederkäuer (Ct-Werte zwischen 26 und 40), die als Hauptwirt angesehen werden können, so liegen die durchschnittlichen Werte etwa sieben Ct-Werte auseinander (\emptyset Ct-Wert BKF-erkrankte Tiere 26,33, \emptyset Ct-Wert kleine Wiederkäuer 33,06). Da es bei jedem Zyklus der Echtzeit PCR zu einer Verdopplung der Ziel-DNS kommt, liegt der Faktor etwa bei 128 (2^7). Somit ist bei Tieren, die an BKF erkrankt sind, eine größere Menge Macavirus-spezifischer DNS als bei Hauptwirten nachweisbar.

Die Ergebnisse der Echtzeit PCR von Proben kleiner Wiederkäuer sind in Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 9: Ergebnisse der OvHV-2-CpHV-2-diskriminierenden Echtzeit PCR im Vergleich mit der konventionellen PCR für Proben von kleinen Hauswiederkäuern. N.d. = nicht durchgeführt, positiv = +, negativ = -, in hellgrau – Übereinstimmungen zwischen konventioneller und Echtzeit PCR, in dunkelgrau – Ziegen mit Doppelinfektion mit OvHV-2 und CpHV-2

Tierart	Bezeichnung	OvHV-2 Echtzeit	Konventionelle PCR	CpHV-2 Echtzeit
Schaf	48	ct 34	OvHV-2 + Macavirus +	-
Schaf	49	ct 35	OvHV-2 + Macavirus -	-
Schaf	50	ct 33	OvHV-2 + Macavirus -	-
Schaf	OM 83	-	-	-
Schaf	OM 84	-	-	-
Schaf	OM 86	-	-	-
Schaf	OM 89	ct 36	OvHV-2 + Macavirus -	-
Schaf	OM 92	ct 35	OvHV-2 + Macavirus +	-
Ziege	MT01	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 37
Ziege	MT02	-	-	-
Ziege	MT03	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 37
Ziege	MT04	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 31
Ziege	MT05	-	-	ct 39
Ziege	MT05	-	-	-
Ziege	MT05	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 33
Ziege	MT08	-	-	-
Ziege	MT09	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 34
Ziege	MT10	-	-	ct 37
Ziege	MT11	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 28
Ziege	MT12	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 33
Ziege	MT13	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 39
Ziege	MT14	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 34
Ziege	MT15	-	-	-
Ziege	ZG03	-	-	-
Ziege	ZG05	-	OvHV-2 - Macavirus +	-
Ziege	ZG07	-	OvHV-2 - Macavirus +	-
Ziege	ZG10	-	OvHV-2 - Macavirus +	-
Ziege	ZG11	-	-	-
Ziege	ZG13	-	OvHV-2 - Macavirus +	-
Ziege	ZG14	-	-	-
Ziege	ZG15	-	-	-
Ziege	ZG17	-	OvHV-2 - Macavirus +	-
Ziege	ZG18	-	-	-
Ziege	ZG20	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 40
Ziege	ZG28	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 37
Ziege	ZG29	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 37
Ziege	ZG33	-	-	-
Ziege	ZG34	-	-	-
Ziege	1	ct 32	OvHV-2 + Macavirus +	ct 39
Ziege	2	-	-	-

Ergebnisse

Tierart	Bezeichnung	OvHV-2 Echtzeit	Konventionelle PCR	CpHV-2 Echtzeit
Ziege	3	-	-	-
Ziege	4	-	-	-
Ziege	Eva 4	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 33
Ziege	5	ct 33	OvHV-2 + Macavirus +	ct 34
Ziege	6	-	OvHV-2 + Macavirus +	ct 26
Ziege	7	-	-	-
Ziege	8	ct 36	OvHV-2 + Macavirus +	-
Ziege	9	-	-	-
Ziege	10	-	-	-
Ziege	11	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 30
Ziege	12	-	-	-
Ziege	13	ct 31	OvHV-2 + Macavirus +	ct 34
Ziege	14	-	-	-
Ziege	15	ct 31	OvHV-2 + Macavirus +	ct 33
Ziege	16	-	-	-
Ziege	17	ct 32	OvHV-2 + Macavirus +	ct 29
Ziege	18	-	-	-
Ziege	19	ct 34	OvHV-2 + Macavirus +	ct 32
Ziege	20	-	-	-
Ziege	21	-	OvHV-2 - Macavirus +	-
Ziege	22	-	-	-
Ziege	23	-	OvHV-2 + Macavirus +	ct 37
Ziege	24	-	-	-
Ziege	25	-	-	-
Ziege	26	ct 30	OvHV-2 + Macavirus +	ct 35
Ziege	27	-	-	-
Ziege	28	-	-	ct38
Ziege	29	-	-	-
Ziege	30	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 32
Ziege	31	-	-	-
Ziege	32	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 30
Ziege	33	-	-	-
Ziege	34	ct 30	OvHV-2 + Macavirus +	ct 28
Ziege	35	-	-	-
Ziege	36	ct 34	OvHV-2 + Macavirus -	-
Ziege	37	-	-	ct 39
Ziege	38	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 30
Ziege	39	-	-	-
Ziege	40	ct 32	OvHV-2 + Macavirus +	ct 31
Ziege	41	-	-	-
Ziege	42	-	-	-
Ziege	43	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 32
Ziege	44	ct 31	OvHV-2 + Macavirus +	ct 26
Ziege	45	-	-	ct 38

Ergebnisse

Tierart	Bezeichnung	OvHV-2 Echtzeit	Konventionelle PCR	CpHV-2 Echtzeit
Ziege	46	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 35
Ziege	47	-	-	-
Ziege	3555	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 31
Ziege	8702	-	n.d.	-
Ziege	8705	-	n.d.	-
Ziege	8708	-	n.d.	ct 27
Ziege	8711	-	n.d.	-
Ziege	8714	-	n.d.	-
Ziege	8717	-	n.d.	-
Ziege	21121	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 35
Ziege	21377	-	n.d.	ct 38
Ziege	21381	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 36
Ziege	21383	-	n.d.	ct 30
Ziege	21390	-	n.d.	ct 35
Ziege	21392	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 34
Ziege	21420	-	n.d.	ct 35
Ziege	21421	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 37
Ziege	21426	-	n.d.	ct 36
Ziege	21440	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 37
Ziege	21447	-	n.d.	ct 35
Ziege	21449	-	n.d.	ct 35
Ziege	21461	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 36
Ziege	21462	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 36
Ziege	21464	-	n.d.	ct 29
Ziege	21468	-	n.d.	ct 31
Ziege	21469	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 26
Ziege	21473	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 31
Ziege	21474	-	OvHV-2 - Macavirus +	ct 35
Ziege	21476	-	n.d.	-
Ziege	24890	-	OvHV-2 + Macavirus +	-

ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Macaviren

In einigen Fällen war bei Wildtieren nur Serum als Untersuchungsmaterial vorhanden, zum Teil von bereits verstorbenen Patienten. Um in diesen Fällen ebenfalls eine BKF-Diagnostik durchzuführen wurde ein ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Macaviren am Institut etabliert. Der Kompetitions-ELISA von VMRD, USA, wurde über die Firma LDL Leipzig bezogen. Dieser Test bietet sich auch zum Herdenscreening oder zur Überwachung eines Macavirus-freien Bestands von Ziegen und Schafen an.

Ergebnisse

Alle durchgeführten ELISAs entsprachen den folgenden Validierungskriterien des Herstellers: OD-Mittelwert der Negativkontrollen größer als 0,4 und kleiner als 2,1; OD-Mittelwert der Positivkontrollen weniger als 75 % des OD-Mittelwertes der Negativkontrollen. Die Bewertung erfolgte ausschließlich qualitativ. Ein Wert, der mehr als 25 % Inhibition entspricht, zeigt ein positives Ergebnis an, ein Wert unter 25 % Inhibition ein negatives.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse des ELISAs für Proben von Wildtieren, in Tabelle 11 und Tabelle 12 für die der kleinen Wiederkäuer dargestellt. Ein Vergleich der Resultate mit denen der unterschiedlichen PCR-Verfahren kann nur bedingt durchgeführt werden, da es sich beim ELISA um den Nachweis von Antikörpern, bei der PCR um den Nachweis von Macavirus-DNS handelt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Proben von Wildtieren im ELISA im Vergleich zu mindestens einem durchgeführten Macavirus-PCR-Verfahren. N.D. = nicht durchgeführt, da kein geeignetes Untersuchungsmaterial für PCR vorhanden war. Tiere, bei denen BKF als Verdachtsdiagnose geäußert wurde, sind gekennzeichnet *.

Tierart	ID	ELISA	PCR
Bison	20569	-	N.D.
Bison	20570	-	N.D.
Bison	20571	-	N.D.
Bison	20572	-	N.D.
Bison	20573	-	N.D.
Bison	20574	-	N.D.
Bison	20575	-	N.D.
Bison	20576	-	N.D.
Gnu	2919	-	-
Mähnspringer	20027	+	-
Mähnspringer	20030	+	-
Mähnspringer	20033	+	-
Mufflon*	Debo	-	N.D.
Mufflon	10252	+	+
Mufflon	10246	+	+
Mufflon	10250	+	+
Mufflon	10248	+	+
Prinz-Alfred-Hirsch	N97	-	N.D.
Prinz-Alfred-Hirsch	N140	-	N.D.
Prinz-Alfred-Hirsch	N145	-	N.D.
Prinz-Alfred-Hirsch	Lilly	-	N.D.
Prinz-Alfred-Hirsch	N156	-	N.D.
Prinz-Alfred-Hirsch	N158	-	N.D.
Prinz-Alfred-Hirsch*	Lisay	+	N.D.
Prinz-Alfred-Hirsch*	llongo	+	+
Prinz-Alfred-Hirsch*	24592	+	+
Pudu*	20036	-	-

Ergebnisse

Tierart	ID	ELISA	PCR
Pudu*	20039	-	-
Pudu*	15329	+	-
Rentier*	21481	-	-
Rentier*	21482	-	-
Rentier*	21483	-	-
Sitatunga-Antilope*	5999	-	-
Sitatunga-Antilope*	6003	-	-
Steinbock	15328	+	+
Steinbock	15327	+	+
Steinbock	19053	+	-
Steinbock	19050	+	-
Steinbock	13831	+	+
Steinbock	13829	+	+
Vikunja	16711	-	-
Vikunja	16709	-	-
Wasserbüffel	13926	-	-
Zwergzebu	22513	-	N D
Zwergzebu	22514	-	N D
Zwergzebu	22516	-	N D
Zwergzebu	22515	+	N D

Von 47 untersuchten Wildtierproben waren mittels ELISA insgesamt 29 negativ und 18 positiv. Bei den im ELISA positiven Tieren konnte nicht immer ein positives Ergebnis in der PCR erzielt werden. Hierunter fallen die Proben von drei Mährenspringern, zwei Steinböcken und einem Pudu. Bei einer positiven Probe eines Hirsches war nur Serum vorhanden, das für die PCR kein geeignetes Untersuchungsmaterial darstellt. Positive PCR-Ergebnisse bei Proben von Wildtieren korrelierten immer mit positiven ELISA-Ergebnissen.

Tabelle 11: Ergebnisse mit Proben von Ziegen im ELISA im Vergleich mit mindestens einem durchgeführten Macavirus-PCR-Verfahren. N.D. = nicht durchgeführt, da kein geeignetes Untersuchungsmaterial für PCR vorhanden war

Ziegen	Positiv ELISA	Negativ ELISA
Positiv PCR	29	0
Negativ PCR	21	9
N. D.	20	11

Tabelle 12: Ergebnisse mit Proben von Schafen im ELISA im Vergleich mit mindestens einem durchgeführten Macavirus-PCR-Verfahren. N.D. = nicht durchgeführt, da kein geeignetes Untersuchungsmaterial für PCR vorhanden war

Schafe	Positiv ELISA	Negativ ELISA
Positiv PCR	3	0
Negativ PCR	0	0
N. D.	5	7

Ergebnisse

Bei den Ziegen und Schafen stellt sich der Vergleich der unterschiedlichen Macavirus-PCR-Verfahren und ELISA-Ergebnisse heterogen dar. Bei einem solchen Vergleich wäre eine Unterscheidung von Haupt- und Indikatorwirten sinnvoll.

Serumneutralisationstest

Der Serumneutralisationstest wurde im Vergleich zum ELISA mit Serumproben von 47 Ziegen, drei Schafen und neun Prinz-Alfred-Hirschen durchgeführt. Als Testvirus wurde AIHV-1, Stamm WC11 genutzt. Das Ergebnis wurde nach acht Tagen mikroskopisch anhand des zpE (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18, MDBK-Zellen, zpE durch AIHV-1) beurteilt.

Die Titerangaben erfolgten in $\log_{10}ND_{50}$ (nach Spaerman und Kärber) und sind in Tabelle 13 dargestellt. Alle SNT-AK-Titer größer als 0,24 wurden als positiv beurteilt. Bei einigen Seren waren die niedrigen Verdünnungsstufen aufgrund toxischer Effekte nicht auswertbar und wurden als Titer \leq angegeben.

Im Serumneutralisationstest zeigten viele Seren, die mittels ELISA als Antikörperpositiv bewertet wurden, ein negatives Ergebnis. Die AK-Titer im SNT erschienen außerdem eher niedrig, höchster Wert war 1,43 $\log_{10}ND_{50}$. Da es sich um Tiere eines Bestands handelte, in dem nachweislich mehrere Hirsche an BKF erkrankt waren, erwiesen sich die ELISA-Resultate schlüssiger als die des SNTs.

Aufgrund unbefriedigender Ergebnisse im Vergleich zum BKF-AK-ELISA wurden einige Seren mehrfach im Serumneutralisationstest eingesetzt. Modifikationen des Tests wie längere Inkubationszeit (Serum mit Virusgebrauchsverdünnung eine, bzw. vier Stunden vor der Zugabe der Zellsuspension) und Zugabe von Meerschweinchen-Komplement führten nicht zu mit dem ELISA vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). In Tabelle 13 werden die Resultate von ELISA und Serumneutralisationstest gegenübergestellt.

Ergebnisse

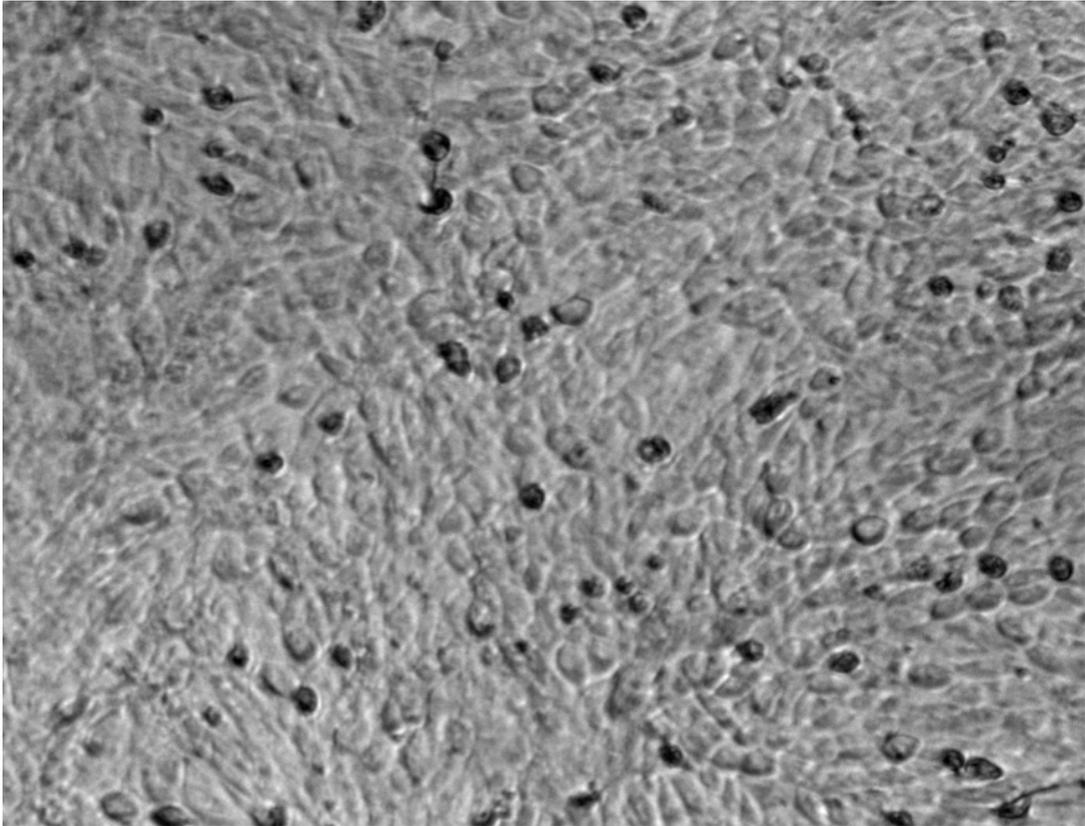


Abbildung 17: Nicht infizierte MDBK-Zellen, Vergrößerung 20x

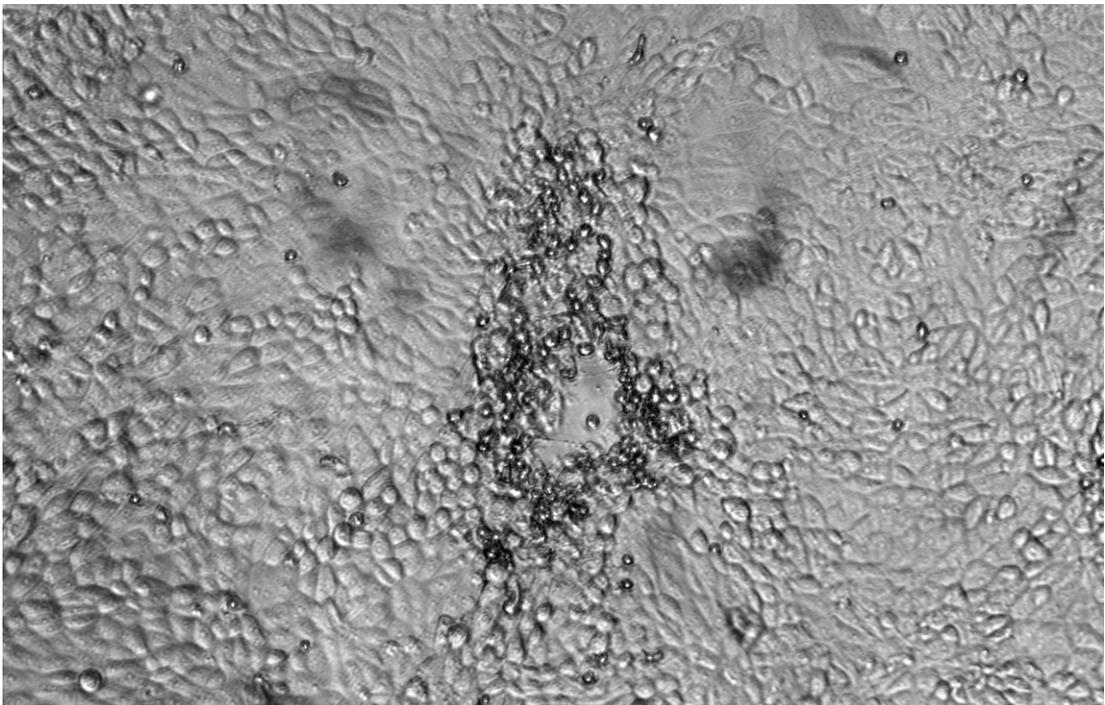


Abbildung 18: Zytopathischer Effekt von AIHV-1 auf MDBK-Zellen, Vergrößerung 10x

Ergebnisse

Tabelle 13: Titer im SNT im Vergleich zum ELISA-Ergebnis (>25 % Inhibition entspricht einem positiven Ergebnis). Positive Ergebnisse erscheinen fettgedruckt

ID-Tierart	Titer SNT log ₁₀ ND ₅₀	SNT	ELISA	ELISA % Inhibition
1-Ziege	0,24	-	+	87,24
2-Ziege	0,24	-	-	24,09
3-Ziege	0,24	-	+	54,98
4-Ziege	<=1,19	?	+	45,6
5-Ziege	0,24	-	+	75,21
6-Ziege	0,24	-	+	86,6
7-Ziege	0,24	-	+	44,59
8-Ziege	1,43	+	+	89,52
9-Ziege	0,24	-	+	74,03
10-Ziege	0,24	-	+	65,83
11-Ziege	0,24	-	+	89,7
12-Ziege	0,24	-	+	72,66
13-Ziege	0,24	-	+	82,78
14-Ziege	0,24	-	+	62,27
15-Ziege	0,48	+	+	85,78
16-Ziege	0,24	-	+	84,05
17-Ziege	0,24	-	+	70,29
18-Ziege	0,24	-	+	64,73
19-Ziege	0,24	-	+	80,68
20-Ziege	0,95	+	+	88,06
21-Ziege	<=0,48	?	+	89,52
22-Ziege	0,24	-	+	83,69
23-Ziege	0,24	-	+	87,7
24-Ziege	0,24	-	+	49,7
25-Ziege	0,24	-	-	7,59
26-Ziege	0,24	-	+	84,14
27-Ziege	1,19	+	+	92,51
28-Ziege	0,24	-	+	89,95
29-Ziege	0,24	-	+	76,79
30-Ziege	0,95	+	+	88,56
31-Ziege	0,48	+	-	22,35
32-Ziege	0,24	-	+	91,44
33-Ziege	0,24	-	+	47,17
34-Ziege	0,24	-	+	90,27
35-Ziege	0,48	+	+	86,84
36-Ziege	0,24	-	+	92,83
37-Ziege	0,24	-	+	67,59
38-Ziege	0,48	+	+	91,55
39-Ziege	0,72	+	+	48,34
40-Ziege	0,72	+	+	93,05
42-Ziege	0,24	-	+	92,62
43-Ziege	0,48	+	+	91,23
44-Ziege	0,72	-	+	78,93
45-Ziege	0,24	-	+	77,86
46-Ziege	0,24	-	+	91,02

Ergebnisse

ID-Tierart	Titer SNT $\log_{10}ND_{50}$	SNT	ELISA	ELISA % Inhibition
47-Ziege	0,24	-	+	79,79
48-Schaf	$\leq 1,67$?	+	84,6
49-Schaf	$\leq 0,72$?	+	86,74
50-Schaf	$\leq 0,72$?	+	89,63
Lilly-Hirsch	0,24	-	-	0,43
Lisa-Hirsch	1,43	+	+	92,51
N140-Hirsch	0,24	-	-	-6,2
N145-Hirsch	0,24	-	-	-3,53
N97-Hirsch	0,24	-	-	-6,63
Lisay-Hirsch	0,95	+	+	88,45
N158-Hirsch	0,24	-	-	1,71
N156-Hirsch	0,24	-	-	1,07
Ilongo-Hirsch	0,24	-	+	90,48

Abbildung 19 zeigt einen grafischen Vergleich der Ergebnisse des BKF-AK-ELISAs mit denen des SNTs. Der cut-off liegt beim ELISA bei 25 % Inhibition, beim SNT bei $0,24 \log_{10}ND_{50}$. Übereinstimmend positive Resultate finden sich rechts und oberhalb der roten Linie, übereinstimmend negative Resultate links und unterhalb der roten Linie. Ein Tier (Ziege 31) wurde mittels SNT positiv und mittels ELISA negativ eingestuft (links und oberhalb der roten Linie). Hingegen befinden sich Proben von insgesamt 33 Tieren rechts unterhalb der roten Linie, bei denen zwar Antikörper im ELISA, nicht jedoch im SNT nachweisbar waren.

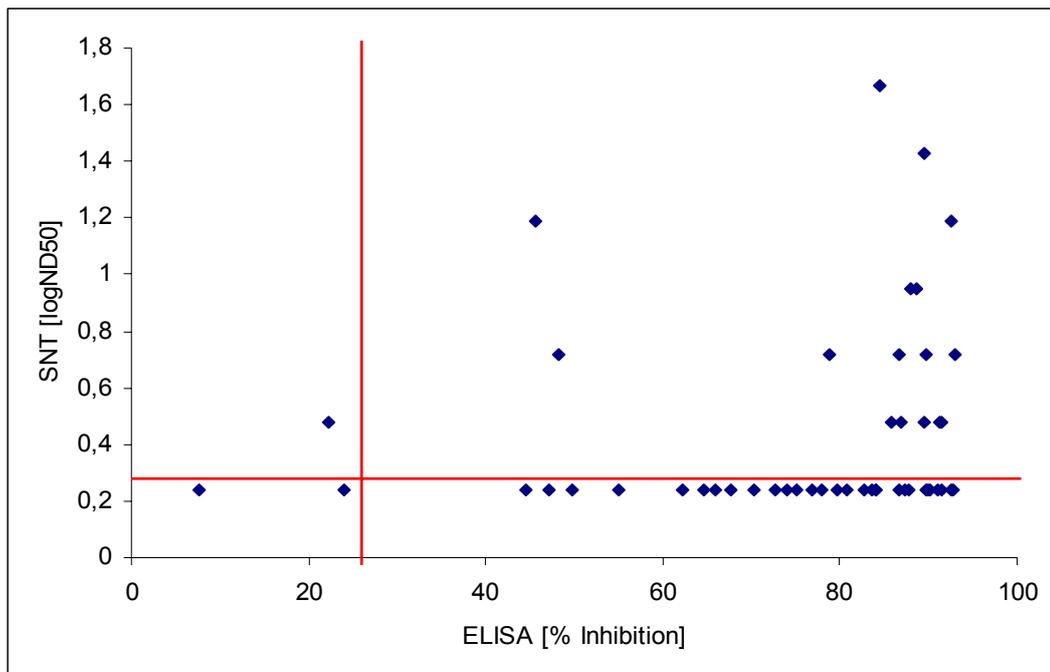


Abbildung 19: Grafisch dargestellter Vergleich der ELISA- und SNT-Ergebnisse mit jeweiligem cut-off bei $0,24 \log_{10}ND_{50}$ und 25 % Inhibition

Ergebnisse

Prävalenz von OvHV-2 und CpHV-2 bei Schafen und Ziegen

Die Ergebnisse der Serologie mittels ELISA und des Virusgenomnachweises mittels unterschiedlicher PCR-Verfahren werden hier zusammenfassend vorgestellt, um einen Einblick über die Verbreitung von Macavirus-Infektionen bei kleinen Wiederkäuern in Deutschland zu erhalten. Die jeweiligen Einzelergebnisse sind im Anhang aufgeführt.

Von den insgesamt 58 untersuchten Schafen wurden 31 mit mindestens einer Untersuchungsmethode als positiv für OvHV-2 bzw. Macavirus-Antikörper beurteilt; dies entspricht 53 %. Bei keinem der getesteten Tiere war CpHV-2 nachweisbar.

148 der 230 untersuchten Ziegenproben zeigten in mindestens einem Verfahren (PCR oder Antikörperbestimmung) ein positives Resultat; dies entspricht 64 %. Hierbei handelte es sich sowohl um Einzelinfektionen entweder mit CpHV-2 oder mit OvHV-2; es konnten allerdings auch Doppelinfektionen beobachtet werden.

Bösartiges Katarrhalfieber bei Hauptwirten

Ziegen mit mutmaßlicher BKF-Erkrankung

Insgesamt wurden während des Untersuchungszeitraums Proben von fünf Ziegen mit klinischem Verdacht auf eine BKF-Erkrankung eingesandt. Die Ziegen zeigten Symptome wie Fieber, Hornhauttrübungen, zentralnervöse Störungen, Durchfall, Pleozytose im Liquor und Festliegen. Vier Ziegen wiesen auch in der pathologisch-histologischen Untersuchung typische Anzeichen einer BKF-Erkrankung wie Meningitis, multifokale grauweiße Herde in Leber und Niere, Lymphknotenvergrößerung, ulzerative Ösophagitis (Abbildung 20) und lymphohistiozytäre Vaskulitis (Abbildung 21) in mehreren Organen auf. Ein Tier wurde nicht obduziert. In allen Proben der fünf Tiere (EDTA-Blut und verschiedene Organe) konnte OvHV-2-DNS mit den unterschiedlichen PCR-Verfahren nachgewiesen werden. Die Amplifikate wurden kloniert und sequenziert und erscheinen in den phylogenetischen Stammbäumen unter den Kennzeichnungen 25058, 25550, 25551, 12357 und Ziege 9364 (siehe Abbildung 28,

Abbildung 29, Abbildung 30). In einigen Fällen wurde vorberichtlich der Kontakt zu Schafen erwähnt; im Fall der Ziege 9364 trat im Nachbarbestand eine BKF-Erkrankung bei einem Rind auf.

Ergebnisse



Abbildung 20: Ulzerative Ösophagitis bei einer Ziege mit BKF-Verdacht. Foto mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Veterinärpathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

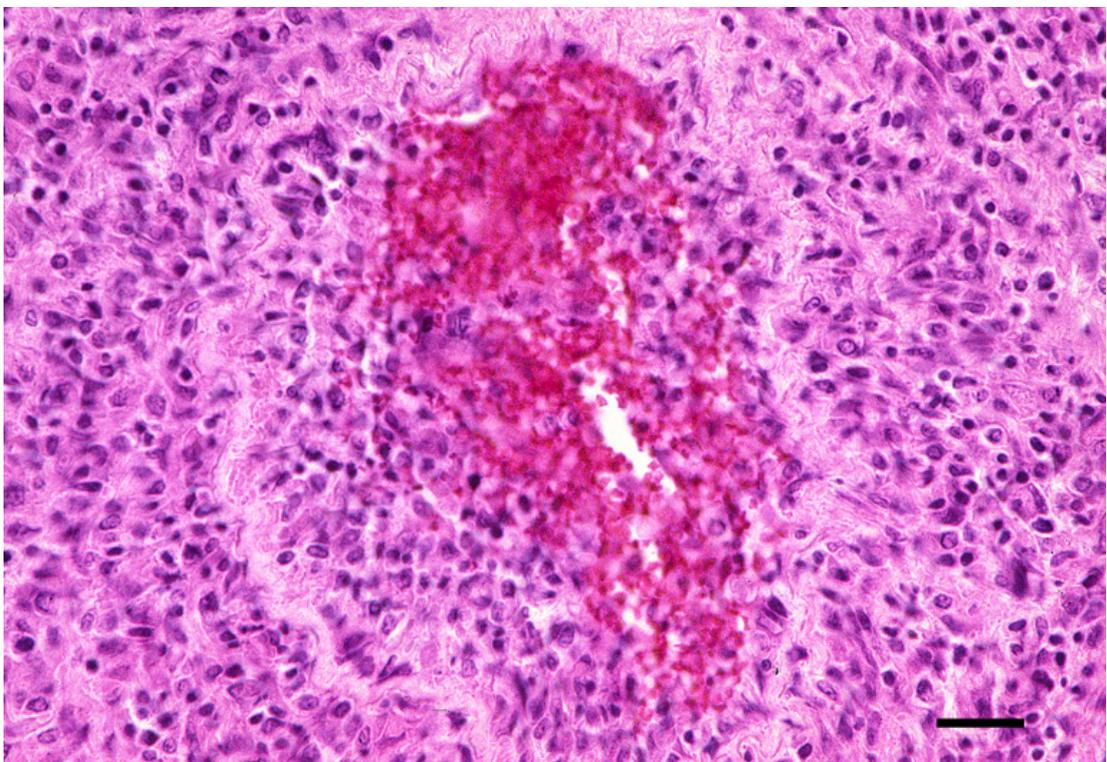


Abbildung 21: Vaskulitis in der Milz einer Ziege mit BKF-Verdacht; 40fache Vergrößerung. Foto mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Veterinärpathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

BKF durch CpHV-2

BKF durch CpHV-2 bei Wildtieren

Drei CpHV-2-positive Prinz-Alfred-Hirsche zeigten unterschiedliche Symptome. Bei dem Hirsch „Ilongo“ (Abbildung 22, Abbildung 23) manifestierte sich die Erkrankung in Form von therapieresistenten Hautveränderungen und Kachexie. Diese protrahierte Verlaufsform tritt besonders oft bei Hirschen mit CpHV-2-Infektion auf (Crawford et al., 2002; Keel et al., 2003, Li et al., 2003). Der Zustand wird häufig nicht als BKF erkannt, da eher die Kopf-Augen-Form mit einem Verdacht auf eine BKF-Erkrankung in Verbindung gebracht wird. Bei diesem Tier war nur noch fixiertes, paraffin-eingebettetes Material vorhanden. Nach Nukleinsäureextraktion konnte Macavirus spezifische DNS nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise war bei diesem Tier nicht die Hautprobe, sondern Material aus dem ZNS positiv.



Abbildung 22: Hirsch „Ilongo“ mit therapieresistenten Hautveränderungen; Foto mit freundlicher Genehmigung von J.-O. Heckel, Zoo Landau



Abbildung 23: Hirsch „Ilongo“ mit therapieresistenten Hautveränderungen; Foto mit freundlicher Genehmigung von J.-O. Heckel, Zoo Landau

Ergebnisse

Die beiden anderen Prinz-Alfred-Hirsche erkrankten zeitgleich an Symptomen, die auf die Kopf-Augen-Form bzw. intestinale Form von BKF hinwiesen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Im Rahmen der Sektion zeigten die Hirsche Ulzerationen im Vormagen und Labmagenbereich (siehe Abbildung 26). Alle eingesandten Proben (EDTA-Blut, Tupfer, Organe) führten mittels PAN-Macavirus-PCR und OvHV-2-CpHV-2-diskriminierender Echtzeit PCR zu positiven Ergebnissen.



Abbildung 24: Konjunktivitis bei Hirsch „Lisa“; Foto mit freundlicher Genehmigung von J.-O. Heckel, Zoo Landau

Ergebnisse

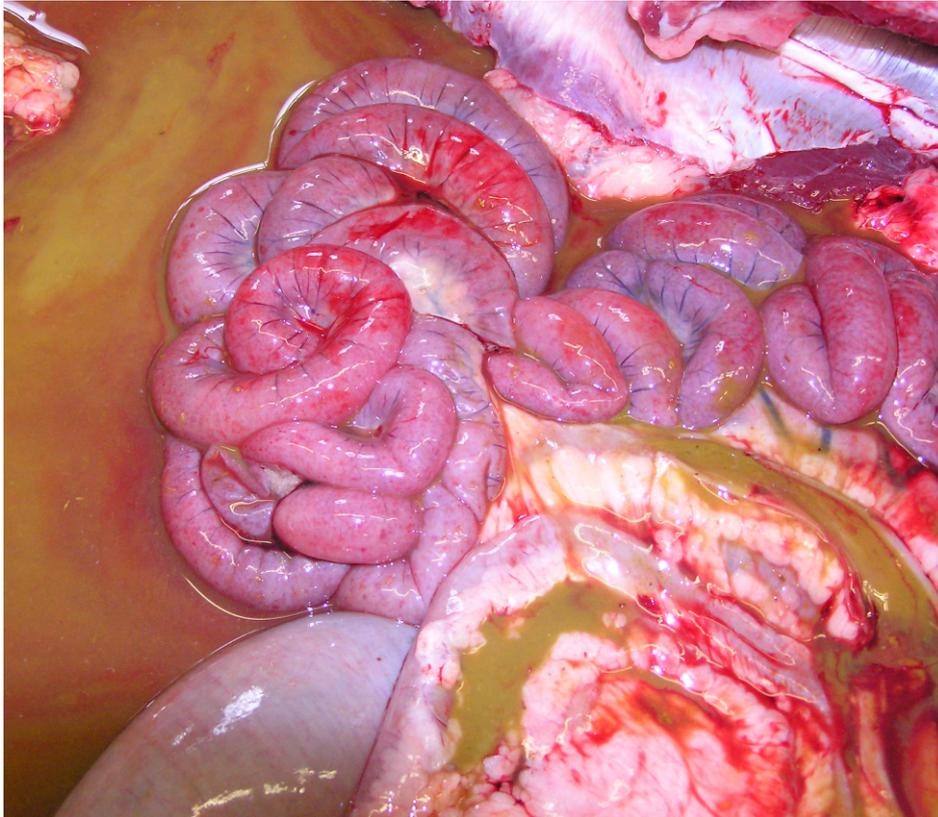


Abbildung 25: Katarrhalische Enteritis bei Hirsch „Gaya“ (nach Sektion); Foto mit freundlicher Genehmigung von J.-O. Heckel, Zoo Landau



Abbildung 26 Netzmagenulcus bei Hirsch „llongo“ (nach Sektion); Foto mit freundlicher Genehmigung von J.-O. Heckel, Zoo Landau

Zur differenzialdiagnostischen Abklärung wurden Proben von beiden Hirschen auf bovine und ovine Zelllinien aufgetragen. Eine Virusanzucht mit Ausbildung eines

Ergebnisse

zytopathischen Effekts konnte dabei nicht beobachtet werden. Zur Abklärung einer Infektion mit nicht zytopathogenen Pestiviren erfolgte anschließend ein Immunfluoreszenztest, der ebenfalls negativ verlief.

Ein weiterer Fall von BKF durch CpHV-2-Infektion wurde bei einem Elch aus einem holländischen Zoo detektiert. Es handelte sich um eine sieben Jahre alte laktierende Elchkuh mit schwerer Dyspnoe, Nystagmus, Inkoordination und zentralnervösen Störungen bis zu einer Hinterhandparese. Proben des Tieres wurden zunächst in einem anderen Institut mit einer OvHV-2-spezifischen PCR getestet und negativ befundet. Durch CpHV-2 verursachtes BKF wurde bislang nur bei verschiedenen Hirschespezies und zwei wildlebenden Elchen in Norwegen beschrieben (Vikoren et al., 2006).

BKF durch CpHV-2 bei zwei Wildrindern

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals CpHV-2 bei einem an BKF erkrankten Rind nachgewiesen werden. Seit langem gilt das südostasiatische Banteng (*Bos javanicus*) als besonders empfänglich für BKF. Die Proben stammten von Tieren aus einem niederländischen Safaripark. Sie wurden dort zusammen mit einigen Schraubenziegen (*Capra falconeri*) gehalten, die vermutlich als Überträger von CpHV-2 fungierten. Nach der pathologisch-histologischen Verdachtsdiagnose BKF konnte der Nachweis eines Macavirus mittels PCR geführt und CpHV-2 durch anschließende Klonierung und Sequenzierung identifiziert werden.

Klonierung und Sequenzierung mit phylogenetischer Analyse

Zur Überprüfung der Amplifikate nach Einsatz unterschiedlicher PCR-Verfahren und für eine phylogenetische Einordnung wurden einige der positiven Proben kloniert und sequenziert. Wenn Proben mehrerer Tiere eines Bestands zum gleichen Entnahmezeitpunkt zu positiven PCR-Ergebnissen führten, wurden repräsentative Stichproben ausgewählt. Insgesamt wurden Amplifikate aus den Bereichen Tegument, Polymerase und Glykoprotein B von 20 Wildtieren, zwei Schafen und 14 Ziegen kloniert und sequenziert. Da für das Tegumentprotein bezogen auf Macaviren nur Sequenzen für OvHV-2 und AIHV-1 in der GenBank zur Verfügung stehen, wurde der Schwerpunkt auf die Bereiche Glykoprotein B und Polymerase gelegt. Um möglichst viele unterschiedliche „Isolate“ vieler Tierarten in den Vergleich einbeziehen zu können, stellte die jeweils kürzeste publizierte Sequenz die Basis für die phylogenetischen Stammbäume dar. Obwohl es sich hier sicher nicht um Isolate im eigentlichen Sinn handelt, wird dieser Begriff im Folgenden für

Ergebnisse

die Virusspezies verwandt, deren DNS im Probenmaterial nachgewiesen werden konnte.

Die herangezogenen Sequenzen von Macaviren aus der GenBank werden mit Zugangsnummern (Accession-numbers=Acc.Nr.) in Tabelle 14 aufgelistet. In der darauffolgenden Tabelle 15 befinden sich die eigenen „Isolate“ mit der jeweiligen GenBank-Zugangsnummer und der Größe des Fragments.

Tabelle 14: Genbank-Zugangsnummern (Accession-numbers=Acc.Nr.)

Spezies, „Stamm“	(Acc.Nr.)	Bereich (Bp)	Herkunft, Wirt
HHV-4 (EBV), P3HR1	X67777	BNRF1-Gen (3957)	Mensch
BLHV, BoHV-6	AF327832	Glykoprotein B (1021)	Rind, PBLC
OvHV-2	AF327833	Glykoprotein B (1056)	Rind, Organe
OvHV-2	AF385439	Glykoprotein B (2592)	Rind, Milz
OvHV-2	AF385441	Glykoprotein B (2592)	Rind, PBLC
OvHV-2	AF385442	Glykoprotein B (2592)	Schaf, PBLC
BLHV, BoHV-6	AY237373	Glykoprotein B (514)	Rind
Ruminant type 2 rhadinovirus	AY237368	Glykoprotein B (514)	Oryx-Antilope
Ruminant type 2 rhadinovirus	AY237367	Glykoprotein B (514)	Ziege
CpHV-2	AY237372	Glykoprotein B (523)	Ziege
Ruminant type 1 rhadinovirus	AY237371	Glykoprotein B (523)	Moschusochse

Ergebnisse

Spezies, „Stamm“	(Acc.Nr.)	Bereich (Bp)	Herkunft, Wirt
WTD-MCFV	AY237370	Glykoprotein B (523)	Weißwedelhirsch
AIHV-1, C500	AF005370	Komplettes Genom (130608)	Gnu
OvHV-2	DQ198083	Komplettes Genom (131621)	Schaf, Nasensekret
OvHV-2, BJ1035	AY839756	Komplettes Genom (135135)	Rind, T-Zellen
EHV-2	U20824	Komplettes Genom (184427)	Pferd
HHV-8	U82242	ORF74 und ORF75 (5077)	Mensch
PIHV-3, bzw. SuHV-5, Isolat 1412	AY170315	u.a. Polymerase (25457)	Schwein
OvHV-2	AF327831	Polymerase (1297)	Infizierte Organe
AIHV-2	AF275942	Polymerase (174)	Unbekannt
Ruminant type 1 rhadinovirus	AY212113	Polymerase (174)	Oryx-Antilope
American Bison Gammaherpes- virus	AY057986	Polymerase (175)	Amerik. Bison
Aoudad MCFV	DQ083952	Polymerase (177)	Mähnenspringer
CpHV-2	AF275941	Polymerase (177)	Ziege
Ruminant type 1 rhadinovirus	AY212111	Polymerase (177)	Moschusochse

Ergebnisse

Spezies, „Stamm“	(Acc.Nr.)	Bereich (Bp)	Herkunft, Wirt
Ruminant type 1 rhadinovirus	AY212112	Polymerase (177)	Nubischer Steinbock
WTD- MCFV	AF181468	Polymerase (177)	Weißwedelhirsch
WTD- MCFV	AF387516	Polymerase (388)	Weißwedelhirsch
OvHV-2	AF031812	Polymerase (483)	Unbekannt
CpHV-2	AF283477	Polymerase und Glykoprotein B (3623)	Ziege, PBLIC

Tabelle 15: Bezeichnung (ID), Tierart, GenBank-Zugangsnummern (Acc.Nr.) der eigenen „Isolate“ in den Spalten Tegument, Glykoprotein B und Polymerase und Größe des jeweils amplifizierten Fragments in Klammern.

ID	Spezies	Tegument (Bp)	Glykoprotein B (Bp)	Polymerase (Bp)
40	Alpensteinbock		HM216450 (300)	HM216469 (564)
8935	Banteng		HQ116813 (300)	HQ116812 (582)
15821	Bison	HM216483 (362)	HM216434 (343)	HM216458 (582)
26961	Bison			HM26961 (443)
20932	Davidshirsch	HM216485 (362)	HM216439 (343)	HM216460 (582)
1183	Elch	HM216480 (362)	HM216430 (300)	HM216455 (582)
22166	Elch		HM216452 (392)	HM216462 (566)
27846	Elch	HM216491 (362)	HM216449 (343)	HM216468 (582)
241	Ellipsen-Wasserbock			HM216473 (230)
394	Gayal	HM216479 (362)		
21114	Hirsch	HM216486 (362)	HM216440 (300)	HM216461 (233)
20882	Nub. Steinbock		HM216438 (300)	HM216459 (233)

Ergebnisse

ID	Spezies	Tegument (Bp)	Glykoprotein B (Bp)	Polymerase (Bp)
24592	Prinz-Alfred-Hirsch		HM216442 (300)	HM216463 (228)
3525	Prinz-Alfred-Hirsch	HM216482 (362)		HM216456 (582)
25034	Reh	HM216487 (362)	HM216443 (300)	HM216464 (170)
19	Sambarhirsch	HM216476 (362)	HM216428 (392)	HM216471 (582)
48	Schaf	HM216478 (206)	HM216429 (300)	
19070	Schaf		HM216435 (300)	
24843	Sikahirsch	HM216489 (362)	HM216447 (343)	HM216466 (582)
24850	Sikahirsch	HM216490 (362)	HM216448 (343)	HM216467 (582)
19944	Timorhirsch	HM216484 (362)	HM216437 (392)	HM216472 (582)
13831	Westkukas. Steinbock		HM216433 (343)	HM216457 (233)
Butz	Ziege		HM216451 (300)	
Eva1	Ziege		HM216425 (300)	
Eva3	Ziege			HM216474 (582)
11	Ziege		HM216426 (300)	
17	Ziege	HM216475 (362)	HM216427 (300)	
26	Ziege	HM216477 (362)		
1090	Ziege		HM216441 (300)	HM216454 (170)
1905KaYe	Ziege	HM216481 (362)	HM216453 (300)	
3553	Ziege		HM216431 (300)	
9364	Ziege	HM216492 (206)	HM216432 (300)	
19416	Ziege		HM216436 (300)	
25058	Ziege	HM216488 (362)	HM216444 (300)	
25550	Ziege		HM216445 (300)	HM216465 (443)

Ergebnisse

ID	Spezies	Tegument (Bp)	Glykoprotein B (Bp)	Polymerase (Bp)
25551	Ziege		HM216446 (300)	

Im Anschluss an die DNS-Präparation wurde das Plasmid mittels Endonuklease-Verdau (Eco RI) überprüft (siehe Abbildung 27). Nach der Sequenzierung wurden jeweils die Nukleinsäuresequenzen von mindestens drei unabhängigen Klonen verglichen und eine Konsensussequenz ermittelt. Diese diente als Grundlage für die phylogenetische Analyse. Dabei wurden die Sequenzen paarweise mit bereits veröffentlichten Sequenzen der GenBank verglichen und der Grad der genetischen Distanz berechnet (Kimura, 1980). Auf dieser Basis konnten phylogenetische Bäume nach dem Neighbor-Joining Verfahren (Saitou und Nei, 1987) erstellt werden.

Die statistische Absicherung erfolgte über eine Bootstrap-Analyse mit 1000 replikativen Datensätzen nach Felsenstein, 1985.

Die phylogenetischen Stammbäume sind in den Abbildungen 28, 29 und 30 gezeigt.

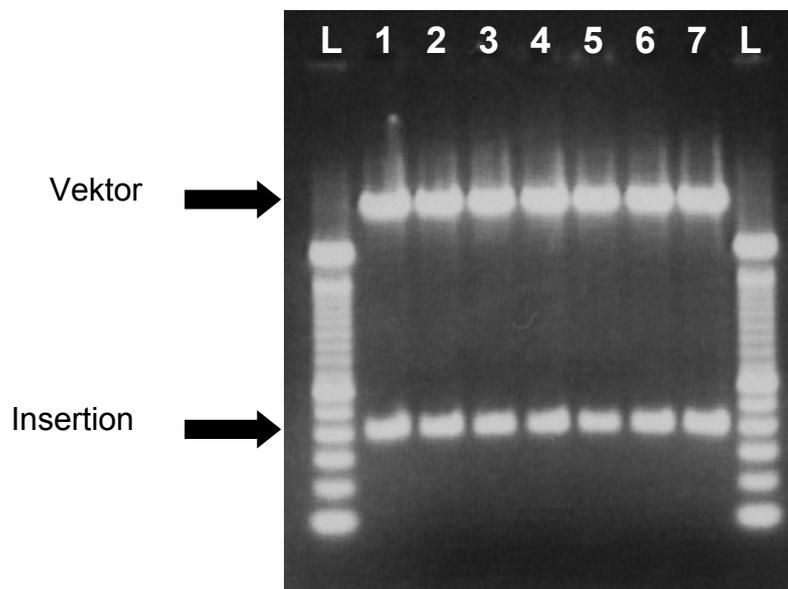


Abbildung 27: Kontrollverdau mit Eco RI, an beiden Seiten 100 Bp-Größenmarker (Ladder=L), obere Bande = Vektor, untere Bande = Insertion korrekter Größe, hier 424 Bp, Glykoprotein B-PCR, 1. Runde

Ergebnisse

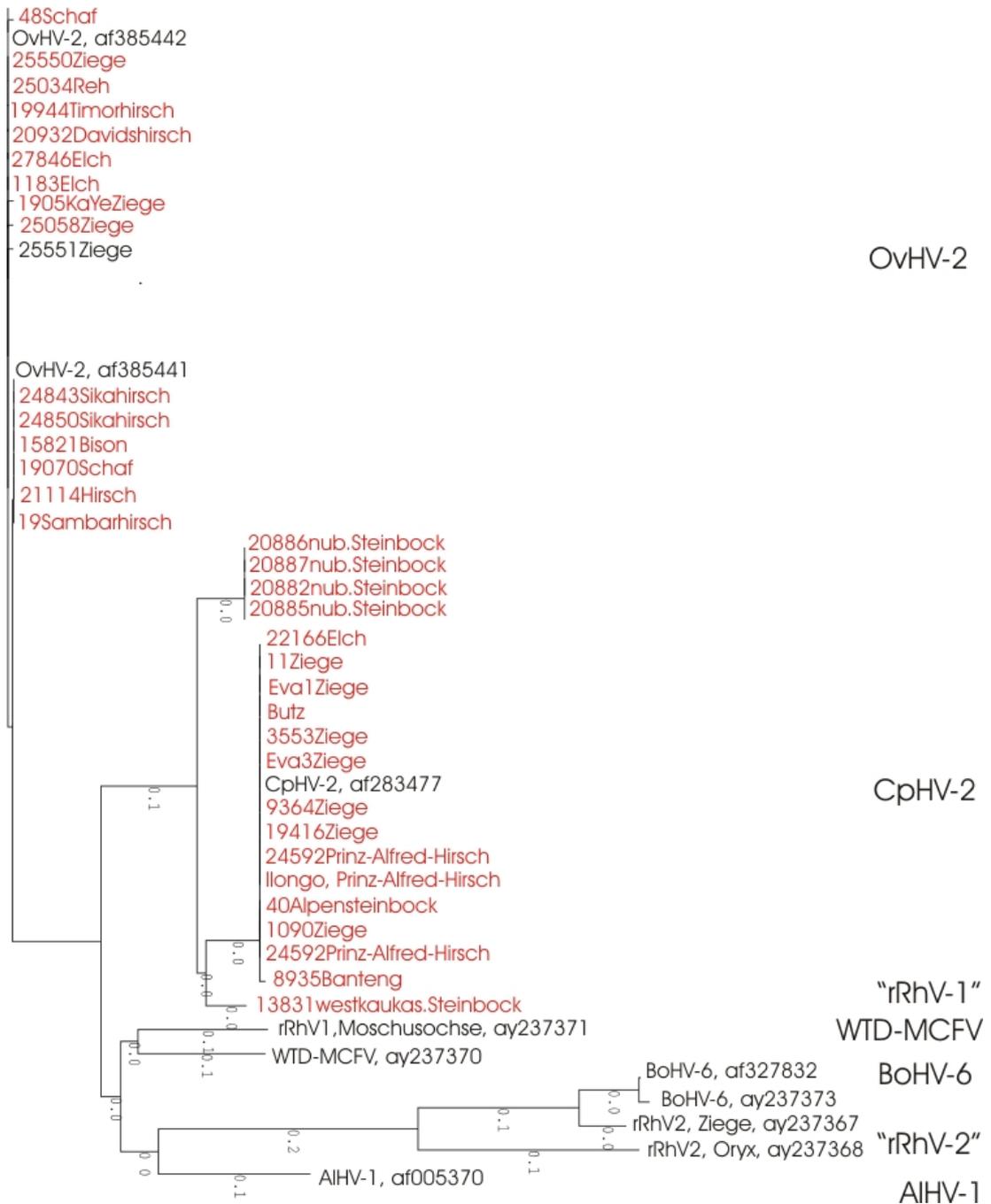


Abbildung 29: Phylogenetischer Stammbaum auf der Basis von 300 Bp aus dem Glykoprotein B-Bereich. Eigene „Isolate“ in roter Schrift dargestellt. Astlängen sind proportional zur genetischen Distanz.

Ergebnisse

Widersprüchliche Ergebnisse bei Proben von einem Gayal (Wasserbüffel, *Bos gaurus frontalis*)

Bei einer Einsendung traten beim Einsatz unterschiedlicher PCR-Verfahren abweichende Ergebnisse auf. Hierbei handelte es sich um Organproben von einem Gayal (Wasserbüffel) aus dem Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin. Das Tier wurde vorberichtlich mit Verdacht auf Paratuberkulose eingeschläfert, und bei der pathologischen Beurteilung fiel eine Vergrößerung der mesenterialen Lymphknoten auf. Die OvHV-2-spezifische Tegument-PCR führte bei allen Organmaterialien (Lunge, Ln. mesenteriales, Ln. retropharyngeales, Milz) zu positiven Ergebnissen (siehe Abbildung 31). Aus sämtlichen Proben konnten bereits in der 1. Runde der PCR Banden nachgewiesen werden. In der parallel durchgeführten PAN-Macavirus-Glykoprotein B-PCR und der PAN-Macavirus-Polymerase-PCR waren die Organe hingegen negativ. Daraufhin wurden diese Proben mit Hilfe der PAN-Herpes-PCR (vanDevanter et al., 1996), der diskriminierenden Echtzeit PCR und einer Primer-Kombination GlyBF1 und OvHV-2GB-R untersucht, um zu testen, ob eine Änderung der Primer für die selben Genombereiche zu einem schlüssigen Resultat führen würde. Weder aus dem Glykoprotein B-Bereich noch aus dem Polymerase-Bereich war es möglich, Macavirus-spezifische DNS nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde zur Bestätigung der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR ein weiteres PCR-Verfahren aus einer dem Tegument benachbarten Region durchgeführt, die ORF73-PCR mit den Primern 75U5 und 22L3 (Coulter und Reid, 2002). Hiermit konnte das positive Ergebnis der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR verifiziert werden. Auch hier waren alle getesteten Proben positiv (siehe Abbildung 32)(AccNr. HM216493, 1219 Bp).

Ergebnisse

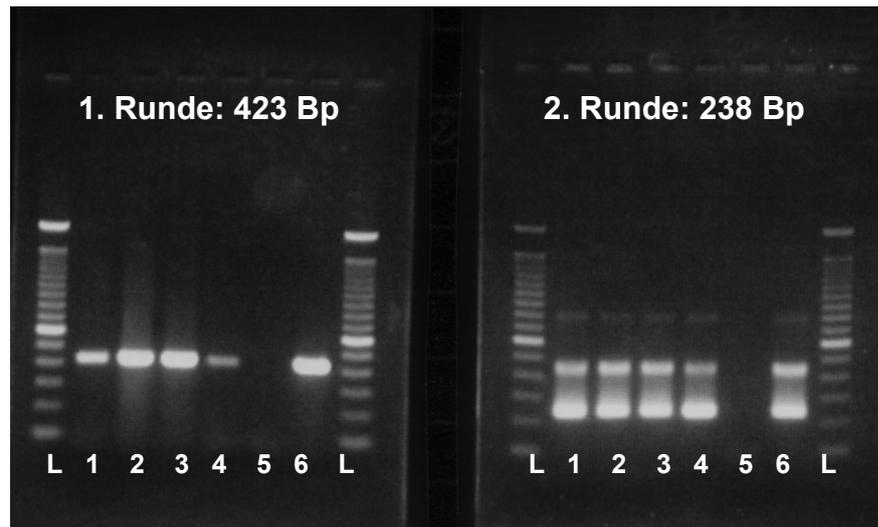


Abbildung 31: OvHV-2-spezifische Tegument-PCR mit Proben von einem Gayal: 1. Lunge, 2. Mesenteriallymphknoten, 3. Retropharyngealer Lymphknoten, 4. Milz, 5. Negativkontrolle, 6. Positivkontrolle ZNS von einem Rind mit schafassoziiertem BKF, L. 100Bp-Leiter

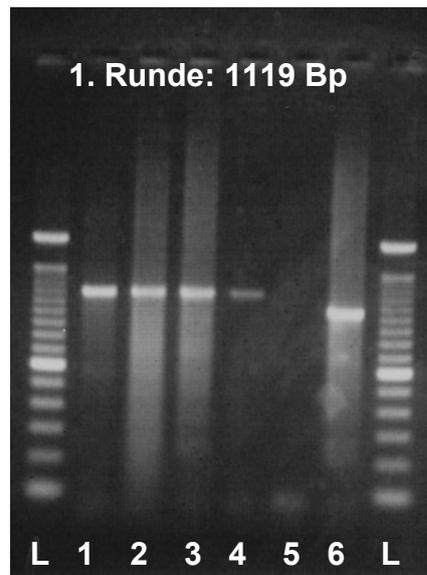


Abbildung 32: ORF73-PCR mit Proben von einem Gayal: 1. Lunge, 2. Mesenteriallymphknoten, 3. Retropharyngealer Lymphknoten, 4. Milz, 5. Negativkontrolle, 6. Positivkontrolle ZNS von einem Rind mit schafassoziiertem BKF, L. 100Bp-Leiter

Abbildung 32 zeigt einen Größenunterschied zwischen den Banden der Proben von einem Gayal und der Bande von der Positivkontrolle (OvHV-2). Eines der Amplifikate der Proben des Gayals wurde kloniert und sequenziert. Durch Vergleiche mit bereits vorhandenen Sequenzen der GenBank auf Nukleotid- und Aminosäureebene wurden große Übereinstimmungen (94 % Ähnlichkeit auf

Ergebnisse

Da CpHV-2 erst seit relativ kurzer Zeit bekannt ist, gibt es wenige Literaturstellen zu diesem Thema. Bisher wurden nur kleine Teile des Virusgenoms veröffentlicht und für viele Länder ist nichts über die Prävalenz bekannt.

Um CpHV-2 zu isolieren, wurden Versuche mit verschiedenen Zelllinien gestartet, nämlich BL-3-Suspensionszellen (bovine Lymphozyten), RK-13-Zellen (rabbit kidney), CUVEC-Zellen (umbilikale Ziegezellen, erhalten vom Institut für Parasitologie der JLU Gießen), BEL-26-Zellen (bovine embryonic lung), MDBK-Zellen (Madin Darby Bovine Kidney), SFT-R-Zellen (sheep fetal thymus) und REB-Zellen (rabbit embryonic brain). Für die Inkubation wurden Suspensionen von gemörserterem ZNS-Material der beiden CpHV-2-positiven Prinz-Alfred-Hirsche in drei verschiedenen Konzentrationen (100 µl, 20 µl, 4 µl in CCM34-Medium) verwendet. Wie zuvor beschrieben (siehe Virusanzucht auf verschiedenen Zelllinien, Material und Methoden), wurden nach einer Inkubationszeit von einer Stunde die Überstände abgenommen und alle Vertiefungen der 24well-Platten mit 1 ml Medium aufgefüllt. Bei der arbeitstäglichen mikroskopischen Beurteilung zeigten sich keine Änderungen der Zellmorphologie im Vergleich zur Negativkontrolle. Das Zellkulturmedium wurde einmal wöchentlich partiell ersetzt. In allen Fällen verliefen PCR-Ansätze mit Kulturüberstand und Zellen negativ. Auch nach einer weiteren Passage ließ sich Virus nicht aus den Organproben anzüchten.

Anzucht von Ziegen-Lymphozyten

Im Gegensatz zur „klassischen“ Virusanzucht in Zellkultur ist es gelungen, mit OvHV-2 infizierte Lymphozyten von BKF-erkrankten Tieren zu kultivieren und diese Zellen über mehrere Passagen zu halten. Dies hat dazu beigetragen, dass inzwischen das komplette Genom von OvHV-2 veröffentlicht wurde. Für viele weitergehende Forschungsarbeiten ist damit ein Grundstein gelegt.

Die Methode zur Anzucht von Lymphozyten wurde bereits 1998 von Schock et al. beschrieben und für diese Arbeit weitgehend übernommen. Als Ausgangsmaterial diente entweder EDTA-Blut oder Lymphknoten von an BKF erkrankten Rindern oder Hirschen (Burrels und Reid, 1991).

Ziel der Lymphozyten-Anzucht sollte sein, CpHV-2 zu vermehren, um genügend Ausgangsmaterial für eine Bestimmung der Gesamtsequenz des CpHV-2-Genoms zu gewinnen. EDTA-Blutproben von Ziegen (ohne BKF-Erkrankung) wurden durch die Klinik für Wiederkäuer und Schweine der JLU Gießen gesammelt. Die Proben wurden parallel für die Lymphozyten-Anzucht und die PCR aufgearbeitet, um möglichst frisches Ausgangsmaterial nutzen zu können. Zunächst stand nur eine

Ergebnisse

OvHV-2-PCR-positive Probe zur Verfügung, die zur Etablierung der Methode herangezogen wurde.

Parallel wurde ein Kultivierungsversuch mit Medium mit und ohne Interleukin-2 in 96well Rundbodenplatten angesetzt (siehe Material und Methoden, Anzucht von Ziegen-Lymphozyten). Die abgenommenen Überstände wurden aufgearbeitet und mittels PCR auf OvHV-2-DNS getestet. Neben den Überständen wurden auch die Lymphozyten regelmäßig getestet. Die Zellen ohne IL-2-Zusatz zeigten in den ersten zehn Tagen keine Unterschiede gegenüber dem Ansatz mit IL-2. Danach starben die Zellen ohne IL-2 allerdings ab, während sich die Zellen mit IL-2 weiter vermehrten. Die Lymphozyten wurden über vier Wochen kultiviert. Zwar zeigten die Zellen mit der Zeit ein besseres Wachstum und mussten häufiger umgesetzt werden, allerdings waren sowohl der Überstand als auch die Zellen in der OvHV-2-spezifischen PCR immer negativ. Das gleiche galt für die Lymphozytenpräparation einer zweiten Ziege, die zunächst schwach CpHV-2-positiv war. Abbildung 34, Abbildung 35 und Abbildung 36 zeigen Aufnahmen der Lymphozyten-Sekundärkulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

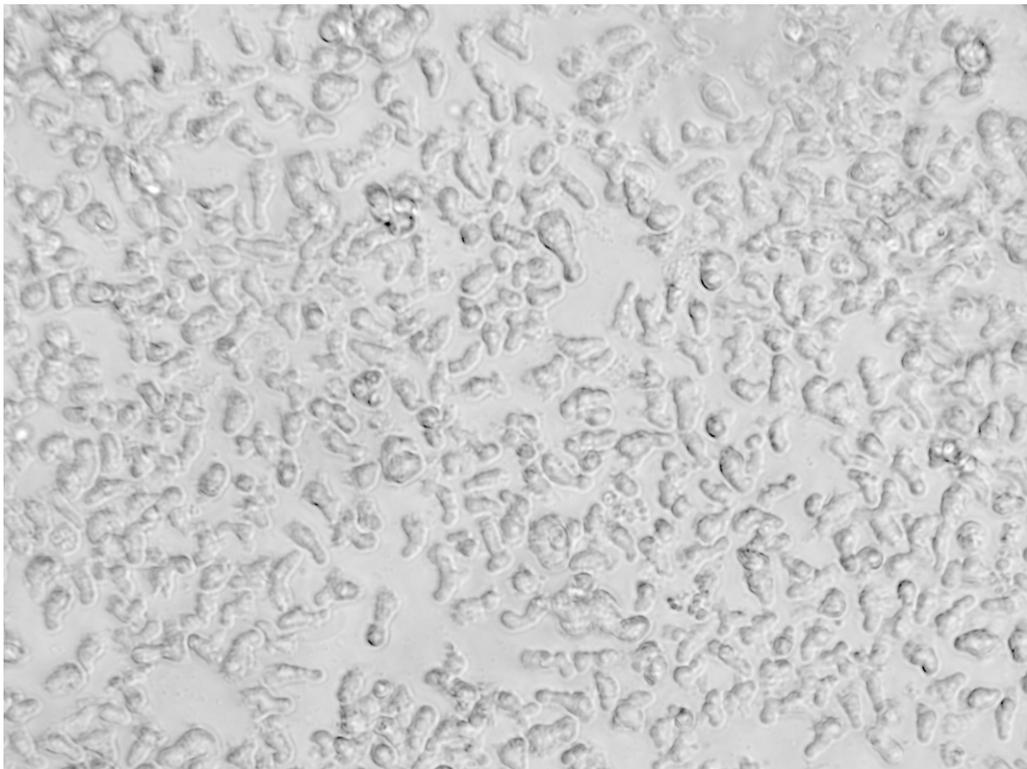


Abbildung 34: Lymphozyten, ~ 60 % konfluent, Vergrößerung 20x

Ergebnisse



Abbildung 35: Lymphozyten konfluent, Vergrößerung 20x

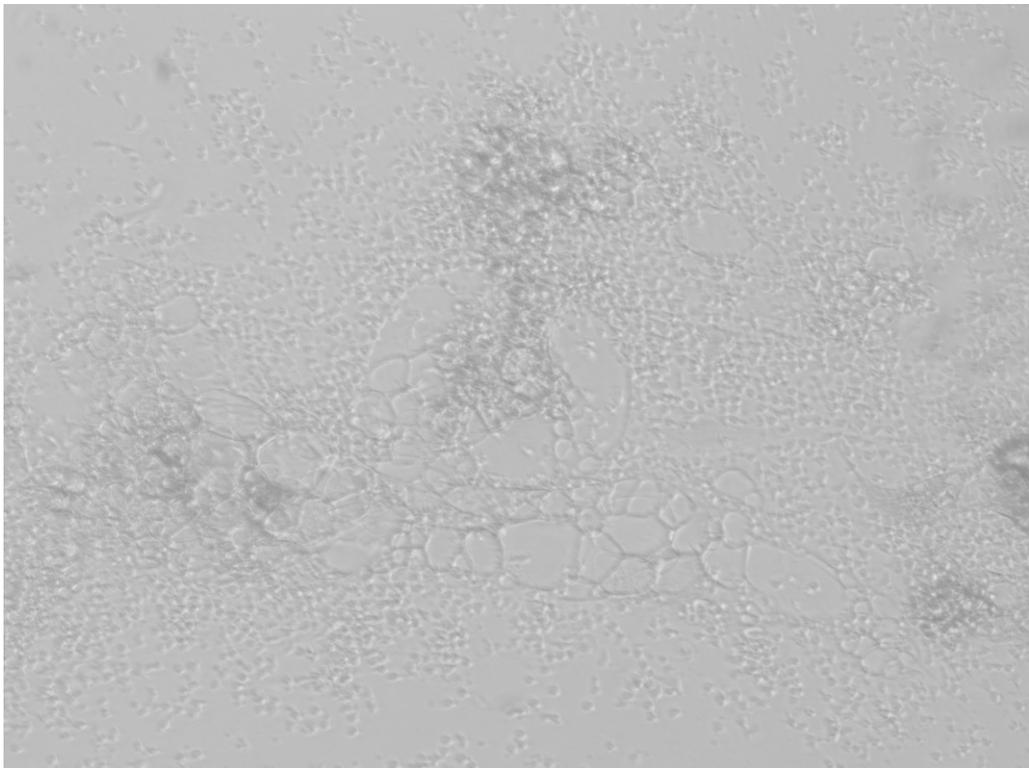


Abbildung 36: Lymphozyten einer anfangs schwach CpHV-2-positiven Ziege mit „Blasenbildung“, Vergrößerung 10x

Ergebnisse

Nach dem Scheitern dieses Ansatzes wurden die vorhandenen Sekundärkulturen mit Material von erkrankten Tieren inkubiert. Eine Organsuspension der beiden vorhandenen ZNS-Proben der an CpHV-2 induziertem BKF erkrankten Prinz-Alfred-Hirsche wurde hergestellt und die Lymphozytenkulturen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen dieser Suspension (100 μ l, 20 μ l und 4 μ l) beimpft (siehe Virusanzucht auf verschiedenen Zelllinien). Die Zellen wurden erneut arbeitstäglich mikroskopisch beurteilt. Dabei traten morphologische Veränderungen auf, die zunächst einen zytopathogenen Effekt (zpE) vermuten ließen, siehe Abbildung 37 und Abbildung 38.

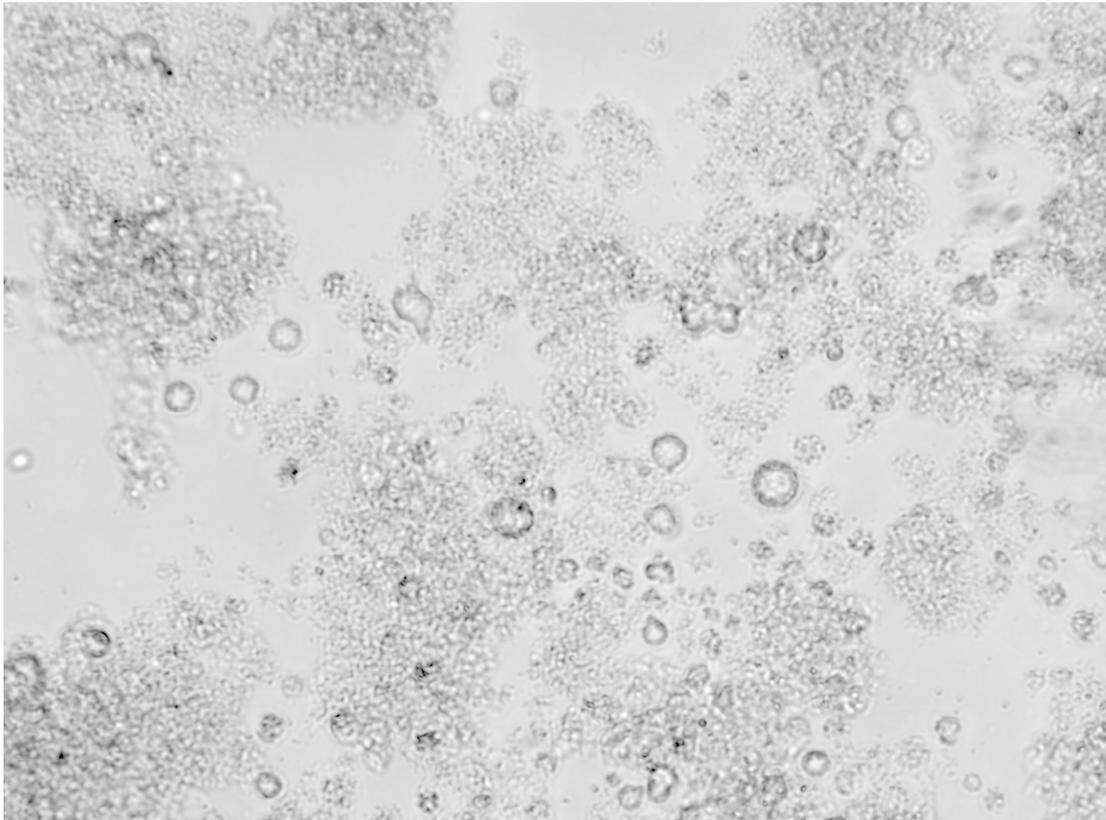


Abbildung 37: Lymphozyten, beimpft mit ZNS-Suspension von Prinz-Alfred-Hirsch 24592, Abrundung der kommaformigen Zellen und „Wolkenbildung“, Vergrößerung 20x

Ergebnisse

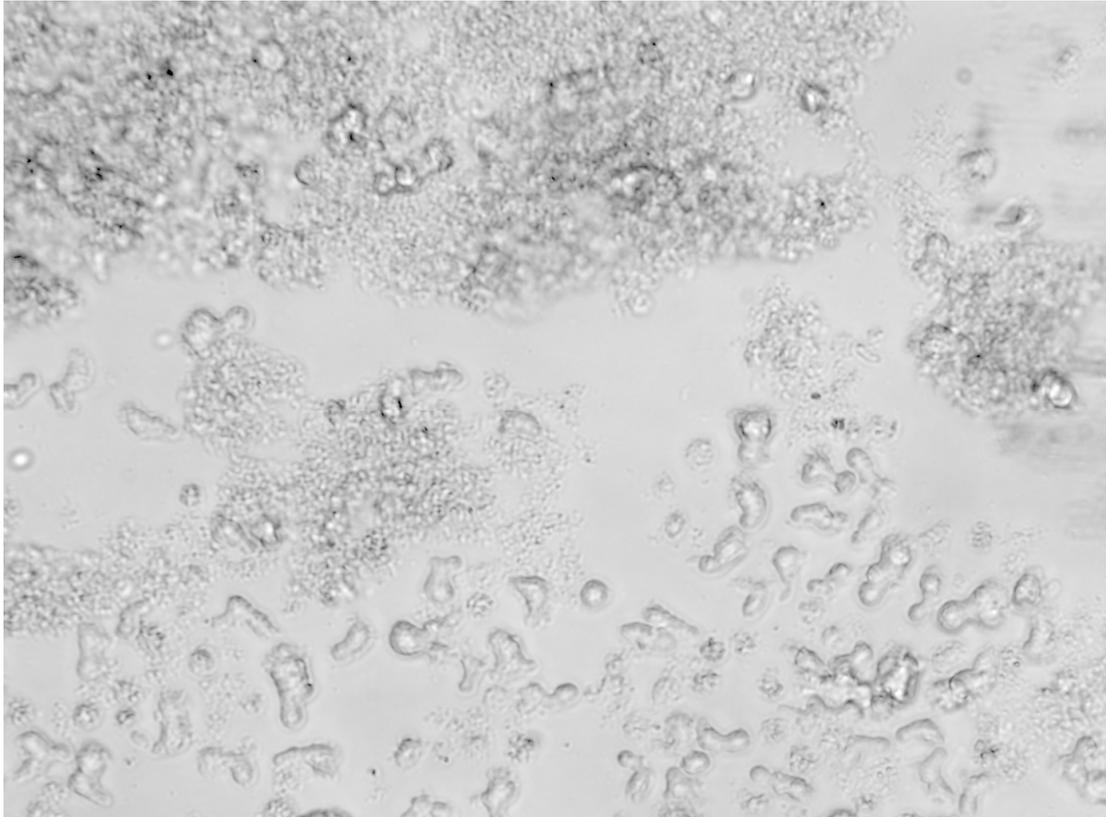


Abbildung 38: Übergang zwischen „gesunden“ Zellen und „Wolkenbildung“, Vergrößerung 20x

Trotz der Veränderungen im Erscheinungsbild waren aufgearbeitete Überstände und Zellpellets in der PAN-Macavirus-Glykoprotein-B-PCR negativ. Wahrscheinlich handelte es sich um toxische Effekte der Organsuspension.

Transfektion

In mehreren Virussystemen kommt es nach Transfektion des viralen Genoms zur Replikation. Dieser Ansatz wurde verwendet, um CpHV-2-DNS nach Transfektion von PT-Zellen zu vermehren und für Folgeuntersuchungen bezüglich Sequenzierung zur Verfügung zu stellen. Für die Transfektion wurde Nukleinsäure aus dem ZNS eines an BKF erkrankten Hirsches (CpHV-2) gewonnen und in PT-Zellen transfiziert (siehe Material und Methoden, Transfektion). Im Rahmen des viermaligen Umsetzens der Zellen wurden jeweils Kulturüberstand und Zellen gewonnen und nach Nukleinsäureaufarbeitung in der Echtzeit PCR (nur mit der CpHV-2-Sonde) eingesetzt. Die Ergebnisse der Echtzeit PCR werden in Tabelle 16 zusammenfassend dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Echtzeit PCR. Beim Ct-Wert wird der gerundete Mittelwert angegeben. Zeitpunkt 1, 2, 3 und 4 entspricht den Tagen des Umsetzens (jeweils nach 3-4 Tagen). Transfektion mit 3 µg, mit 5 µg und mit 10 µg DNS, Transfektion mit 3 µg Plasmid als Positivkontrolle – PK, Negativkontrolle PT-Zellen – NK, Negativkontrolle Echtzeit PCR – NTC, Plasmid, 10⁻⁷ verdünnt – PK-RT

Probe	Ct-Wert Zeitpunkt 1	Ct-Wert Zeitpunkt 2	Ct-Wert Zeitpunkt 3	Ct-Wert Zeitpunkt 4
Überstand (3 µg)	39	39	Nicht detektiert	Nicht detektiert
Zellen (3 µg)	33	35	37	39
Überstand (5 µg)	37	38	Nicht detektiert	Nicht detektiert
Zellen (5 µg)	31	32	35	36
Überstand (10 µg)	38	39	Nicht detektiert	Nicht detektiert
Zellen (10 µg)	31	33	38	38
Überstand PK	19	19	24	25
Zellen PK	13	14	18	20
NK	Nicht detektiert	Nicht detektiert	Nicht detektiert	Nicht detektiert
NTC	Nicht detektiert	Nicht detektiert	Nicht detektiert	Nicht detektiert
PK-RT	28	28	29	29

Die Zellen wurden jeweils nach drei bis vier Tagen mit Erreichen eines konfluenten Zustands umgesetzt. Dies entspricht den Zeitpunkten 1 (erstes Umsetzen), 2 (zweites Umsetzen), usw.. Nach einer photometrischen Bestimmung der DNS-Menge wurden Ansätze mit 3, 5 und 10 µg Gesamt-DNS präpariert. Als Positivkontrolle (PK) wurden die Zellen mit 3 µg CpHV-2-GB-Plasmid-DNS transfiziert und als Negativkontrolle (NK) Zellen ohne DNS nur mit dem Transfektionsansatz behandelt. Außerdem wurden im Rahmen der Echtzeit PCR eine Positivkontrolle (PK-RT) und eine sogenannte *non-template-control* (NTC) mitgeführt. Die Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgt unter Angabe des jeweiligen Ct-Wertes (Cycle treshold) für die Nukleinsäure jeweils aus Zellen und Überstand.

Wie Tabelle 16 zu entnehmen ist, hat eine erfolgreiche Transfektion stattgefunden. Insbesondere das Plasmid, das als Positivkontrolle eingesetzt wurde, zeigt nach Zellpräparation sehr niedrige Ct-Werte. Zwar ist im Vergleich zur Negativkontrolle auch bei den verschiedenen Testansätzen ein messbarer Gehalt viraler

Ergebnisse

Nukleinsäure zu erkennen, jedoch kein „herausragender“ Erfolg. Leider konnte dieser Versuch der Transfektion nicht als effiziente Vermehrungsmethode für das CpHV-2 genutzt werden. Ein Problem bei der Transfektion mit Gesamt-DNS stellt wahrscheinlich die Größe des Genoms von CpHV-2 dar. Außerdem konnte keine Reinigung von viraler DNS durchgeführt werden.

Die Tabelle erlaubt zwei Schlussfolgerungen: Zum einen führte die Präparation von Zellen zu höheren Werten viraler DNS als die Präparation von Überstand. Zum anderen wird anhand der ermittelten Ct-Werte deutlich, dass die Transfektion mit 5 µg DNS die besten Ct-Werte liefert. Bei dieser Menge an Nukleinsäure fallen zu allen Zeitpunkten in der Zellpräparation die Ct-Werte am niedrigsten aus. Dieser Ansatz kann für weitere Transfektionsversuche verwendet werden.

Diskussion

Das Bösartige Katarrhalfieber (BKF) ist bereits seit dem Altertum bekannt. Dennoch sind bis heute zahlreiche Fragen bezüglich Übertragung, Empfänglichkeit, Wirtsspektrum, sowie Erreger und deren Eigenschaften offen. Lange Zeit wurde BKF bei Rindern in die sogenannte Schaf-assoziierte Form, die durch das ovine Herpesvirus 2 (OvHV-2) ausgelöst wird, und die Gnu-assoziierte Form, ausgelöst durch das alcelaphine Herpesvirus 1 (AIHV-1), eingeteilt. Innerhalb der letzten Jahre sind zahlreiche weitere potentielle Erreger, Haupt- und Indikatorwirte bekannt geworden.

Die in der vorliegenden Arbeit behandelten Herpesviren werden seit 2009 dem neu geschaffenen Genus *Macavirus* zugeordnet, welches zur Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* aus der Familie *Herpesviridae* in der Ordnung *Herpesvirales* gehört. Mindestens fünf Mitglieder der Macaviren sind als Auslöser für BKF nachgewiesen: OvHV-2, AIHV-1, caprines Herpesvirus 2 (CpHV-2), white-tailed deer malignant catarrhal fever virus (WTD-MCFV) und ein AIHV-2-ähnliches Virus. Schwerpunkte der Arbeit sind (1) Verbesserung diagnostischer Verfahren zum Nachweis von Herpesviren, insbesondere Macaviren, (2) Versuche zur Anzucht von CpHV-2 in Zellkulturen sowie (3) Untersuchung von Proben von Wild- und Zootieren.

Ein besonderes Problem bei Diagnostik und Erforschung dieser Gammaherpesviren betrifft die Vermehrung in Zellkultur. Nur AIHV und das hippotragine Herpesvirus (HiHV) können mittels Zellkultur vermehrt werden. Das Fehlen eines Kultursystems schränkt auch die Möglichkeiten der Diagnostik stark ein, da die Detektion weiterer BKF-Erreger mittels ungezielter Nachweisverfahren, wie Virusanzucht in Zellkultur und nachfolgender Elektronenmikroskopie, nicht möglich ist. So kann AIHV-1 nach erfolgreicher Virusanzucht problemlos per Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist die Detektion beispielsweise von OvHV-2 direkt aus dem Untersuchungsmaterial mittels Elektronenmikroskopie noch nie beschrieben worden. Lediglich der elektronenmikroskopische Nachweis aus kultivierten Leukozyten war erfolgreich (Rosbottom et al., 2002).

Seit dem Jahr 1993 steht ein von Baxter et al. beschriebenes OvHV-2-spezifisches PCR-Verfahren für die Diagnostik des Schaf-assoziierten Bösartigen Katarrhalfiebers zur Verfügung. Diese PCR wurde von vielen Instituten zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose BKF bzw. zur differenzialdiagnostischen Abklärung genutzt. Auch für AIHV-1 gibt es spezifische PCR-Verfahren, die in der Literatur beschrieben sind (Tham et al., 1994).

Diskussion

Da neuere Erkenntnisse gezeigt haben, dass nicht allein OvHV-2 und AIHV-1 als Auslöser für BKF in Betracht zu ziehen sind, ist es erforderlich, das Spektrum der mittels PCR nachgewiesenen Erreger auf weitere Virusspezies aus der Gruppe der Macaviren auszudehnen. In diesem Zusammenhang waren Neuentdeckungen meist auf den Einsatz einer PAN-Herpes-PCR zurückzuführen (vanDevanter et al., 1996). Einen Meilenstein stellte beispielsweise das 2001 parallel bei Ziegen in den USA und in Deutschland detektierte CpHV-2 dar. Bis dahin wurde vermutet, dass bei serologisch positiv reagierenden Proben von Ziegen, ebenso wie bei Proben von Schafen, Antikörper gegen OvHV-2 vorlagen. Da alle verfügbaren serologischen Testverfahren auf Kreuzreaktionen zum AIHV-1 basieren, kann auf dieser Basis keine Unterscheidung zwischen Antikörpern gegen OvHV-2 und CpHV-2 erfolgen.

Bei CpHV-2 ist bisher wenig über Prävalenz, empfängliche Wirtsspezies, Virusgenom und Vermehrungsfähigkeit in Zellkultur bekannt. Um nähere Erkenntnisse über die Verbreitung des Virus zu erhalten und Material für Anzuchtversuche zu bekommen, wurden insbesondere Proben von Ziegen mit Hilfe der PCR und serologischer Methoden getestet.

Ebenfalls lückenhaft sind die Daten zum Vorkommen von Macaviren bei Wild- und Zootieren. Bei erkrankten Hirschen wurden bisher CpHV-2 (Li et al., 2003), WTD-MCFV (Li et al., 2000, Kleiboeker et al., 2002) und ein AIHV-2-ähnliches Macavirus (Klieforth et al., 2002) nachgewiesen. Bei einer erkrankten Bongoantilope (*Tragelaphus eurycerus*) wurde ein Steinbock-assoziiertes Macavirus (Okeson et al., 2007) entdeckt. Bei Wildwiederkäuern ließen sich außerdem eine ganze Reihe nicht klassifizierter Macaviren nachweisen, für die bisher noch kein Zusammenhang mit einer BKF-Erkrankung besteht (Li et al., 2003). Interessant ist, dass sich mit HiHV-1, einem Macavirus, welches bei Pferdeantilopen (*Hippotragus equinus*) vorkommt, experimentell BKF-Symptome beim Kaninchen auslösen ließen (Reid & Bridgen 1991).

In den letzten Jahren hat sich das Spektrum der mittels molekularbiologischer Verfahren detektierten Macaviren erweitert. Dadurch wurden neue Reservoirwirte für diese Viren entdeckt, und es sind neue Indikatorwirte hinzugekommen. So wurden BKF-artige Erkrankungen bei Tierarten festgestellt, die vorher als nicht empfänglich galten, beispielsweise Schweine, Ziegen und ein Fohlen (Costa et al., 2009). Der Nachweis OvHV-2-spezifischer DNS und das typische pathologisch-anatomische sowie pathologisch-histologische Bild dienten hierbei als Bestätigung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten neue Diagnostikmethoden zur Detektion einer Reihe von Macaviren entwickelt und eingesetzt werden sowie unbekannte

Diskussion

Wirtsspezies, die eine Gefahr bei Gemischthaltungen in Zoos und Wildparks darstellen, identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden zwei neue konventionelle PCR-Methoden und eine zwischen CpHV-2 und OvHV-2 diskriminierende Echtzeit PCR entwickelt und im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Methoden getestet. Proben von verschiedenen Wildwiederkäuern wurden ebenso wie Proben von Schafen und Ziegen mit den neu etablierten Methoden untersucht.

Haupt- und Indikatorwirte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden kleine Hauswiederkäuer und insbesondere auch Wildwiederkäuer bezüglich ihres Macavirus-Status beurteilt. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf zwei Punkte gerichtet werden: Einerseits stellt das „In-Kontakt-Bringen“ unterschiedlicher Wiederkäuerarten im Rahmen von Gemischthaltungen in Zoos und Wildparks eine Gefahr für die Entstehung von BKF dar, andererseits sind Ansätze zum Nachweis allein von OvHV-2 für die Diagnose BKF nicht ausreichend.

Bei 14% von 276 untersuchten Wildtieren konnte Macavirus-DNS nachgewiesen werden. Die an BKF erkrankten Wildtiere waren vorwiegend mit OvHV-2 infiziert. Allerdings konnte bei sechs Tieren mit klinischem BKF keine Diagnose mittels der routinemäßig verwendeten OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR gestellt werden. Hierbei handelte es sich vielmehr um Infektionen mit CpHV-2, die drei Prinz-Alfred-Hirsche (*Cervus alfredi*), einen Elch (*Alces alces*) und zwei Banteng-Rinder (*Bos javanicus*) betrafen. Außerdem ließen sich Macaviren bei einem Ellipsen-Wasserbock (*Kobus ellipsiprymnus*), vier nubischen Steinböcken (*Capra ibex nubiana*), zwei westkaukasischen Steinböcken (*Capra caucasica*), einem Alpensteinbock (*Capra ibex*) und zwei weiteren Steinböcken (*Capra ibex*) nachweisen, die in der OvHV-2-spezifischen PCR-Methode ein negatives Ergebnis gezeigt hatten. Die nicht an BKF erkrankten Tiere können aber als potentielle Hauptwirte angesehen werden. Die oben aufgeführten sehr seltenen Prinz-Alfred-Hirsche waren Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit und gaben auch Anlass zum Überdenken der Haltungen in Zoos und Tierparks. Die inzwischen häufig vorgenommene Gemischthaltung mehrerer Tierarten auf größeren Flächen bietet dem Betrachter häufig ein scheinbar natürliches Bild. Es müssen allerdings daraus hervorgehende Infektionsrisiken bedacht und abgewogen werden. Dementsprechend sollten die Tierarten mit bekanntermaßen hoher Empfänglichkeit für BKF wie z.B. Weißwedelhirsch, Bison und Banteng-Rind von bekannten Hauptwirten wie kleinen Wiederkäuern und Gnus möglichst fern gehalten werden. Allein in dieser Arbeit wurde bei sieben verstorbenen Prinz-Alfred-Hirschen aus zwei

Diskussion

Beständen Macavirus nachgewiesen, und zwar bei drei Tieren CpHV-2 und bei vier Tieren OvHV-2. Dies lässt darauf schließen, dass diese Hirschart als besonders empfängliche Indikatorspezies für beide Virusspezies anzusehen ist.

Bei zwei Banteng-Rindern (*Bos javanicus*) mit klinischer und pathologisch-histologischer BKF-Symptomatik wurde CpHV-2 nachgewiesen; die OvHV-2-spezifische PCR war negativ. Hierbei handelt es sich um den erstmaligen Nachweis von CpHV-2 bei einer Rinderspezies. Die Tiere wurden in einem Safaripark zusammen mit Schraubenziegen gehalten. Bisher wurden BKF-Erkrankungen im Zusammenhang mit dem Nachweis von CpHV-2 nur bei Hirschen und Elchen beschrieben (Vikoren et al., 2006, Li et al., 2003). Obwohl Banteng-Rinder ebenso wie Bisons als besonders empfänglich für BKF gelten, sollte überprüft werden, ob evtl. auch beim Hausrind BKF durch CpHV-2 eine Rolle spielt und nur durch Mängel der Routinediagnostik nicht detektiert wird. Insbesondere in Ländern, in denen der Kontakt von Ziegen zu Rindern keine Seltenheit ist, sollten die Routineverfahren dahingehend erweitert werden, dass ein Nachweis von CpHV-2 eingeschlossen wird. Zudem sollten BKF-Verdachtsfälle bei Rindern, die negative Ergebnisse in der OvHV-2-spezifischen PCR erbrachten, weiterführend untersucht werden.

Ohne ein umfassenderes Verständnis der Situation von Haupt- und Indikatorwirten sollten Gemischthaltungen im Allgemeinen immer als potentielle Gefahr für das Auftreten von BKF angesehen werden. Hiervon sind nicht allein Zoos und Wildparks betroffen, sondern insbesondere auch Tierkliniken. Häufig wird bei Klinikaufenthalten keine strikte Trennung der Tierarten vorgenommen. In der Regel wird mehr als eine Wiederkäuerspezies in Stallbereichen gehalten. Selbst eine Trennung von Rindern und „kleinen Klauentieren“ (Schweine und kleine Wiederkäuer) ist nicht mehr ausreichend, seit Schweine und Ziegen als Indikatorwirte angesehen werden können.

Diagnostik

Genomnachweis

Bei den Laboruntersuchungen von Schafen als Hauptwirten, bzw. Rindern und Wildtieren mit BKF-Verdacht wird in vielen Labors bisher meist ausschließlich die von Baxter et al. beschriebene OvHV-2-spezifische PCR durchgeführt. Dieses Verfahren weist ausschließlich OvHV-2 nach, und zwar einen Bereich, der für das Tegumentprotein kodiert. Die nach Sequenzierung der Amplifikate erhaltenen Daten können für eine phylogenetische Einordnung nur sehr eingeschränkt verwendet werden, da in der GenBank aus dem Bereich des Tegumentproteins außer von

Diskussion

OvHV-2 nur Sequenzen von AIHV-1 verfügbar sind. Ein reproduzierbares Auftreten von unspezifischen Banden in der Größe von 365 Bp (statt 238 Bp) behinderte in der OvHV-2-spezifischen Tegment-PCR bei Ziegen- und teilweise auch Hirschproben die Auswertung.

Aus den genannten Gründen wurden zwei weitere PCR-Verfahren entwickelt und hierfür Primer aus dem Glykoprotein-B-Bereich und dem Polymerase-Bereich gewählt. Für beide Genombereiche liegen umfangreiche Teilsequenzen verschiedener Macaviruspezies unterschiedlicher Wirte in der GenBank vor. Außerdem handelt es sich hierbei um Regionen des Genoms, die zwischen Macaviren konserviert sind. Die teilweise degenerierten Primer wurden unter Berücksichtigung von Sequenzen zahlreicher verschiedener Macaviren ermittelt. Ein positives Amplifikat im Zusammenhang mit einem negativen Ergebnis in der OvHV-2-spezifischen PCR ließ also zunächst nur die Aussage zu, dass es sich zwar um ein Macavirus, nicht aber um OvHV-2 handelt. Zur Bestimmung der Viruspezies müssen die erhaltenen Amplifikate sequenziert werden.

Wie bereits erwähnt konnte bei 39 von 276 untersuchten Wildtieren (14 %) in mindestens einem der drei PCR-Verfahren ein positives Resultat erzielt werden, bei 18 nur mit Hilfe der PAN-Macavirus-PCR-Methoden (PAN-Macavirus-Glykoprotein B-PCR und PAN-Macavirus-Polymerase-PCR). Diese Infektionen wären bei alleinigem Einsatz der OvHV-2-spezifischen PCR unerkannt geblieben.

Bei Proben von Tieren mit BKF-Verdacht lag eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse der unterschiedlichen Testverfahren vor. Bei Proben von vermutlich latent mit OvHV-2-infizierten Hauptwirten zeigte die OvHV-2-spezifische Tegment-PCR eine etwas bessere Empfindlichkeit gegenüber den beiden PAN-Macavirus-PCR-Verfahren. Beim Vergleich der beiden PAN-Macavirus-Verfahren zeigte sich die Polymerase-PCR der Glykoprotein B-PCR insoweit überlegen, als sie ein „Isolat“ bei einem Ellipsenwasserbock mit Ähnlichkeiten zum BoHV-6 detektieren konnte.

Eine phylogenetische Einordnung der Macaviren ist aufgrund der ausgeprägten Homologie innerhalb der hier sequenzierten Bereiche schwierig. So erlaubte die Sequenzierung nach der Durchführung der PAN-Macavirus-PCR lediglich die eindeutige Zuordnung zu einer Viruspezies. Die Analyse der Ausbreitung eines Erregers mittels molekularer Epidemiologie spielt in der Tierseuchenbekämpfung, etwa bei den vergleichsweise heterogenen Pestiviren, eine wichtige Rolle. Epidemiologische Rückschlüsse dieser Art sind aufgrund der großen Homologien im Glykoprotein B – und Polymerasebereich bei Macaviren nicht möglich.

Diskussion

Um mit Hilfe der konventionellen PCR ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wird bei Proben von kleinen Wiederkäuern und bei BKF-Verdachtsdiagnosen dazu geraten, die OvHV-2-spezifische Tegument-PCR als sensitives Verfahren gemeinsam mit einer PAN-Macavirus-PCR routinemäßig einzusetzen. Damit kann sowohl die Diagnose OvHV-2 als auch „Macavirus nicht OvHV-2“ gestellt werden. Mittels weiterführender Untersuchungen lässt sich dann eine weitere Einordnung durchführen. Der beschriebene Ansatz führte bei sechs Tieren mit klinischem BKF zum Nachweis einer Infektion mit CpHV-2 (drei Prinz-Alfred-Hirsche (*Cervus alfredi*), ein Elch (*Alces alces*) und zwei Banteng-Rinder (*Bos javanicus*)). CpHV-2 bzw. CpHV-2-ähnliches Macavirus ließ sich außerdem bei vier nubischen Steinböcken (*Capra ibex nubiana*), zwei westkaukasischen Steinböcken (*Capra caucasica*), einem Alpensteinbock (*Capra ibex*) und zwei weiteren Steinböcken (*Capra ibex*) detektieren, die sämtlich in der OvHV-2-spezifischen PCR negativ reagierten. Die PAN-Macavirus-Polymerase-PCR ermöglichte den Nachweis eines Macavirus mit Ähnlichkeiten zum BoHV-6 bei einem Ellipsen-Wasserbock (*Kobus ellipsiprymnus*).

Während das Ziel der neu entwickelten konventionellen PCR-Verfahren darin bestand, ein möglichst breites Spektrum an Macaviren zu erfassen, sollte die Echtzeit PCR eine schnelle Unterscheidung zwischen OvHV-2 und CpHV-2 ermöglichen. Die Auswahl der Primer aus einem konservierten Bereich innerhalb des Glykoproteins B Gens und die spezifische Auswahl der Sondensequenzen in einem divergenten Abschnitt des Gens ermöglichen die unmittelbare Unterscheidung der in Europa am häufigsten auftretenden BKF-auslösenden Viren. Dabei können Proben sowohl von erkrankten Tieren als auch von potentiellen Hauptwirten wie Schafen und Ziegen untersucht werden. Da im Verlauf dieser Arbeit immer mehr Zoos und Wildparks auf das Problem der Gemischthaltungen aufmerksam wurden, traten der Zeitfaktor sowie die Handhabung größerer Probenzahlen verstärkt in den Vordergrund. Beim Einsatz der entwickelten Echtzeit PCR kann im Regelfall auf Klonierung und Sequenzierung verzichtet werden. Die mittels konventioneller PCR positiv getesteten, an BKF erkrankten Wildtiere konnten alle mittels Echtzeit PCR erkannt werden. Bei den latent infizierten Hauptwirten zeigte sich eine etwas geringere Empfindlichkeit der Echtzeit PCR gegenüber der OvHV-2-spezifischen Tegument-PCR und auch gegenüber den PAN-Macavirus-PCR-Verfahren. Bei acht von 106 getesteten Ziegenproben fiel das Ergebnis der Echtzeit PCR negativ aus, obwohl mindestens eine andere PCR positiv war (siehe Nachweis von Macaviren in Proben kleiner Hauswiederkäuer, S. 79). Andererseits traten in vier Fällen, die in den konventionellen PCR-Methoden negativ beurteilt

Diskussion

wurden, Cycle-threshold-Werte (Ct-Werte) zwischen 37 und 39 auf. Werte in diesem Bereich wurden als fraglich beurteilt.

Um neben der Sensitivität auch die Spezifität der Echtzeit PCR besser einschätzen zu können, wurden nicht nur OvHV-2 und CpHV-2-positive Proben mit dieser Methode getestet. Proben von zwei nubischen Steinböcken, die nach Sequenzierung einem „Steinbock-assoziierten Rhadinovirus“ mit großen Übereinstimmungen zum CpHV-2 zuzuordnen waren, wurden mit Ct-Werten von 35-37 detektiert. Das AIHV-1-Isolat WC11 und ein BoHV-4-Isolat wurden mit Hilfe dieser Echtzeit PCR nicht erkannt. Die Primerauswahl erfolgte ausschließlich anhand von OvHV-2 und CpHV-2-Sequenzen aus der GenBank. Bei einigen Ziegen konnte interessanterweise eine Doppelinfektion mit OvHV-2 und CpHV-2, die bereits durch Sequenzierung nachgewiesen wurde, mittels Echtzeit PCR bestätigt werden. Hier stellt die Echtzeit PCR einen klaren Vorteil dar, da Doppelinfektionen mit den konventionellen Methoden auch nach anschließender Klonierung und Sequenzierung nicht mit Sicherheit detektiert werden können. Mit Hilfe der Echtzeit PCR kann die Doppelinfektion innerhalb kürzester Zeit nachgewiesen werden.

Ein weiterer Vorteil der Echtzeit PCR ist die Möglichkeit zur Quantifizierung der virusspezifischen DNS in den Proben. Bisher wurden Plasmidverdünnungsreihen zur Validierung der Echtzeit PCR verwendet. Bestimmungen der Kopienzahl bei Ausscheidertieren, im Zusammenhang mit Infektionsversuchen oder Vergleich erkrankter Tiere und subklinisch infizierter Tiere, sind interessante Anwendungsgebiete. Anhand der im Rahmen der Arbeit getesteten Proben konnte ein Unterschied zwischen den Ct-Werten der Proben von Hauptwirten und an BKF erkrankten Indikatorwirten gezeigt werden. Dabei lagen die Proben von Hauptwirten im Mittel etwa sieben Ct-Werte höher. Dies zeigt, dass bei klinisch nicht erkrankten Hauptwirten deutlich geringere Mengen an viraler DNS als bei an BKF erkrankten Tieren zu finden sind. Die Möglichkeit der Quantifizierung lässt sich beispielsweise dafür nutzen, bei experimentellen Infektionen einheitliche Bedingungen zu schaffen und die Virusausscheidung besser zu überwachen. Zusammenfassend erbrachte die zwischen OvHV-2 und CpHV-2 diskriminierende Echtzeit PCR zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich ihrer Effizienz, Nachweisgrenze und Vergleichbarkeit mit der konventionellen PCR. Der klare Vorteil liegt darin, die in Europa vorkommenden Erreger von BKF in einem Schritt in kürzester Zeit auch bei größerer Probenzahl detektieren und differenzieren zu können.

Bei einem Wasserbüffel (*Gayal, Bos taurus frontalis*) traten diskrepante Ergebnisse mit unterschiedlichen PCR-Verfahren auf. Vorberichtlich wurde bei den Proben vom Leibniz Institut für Zoo- und Wildtierforschung Berlin eine Euthanasie aufgrund von

Diskussion

Paratuberkuloseverdacht beschrieben. Bei der pathologischen Untersuchung fiel eine Vergrößerung der mesenterialen Lymphknoten auf. Während die OvHV-2-spezifische PCR in allen vier Untersuchungsmaterialien (Lunge, Milz, Ln. retropharyngealis, Ln. mesenterialis) positiv ausfiel, war es nicht möglich, mit Hilfe einer der beiden PAN-Macavirus-PCR-Verfahren ein Amplifikat zu erhalten. Daraufhin wurden die PAN-Herpes-PCR von vanDevanter, die diskriminierende Echtzeit PCR und eine weitere Primerkombination für den Glykoprotein B-Bereich durchgeführt, jedoch ohne Erfolg. Dies ist bemerkenswert, da die Amplifikate der OvHV-2-spezifischen PCR auch durch Klonierung und Sequenzierung bestätigt werden konnten. Die Nukleinsäuresequenz zeigte eine 99 %ige Übereinstimmung zu bekannten OvHV-2-Sequenzen aus der GenBank. Auch aus dem ORF 73-Bereich konnte problemlos ein Fragment amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Das Fragment ergab nach Sequenzierung große Übereinstimmung (94% auf Aminosäureebene) mit dem LANA (*latency-associated nuclear antigen*), kodiert in ORF 73 des OvHV-2. Es stellt sich die Frage, warum nur Teilbereiche des Genoms nachweisbar waren. Bei der Analyse des Gesamtgenoms von OvHV-2 fällt auf, dass Glykoprotein B und Polymerase (ORF 8 bzw. 9) und LANA und Tegumentprotein (ORF 73 bzw. 75) in etwa 100 kBp auseinander liegenden Genombereichen lokalisiert sind. Die Intensität der bereits in der ersten Runde der PCR auftretenden Banden und der Nachweis aus allen Probenmaterialien lässt vermuten, dass es sich hier nicht um ein Problem geringerer Empfindlichkeit einzelner PCR-Verfahren handelt. Eine mögliche Ursache dieser negativen Ergebnisse ist eine Rekombination zwischen OvHV-2 und einem anderen Macavirus, z.B. bovines Herpesvirus 6. Beispiele für Rekombination bei Herpesviren als sog. Intraspezies-Rekombinationen wurden vor allem für das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8) beschrieben. Interspezies-Rekombinationen sind selten vermehrungsfähig (Davison et al., 2002, Meurens et al., 2004); von Meurens et al. (2004) wurde eine in vitro Rekombination zwischen BoHV-1 und BoHV-5 beschrieben: In einem Experiment wurde eine doppelt deletierte BoHV-1 Variante für 24 h mit Rindernierenzellen inkubiert. Anschließend wurde eine Koinfektion mit verschiedenen Herpesviren u.a. BoHV-5, Caprinem Herpesvirus 1 (CpHV-1) und Cervinem Herpesvirus 2 (CvHV-2) für 2 h bei 4°C durchgeführt. Bei zwei der 150 geernteten Isolate handelte es sich um Rekombinationen zwischen BoHV-1 und BoHV-5; Rekombinationen mit CvHV-2 und CpHV-1 wurden nicht detektiert.

Für die Proben des Wasserbüffels bleibt die Frage offen, warum ein Nachweis von OvHV-2 spezifischer DNS nur aus einem bestimmten Genombereich erfolgreich war. Diesbezügliche Ursachenforschungen müssen fortgesetzt werden. Im Rahmen

Diskussion

der Routinediagnostik für BKF wäre das Tier mit Hilfe der OvHV-2-spezifischen PCR und entsprechender Pathologie eindeutig als an BKF erkrankt eingestuft worden.

Antikörpernachweis

Die serologische Untersuchung ist nicht die erste Wahl im Rahmen der Diagnostik eines Verdachts auf BKF, denn bei einem akuten Krankheitsverlauf sind nicht immer Antikörper nachweisbar. Auch bei subklinischen Infektionen können Antikörper gefunden werden. In den Fällen, in denen beispielsweise nur Serum als Untersuchungsmaterial vorliegt, ist der Antikörpernachweis der PCR jedoch vorzuziehen, da der Nachweis von Macavirus DNS aus zellfreiem Material nicht erfolgversprechend ist. Der Antikörpernachweis ist für das Screening von Schaf- und Ziegenherden geeignet, weil bei Hauptwirten in der Phase der Latenz Virusgenom nicht immer zuverlässig nachgewiesen werden kann. Bei einer vergleichenden Beurteilung der PCR-Verfahren und der serologischen Methoden ist zu beachten, dass bei Schaf- und Ziegenlämmern bis zum Alter von ca. sechs Monaten maternale Antikörper nachweisbar sind, aber oft noch keine virale DNS.

Der im Rahmen dieser Arbeit zur qualitativen Antikörperbestimmung verwendete ELISA (Firma VMRD, USA) entsprach bei jedem Testlauf den Validitätskriterien und war einfach und schnell in der Durchführung. Demgegenüber zeigte der Serumneutralisationstest eine weniger zufriedenstellende Bilanz. Drei Ansätze, die sich in Inkubationszeit und der Zugabe von Komplement unterschieden, brachten im direkten Vergleich mit dem ELISA keine übereinstimmenden Ergebnisse. Viele der im ELISA positiven Tiere wurden im SNT negativ getestet. Ein einzelnes Tier mit schwach positivem Resultat im SNT lag im ELISA unterhalb des Cut-Offs von 25 % Inhibition. Unter Berücksichtigung des durch PCR ermittelten Infektionsstatus im größten getesteten Ziegenbestand erbrachte der ELISA eindeutig die schlüssigeren Ergebnisse (siehe Tabelle 11). Hierbei handelte es sich um einen Bestand, in dem per PCR sowohl OvHV-2 als auch CpHV-2 nachgewiesen wurden. Da die Herde nahezu zur Hälfte aus Lämmern bestand, ist davon auszugehen, dass in den Serumproben Antikörper gegen Macaviren nachweisbar sind.

Der Aufbau einer Macavirus-freien Herde wird von Li et al. sowohl für Schafe (1999) als auch für Ziegen (2005) beschrieben. Zum Nachweis der Macavirus-Freiheit sollten PCR und ELISA in Kombination als Testmethoden zum Einsatz kommen. Um schneller und leichter Daten zur Prävalenz einzelner Macaviren bei kleinen Wiederkäuern erheben zu können, wäre eine Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen Antikörpern gegen OvHV-2 und CpHV-2 mittels ELISA wünschenswert. Die Entwicklung eines solchen Systems stellt eine Herausforderung für die Zukunft

Diskussion

dar. Eine Möglichkeit ist die Beschichtung von ELISA-Platten mit OvHV-2- bzw. CpHV-2-spezifischen heterolog exprimierten Glykoproteinen, um auf diese Weise die homologen Antikörper gegen das jeweilige Virus nachzuweisen.

Vermehrung von CpHV-2

Da bisher nur wenige Informationen über das CpHV-2 verfügbar sind, wurde im Rahmen der Arbeit geprüft, ob eine Gesamtsequenz von CpHV-2 erstellt werden kann. Hierfür sollte zunächst eine Virusvermehrung in Zellkultur etabliert werden. Als Ausgangsmaterial standen gefrorene ZNS-Proben von zwei erkrankten Hirschen zur Verfügung. Bisher war die Virusanzucht in Zellkultur nur für AIHV und HiHV erfolgreich, während für OvHV-2 lediglich eine Kultivierung infizierter Lymphozyten von erkrankten Tieren gelang. Beide Optionen wurden für CpHV-2 einzeln und in Kombination durch Inkubation von Lymphozytenkulturen von Ziegen mit Proben von den erkrankten Hirschen genutzt. Es wurden Suspensionen der positiven Proben hergestellt und in unterschiedlichen Verdünnungen auf sieben verschiedene Zelllinien aufgetragen. Nach Mediumwechsel und Passagierung konnte keine Veränderung der Zellmorphologie festgestellt werden. Mittels PCR wurde weder aus Zellen noch aus Überstand virale DNS nachgewiesen.

Für die Lymphozytenanzuchtversuche stand bis zum Abschluss der Arbeit das dafür notwendige Material, also frisches gerinnungsgehemmtes Blut oder Lymphknoten erkrankter Tiere, nicht zur Verfügung (Schock et al., 1998). Daher wurden Vorversuche mit EDTA-Blut von Ziegen durchgeführt. Trotz erfolgreicher Kultivierung und Passagierung der Ziegen-Lymphozyten war auch hier nach einigen Passagen weder im Überstand noch in den Zellen Macavirus-spezifische DNS nachweisbar (siehe Anzucht von Ziegen-Lymphozyten).

Ein Transfektionsversuch mit unterschiedlichen Konzentrationen von Nukleinsäurepräparationen aus dem ZNS der erkrankten Hirsche wurde mit PT-Zellen durchgeführt. Die Untersuchung von Überstand und Zellen mittels Echtzeit PCR zu vier verschiedenen Zeitpunkten zeigte einen deutlichen Abfall der viralen DNS im Laufe der Zeit (siehe Tabelle 16).

Die Kultivierung von Lymphozyten eines erkrankten Tieres wird als eine wichtige Möglichkeit zur Vermehrung von Macaviren angesehen. Im Falle von OvHV-2 führte dies letztendlich zur Entzifferung und Veröffentlichung des kompletten Genoms (Hart et al., 2007). Zur Etablierung einer solchen CpHV-2-positiven Lymphozytenkultur werden allerdings frische EDTA-Blutproben oder Lymphknoten eines mit CpHV-2 infizierten und an BKF-erkrankten Tieres benötigt.

Zusammenfassung

Bösartiges Katarrhalfieber (BKF) ist eine meist tödlich verlaufende, meldepflichtige Erkrankung von Paarhufern, die durch verschiedene Macaviren der Unterfamilie *Gammaherpesvirinae* aus der Familie *Herpesviridae* ausgelöst wird. In der Regel handelt es sich dabei um eine Einzeltiererkrankung. Seit den ersten Fällen von Blauzungenkrankheit in Deutschland hat der Nachweis von Macaviren im Rahmen der Differenzialdiagnostik an Bedeutung gewonnen. Ungezielte Methoden zur Virusdiagnostik wie die Virusanzucht in Zellkultur und die Elektronenmikroskopie sind im Hinblick auf Macaviren nicht erfolgversprechend. Für eine Labordiagnose ist die PCR Mittel der Wahl. Bisher wird hierfür von den meisten Labors eine OvHV-2-spezifische PCR bei Rinderproben eingesetzt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die diagnostischen Möglichkeiten so zu erweitern, dass ein möglichst breites Spektrum von potentiellen BKF-Erregern detektiert werden kann. Weiterhin sollte ein System zur Vermehrung von CpHV-2 gefunden werden.

Bezüglich der BKF-Diagnostik wurden zwei neue konventionelle PCR-Verfahren mit breitem Nachweisspektrum für Macaviren und eine OvHV-2-CpHV-2-diskriminierende Echtzeit PCR etabliert. Weiterhin wurden zwei serologische Verfahren, ELISA und Serumneutralisationstest, miteinander verglichen. Dafür wurden Proben von 276 Wildwiederkäuern, 230 Ziegen und 58 Schafen untersucht.

Bei der Antikörperbestimmung ist der kompetitive ELISA dem SNT im Hinblick auf Arbeitszeit, Aufwand und Qualität der Testergebnisse deutlich überlegen. Für den Einsatz in der Routinediagnostik wird der ELISA vor allem für Hauptwirte empfohlen.

Der Bedarf breit angelegter Detektionsmethoden für die BKF-Diagnostik konnte im PCR-Bereich anhand von 18 positiven Resultaten bei Wildtierproben demonstriert werden. Diese 18 Proben führten zu negativen Ergebnissen beim Einsatz der OvHV-2-spezifischen PCR, aber zu positiven Ergebnissen mit den PAN-Macavirus-PCR-Verfahren. Klonierung, Sequenzierung und eine phylogenetische Analyse der Amplifikate führten zu den Nachweisen von CpHV-2, CpHV-2-ähnlichem und BoHV-6-ähnlichem Macavirus.

Erstmals konnte CpHV-2-induziertes BKF bei zwei Banteng-Rindern (*Bos javanicus*) festgestellt werden. Bisher wurde CpHV-2 nur als Auslöser der Erkrankung bei Hirschen und Elchen angesehen. Die Daten zeigen, dass die bisher ausschließlich durchgeführte OvHV-2-Diagnostik im Rinderbereich zu falsch negativen Befunden führen kann. Die beschriebene Etablierung einer OvHV-2-CpHV-2-diskriminierenden

Zusammenfassung

Echtzeit PCR ermöglicht eine schnelle Unterscheidung zwischen den beiden in Europa vorkommenden Hauptverursachern von BKF. Diese Methode ist für den Einsatz in der Routinediagnostik für kleine Wiederkäuer und Rinder gut geeignet. Für den Einsatz bei Wildtieren sind die breiter angelegten konventionellen PCR-Methoden vorzuziehen.

Anzuchtversuche ausgehend von CpHV-2-positiven ZNS-Proben von Hirschen wurden auf unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Weiterhin konnten Primär- und Sekundärkulturen aus Ziegen-Lymphozyten etabliert werden. Abschließend wurde ein vergleichbarer Virusanzuchtversuch auf diesen Sekundärkulturen durchgeführt. Bei allen Ansätzen kam es jedoch zum Verlust der virusspezifischen DNS. Zusätzlich wurde ein Transfektionsversuch mit Nukleinsäure aus dem oben angeführten ZNS von erkrankten Hirschen auf PT-Zellen durchgeführt und Überstände sowie Zellen mittels Echtzeit PCR untersucht. Auch dieser Ansatz erlaubte nicht die Kultivierung von CpHV-2.

Summary

Malignant catarrhal fever (MCF) is a fatal, notifiable disease of Artiodactyla, which is caused by different Macaviruses of the subfamily *Gammaherpesvirinae* of the family *Herpesviridae*. MCF usually occurs only sporadically. Within the framework of differential diagnostics the detection of Macaviruses has become more important since the first cases of bluetongue disease were noticed in Germany. Undirected virological methods like virus propagation in cell culture and electron microscopy are not promising with regard to Macaviruses. PCR is the method of choice for laboratory diagnosis. Until now most laboratories use the OvHV-2 specific PCR for samples of cattle.

One objective of this work was to improve the diagnostic tools for the detection of a broad spectrum of potential MCF-viruses. Furthermore experiments towards the establishment of a system for the cultivation of CpHV-2 were performed.

With regard to MCF-diagnostics two new conventional PCR-methods and an OvHV-2-CpHV-2-discriminating realtime PCR were established, which allowed to detect a broad spectrum of macaviruses. Furthermore two antibody-test-systems, ELISA and serum neutralisation assay (SNA), were compared to each other. Samples of 276 wild ruminants, 230 goats and 58 sheep were examined by these methods.

Concerning time, effort and quality of result the competitive ELISA was clearly superior to SNA. ELISA is recommended for routine diagnostic use, especially for reservoir hosts.

The importance of broadly reactive PCR detection methods could be demonstrated by 18 positive results of wild animal samples. All 18 cases led to negative results with OvHV-2-specific PCR, but reacted positive in the PAN-Macavirus-PCR. Cloning, sequencing and phylogenetic analyses of the amplicates led to the detection of CpHV-2, CpHV-2-resembling and BoHV-6-resembling Macaviruses.

For the first time CpHV-2-induced MCF was detected in two Banteng-cattle (*Bos javanicus*). Until now, CpHV-2 has been considered as a cause of MCF only in deer and moose. This implies that routine OvHV-2-specific-diagnostic in cattle is insufficient. The establishment of an OvHV-2-CpHV-2-discriminating realtime PCR allowed rapid differentiation between the two most common causative agents of MCF in Europe. This method is suitable for application in routine diagnostics of small ruminants and cattle. For the application in wild ruminants the broadly reactive conventional PCR is more suited.

Summary

Using CpHV-2-positive CNS-samples of MCF-diseased deer as starting material, it was attempted to cultivate the virus in different cell lines. Furthermore, primary and secondary cultures of goat lymphocytes were established and used for propagation trials. However, after prolonged incubation Macavirus specific DNA could not be detected.

Finally PT-cells were transfected with nucleic acid prepared from the above mentioned CpHV-2 positive deer-CNS and supernatant as well as cells were tested by realtime PCR. This approach did also not lead to detectable replication of CpHV-2.

Literaturverzeichnis

Ackermann, M., Engels, M., Fraefel, C., Metzler, A., Schwyzer, M., Suter, M. and Tobler, K. (2002). Herpesviruses: balance in power and powers imbalanced. *Vet Microbiol* 86 (1-2), 175-81.

Ackermann, M. (2006). Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol* 113 (3-4), 211-22.

Adams, S. W. and Hutt-Fletcher, L. M. (1990). Characterization of envelope proteins of alcelaphine herpesvirus 1. *J Virol* 64 (7), 3382-90.

Alba, M. M., Das, R., Orengo, C. A. and Kellam, P. (2001). Genomewide function conservation and phylogeny in the Herpesviridae. *Genome Res* 11 (1), 43-54.

Albini, S., Zimmermann, W., Neff, F., Ehlers, B., Hani, H., Li, H., Hussy, D., Engels, M. and Ackermann, M. (2003). Identification and quantification of ovine gammaherpesvirus 2 DNA in fresh and stored tissues of pigs with symptoms of porcine malignant catarrhal fever. *J Clin Microbiol* 41 (2), 900-4.

Alcaraz A, Warren A, Jackson C, Gold J, McCoy M, Cheong SH, Kimball S, Sells S, Taus NS, Divers T, Li H. (2009). Naturally occurring sheep-associated malignant catarrhal fever in North American pigs. *J Vet Diagn Invest.* 2009 Mar;21(2):250-3.

Anderson, I. E., Buxton, D., Campbell, I., Russell, G., Davis, W. C., Hamilton, M. J. and Haig, D. M. (2007). Immunohistochemical study of experimental malignant catarrhal fever in rabbits. *J Comp Pathol* 136 (2-3), 156-66.

Baxter, S. I., Pow, I., Bridgen, A. and Reid, H. W. (1993). PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch Virol* 132 (1-2), 145-59.

Bender, L. C., Li, H., Thompson, B. C., Morrow, P. C. and Valdez, R. (2003). Infectious disease survey of gemsbok in New Mexico. *J Wildl Dis* 39 (4), 772-8.

Literaturverzeichnis

Burrells, C. and Reid, H. W. (1991). Phenotypic analysis of lymphoblastoid cell lines derived from cattle and deer affected with "sheep-associated" malignant catarrhal fever. *Vet Immunol Immunopathol* 29 (1-2), 151-61.

Chmielewicz, B., Goltz, M. and Ehlers, B. (2001). Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res* 75 (1), 87-94.

Cooley, A. J., Taus, N. S. and Li, H. (2008). Development of a management program for a mixed species wildlife park following an occurrence of malignant catarrhal fever. *J Zoo Wildl Med* 39 (3), 380-5.

Costa, E. A., Bomfim, M. R., da Fonseca, F. G., Drumond, B. P., Coelho, F. M., Vasconcelos, A. C., Furtini, R., Paixao, T. A., Tsois, R. M., Santos, R. L. and Resende, M. (2009). Ovine herpesvirus 2 infection in Foal, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15 (5), 844-5.

Coulter, L. J., Wright, H. and Reid, H. W. (2001). Molecular genomic characterization of the viruses of malignant catarrhal fever. *J Comp Pathol* 124 (1), 2-19.

Coulter, L. J. and Reid, H. W. (2002). Isolation and expression of three open reading frames from ovine herpesvirus-2. *J Gen Virol* 83 (Pt 3), 533-43.

Crawford, T. B., Li, H. and O'Toole, D. (1999). Diagnosis of malignant catarrhal fever by PCR using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest* 11 (2), 111-6.

Crawford, T. B., Li, H., Rosenburg, S. R., Norhausen, R. W. and Garner, M. M. (2002). Mural folliculitis and alopecia caused by infection with goat-associated malignant catarrhal fever virus in two sika deer. *J Am Vet Med Assoc* 221 (6), 843-7, 801.

Literaturverzeichnis

Cunha, C. W., Traul, D. L., Taus, N. S., Oaks, J. L., O'Toole, D., Davitt, C. M. and Li, H. (2008). Detection of ovine herpesvirus 2 major capsid gene transcripts as an indicator of virus replication in shedding sheep and clinically affected animals. *Virus Res* 132 (1-2), 69-75.

Cunha, C. W., Otto, L., Taus, N. S., Knowles, D. P. and Li, H. (2009). Development of a multiplex real-time PCR for detection and differentiation of malignant catarrhal fever viruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 47 (8), 2586-9.

Dabak, M. and Bulut, H. (2003). Outbreak of malignant catarrhal fever in cattle in Turkey. *Vet Rec* 152 (8), 240-1.

David, D., Dagoni, I., Garazi, S., Perl, S. and Brenner, J. (2005). Two cases of the cutaneous form of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle. *Vet Rec* 156 (4), 118-20.

Davison AJ. (2002) Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol.* 2002 Apr 22;86(1-2):69-88.

Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J. and Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154 (1), 171-7.

Dry, I., Haig, D. M., Inglis, N. F., Imrie, L., Stewart, J. P. and Russell, G. C. (2008). Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1. *J Virol* 82 (11), 5390-7.

Dunowska, M., Letchworth, G. J., Collins, J. K. and DeMartini, J. C. (2001). Ovine herpesvirus-2 glycoprotein B sequences from tissues of ruminant malignant catarrhal fever cases and healthy sheep are highly conserved. *J Gen Virol* 82 (Pt 11), 2785-90.

Literaturverzeichnis

Edington, N., Patel, J., Russell, P. H. and Plowright, W. (1979). The nature of the acute lymphoid proliferation in rabbits infected with the herpes virus of bovine malignant catarrhal fever. *Eur J Cancer* 15 (12), 1515-22.

Efron, B., Halloran, E. and Holmes, S. (1996). Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (14), 7085-90.

Ehlers B, Dural G, Yasmum N, Lembo T, de Thoisy B, Ryser-Degiorgis MP, Ulrich RG, McGeoch DJ. (2008). Novel mammalian Herpesviruses and lineages within the Gammaherpesvirinae: Cospeciation and interspecies transfer. *J Virol.* 2008 Apr;82(7):3509-16. Epub 2008 Jan 23.

Ensser, A., Pflanz, R. and Fleckenstein, B. (1997). Primary structure of the alcelaphine herpesvirus 1 genome. *J Virol* 71 (9), 6517-25.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 738-791.

Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: interference and reliability. *Annu Rev Genet* 22, 521-565.

Felsenstein, J. (1993). "PHYLIP (Phylogeny Interference Package)". Department of Genetics, University of Washington, USA.

Ferris, N. P. and Donaldson, A. I. (1983). The influence of normal guinea-pig serum and tissue culture assay system on foot-and-mouth disease virus neutralisation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 6 (2), 161-9.

Field HJ, Biswas S, Mohammad IT. Herpesvirus latency and therapy--from a veterinary perspective. *Antiviral Res.* 2006 Sep;71(2-3):127-33. Epub 2006 Jun 27.

Literaturverzeichnis

Flach, E. J., Reid, H., Pow, I. and Klemt, A. (2002). Gamma herpesvirus carrier status of captive artiodactyls. *Res Vet Sci* 73 (1), 93-9.

Foster, A. P., Twomey, D. F., Monie, O. R., Kiupel, M., Hoffmann, I. and Willoughby, K. Diagnostic exercise: generalized alopecia and mural folliculitis in a goat. *Vet Pathol* 47 (4), 760-3.

Fraser, S. J., Nettleton, P. F., Dutia, B. M., Haig, D. M. and Russell, G. C. (2006). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against malignant catarrhal fever viruses in cattle serum. *Vet Microbiol* 116 (1-3), 21-8.

Frolich, K., Li, H. and Muller-Doblies, U. (1998). Serosurvey for antibodies to malignant catarrhal fever-associated viruses in free-living and captive cervids in Germany. *J Wildl Dis* 34 (4), 777-82.

Gailbreath, K. L., Taus, N. S., Cunha, C. W., Knowles, D. P. and Li, H. (2008). Experimental infection of rabbits with ovine herpesvirus 2 from sheep nasal secretions. *Vet Microbiol* 132 (1-2), 65-73.

Gulland, F. M., Reid, H. W., Buxton, D., Lewis, J. C., Kock, R. A. and Kirkwood, J. K. (1989). Malignant catarrhal fever in a roan antelope (*Hippotragus equinus*) at Regent's Park. *Vet Rec* 124 (2), 42-3.

Haig, D. M., Grant, D., Deane, D., Campbell, I., Thomson, J., Jepson, C., Buxton, D. and Russell, G. C. (2008). An immunisation strategy for the protection of cattle against alcelaphine herpesvirus-1-induced malignant catarrhal fever. *Vaccine* 26 (35), 4461-8.

Hart, J., Ackermann, M., Jayawardane, G., Russell, G., Haig, D. M., Reid, H. and Stewart, J. P. (2007). Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genome. *J Gen Virol* 88 (Pt 1), 28-39.

Literaturverzeichnis

Hatkin, J. (1980). Endemic malignant catarrhal fever at the San Diego wild animal park. *J Wildl Dis* 16 (3), 439-43.

Hedges, S. B. (1992). The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol* 9 (2), 366-9.

Holliman, A., Daniel, R., Twomey, D. F., Barnett, J., Scholes, S., Willoughby, K. and Russell, G. (2007). Malignant catarrhal fever in cattle in the UK. *Vet Rec* 161 (14), 494-5.

Hua, Y., Li, H. and Crawford, T. B. (1999). Quantitation of sheep-associated malignant catarrhal fever viral DNA by competitive polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 11 (2), 117-21.

Hussy, D., Stauber, N., Leutenegger, C. M., Rieder, S. and Ackermann, M. (2001). Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *Clin Diagn Lab Immunol* 8 (1), 123-8.

Hussy, D., Janett, F., Albini, S., Stauber, N., Thun, R. and Ackermann, M. (2002). Analysis of the pathogenetic basis for shedding and transmission of ovine gamma herpesvirus 2. *J Clin Microbiol* 40 (12), 4700-4.

Jacobsen, B., Thies, K., von Altröck, A., Förster, C., König, M. and Baumgärtner, W. (2007). Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in three goats. *Vet Microbiol* 124 (3-4), 353-7.

Jacoby RO, Reid HW, Buxton D, Pow I. Transmission of wildebeest-associated and sheep-associated malignant catarrhal fever to hamsters, rats and guinea-pigs. *J Comp Pathol*. 1988 Jan;98(1):91-8.

Literaturverzeichnis

Kalunda, M., Ferris, D. H., Dardiri, A. H. and Lee, K. M. (1981). Malignant catarrhal fever III. Experimental infection of sheep, domestic rabbits and laboratory animals with malignant catarrhal fever virus. *Can J Comp Med* 45 (3), 310-4.

Keel, M. K., Patterson, J. G., Noon, T. H., Bradley, G. A. and Collins, J. K. (2003). Caprine herpesvirus-2 in association with naturally occurring malignant catarrhal fever in captive sika deer (*Cervus nippon*). *J Vet Diagn Invest* 15 (2), 179-83.

Kim, O., Li, H. and Crawford, T. B. (2003). Demonstration of sheep-associated malignant catarrhal fever virions in sheep nasal secretions. *Virus Res* 98 (2), 117-22.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.

Kleiboeker, S. B., Miller, M. A., Schommer, S. K., Ramos-Vara, J. A., Boucher, M. and Turnquist, S. E. (2002). Detection and multigenic characterization of a herpesvirus associated with malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Missouri. *J Clin Microbiol* 40 (4), 1311-8.

Klieforth, R., Maalouf, G., Stalis, I., Terio, K., Janssen, D. and Schrenzel, M. (2002). Malignant catarrhal fever-like disease in Barbary red deer (*Cervus elaphus barbarus*) naturally infected with a virus resembling alcelaphine herpesvirus 2. *J Clin Microbiol* 40 (9), 3381-90.

Lahijani, R. S., Sutton, S. M., Klieforth, R. B., Murphy, M. F. and Heuschele, W. P. (1994). Application of polymerase chain reaction to detect animals latently infected with agents of malignant catarrhal fever. *J Vet Diagn Invest* 6 (4), 403-9.

Li, H., Shen, D. T., Knowles, D. P., Gorham, J. R. and Crawford, T. B. (1994). Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep

Literaturverzeichnis

and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *J Clin Microbiol* 32 (7), 1674-9.

Li, H., Shen, D. T., Davis, W. C., Knowles, D. P., Gorham, J. R. and Crawford, T. B. (1995). Identification and characterization of the major proteins of malignant catarrhal fever virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 1), 123-9.

Li, H., Shen, D. T., O'Toole, D., Knowles, D. P., Gorham, J. R. and Crawford, T. B. (1995). Investigation of sheep-associated malignant catarrhal fever virus infection in ruminants by PCR and competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 33 (8), 2048-53.

Li, H., Shen, D. T., Jessup, D. A., Knowles, D. P., Gorham, J. R., Thorne, T., O'Toole, D. and Crawford, T. B. (1996). Prevalence of antibody to malignant catarrhal fever virus in wild and domestic ruminants by competitive-inhibition ELISA. *J Wildl Dis* 32 (3), 437-43.

Li, H., Shen, D. T., O'Toole, D., Davis, W. C., Knowles, D. P., Gorham, J. R. and Crawford, T. B. (1996). Malignant catarrhal fever virus. Characterization of a United States isolate and development of diagnostic assays. *Ann N Y Acad Sci* 791, 198-210.

Li, H., Snowden, G. and Crawford, T. B. (1999). Production of malignant catarrhal fever virus-free sheep. *Vet Microbiol* 65 (2), 167-72.

Li, H., Westover, W. C. and Crawford, T. B. (1999). Sheep-associated malignant catarrhal fever in a petting zoo. *J Zoo Wildl Med* 30 (3), 408-12.

Li, H., Dyer, N., Keller, J. and Crawford, T. B. (2000). Newly recognized herpesvirus causing malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Clin Microbiol* 38 (4), 1313-8.

Literaturverzeichnis

Li, H., Snowder, G., O'Toole, D. and Crawford, T. B. (2000). Transmission of ovine herpesvirus 2 among adult sheep. *Vet Microbiol* 71 (1-2), 27-35.

Li, H., Hua, Y., Snowder, G. and Crawford, T. B. (2001). Levels of ovine herpesvirus 2 DNA in nasal secretions and blood of sheep: implications for transmission. *Vet Microbiol* 79 (4), 301-10.

Li, H., Keller, J., Knowles, D. P. and Crawford, T. B. (2001). Recognition of another member of the malignant catarrhal fever virus group: an endemic gammaherpesvirus in domestic goats. *J Gen Virol* 82 (Pt 1), 227-32.

Li, H., McGuire, T. C., Muller-Doblies, U. U. and Crawford, T. B. (2001). A simpler, more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to malignant catarrhal fever viruses. *J Vet Diagn Invest* 13 (4), 361-4.

Li, H., Snowder, G.D., Crawford, T.B. (2002). Effect of passive transfer of maternal immune components on infection with ovine herpesvirus 2 in lambs. *AJVR* 63 (5), 631-633.

Li, H., Gailbreath, K., Bender, L. C., West, K., Keller, J. and Crawford, T. B. (2003). Evidence of three new members of malignant catarrhal fever virus group in muskox (*Ovibos moschatus*), Nubian ibex (*Capra nubiana*), and gemsbok (*Oryx gazella*). *J Wildl Dis* 39 (4), 875-80.

Li, H., Wunschmann, A., Keller, J., Hall, D. G. and Crawford, T. B. (2003). Caprine herpesvirus-2-associated malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Vet Diagn Invest* 15 (1), 46-9.

Li, H., Taus, N. S., Lewis, G. S., Kim, O., Traul, D. L. and Crawford, T. B. (2004). Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode for transmission. *J Clin Microbiol* 42 (12), 5558-64.

Literaturverzeichnis

Li, H., Gailbreath, K., Flach, E. J., Taus, N. S., Cooley, J., Keller, J., Russell, G. C., Knowles, D. P., Haig, D. M., Oaks, J. L., Traul, D. L. and Crawford, T. B. (2005). A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. *J Gen Virol* 86 (Pt 11), 3021-6.

Li, H., Keller, J., Knowles, D. P., Taus, N. S., Oaks, J. L. and Crawford, T. B. (2005). Transmission of caprine herpesvirus 2 in domestic goats. *Vet Microbiol* 107 (1-2), 23-9.

Li, H., O'Toole, D., Kim, O., Oaks, J. L. and Crawford, T. B. (2005). Malignant catarrhal fever-like disease in sheep after intranasal inoculation with ovine herpesvirus-2. *J Vet Diagn Invest* 17 (2), 171-5.

Li, H., Taus, N. S., Jones, C., Murphy, B., Evermann, J. F. and Crawford, T. B. (2006). A devastating outbreak of malignant catarrhal fever in a bison feedlot. *J Vet Diagn Invest* 18 (1), 119-23.

Li, H., Taus, N. S. and Oaks, J. L. (2006). Sheep-associated malignant catarrhal fever virus: prospects for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 5 (1), 133-41.

Li, H., Cunha, C. W., Davies, C. J., Gailbreath, K. L., Knowles, D. P., Oaks, J. L. and Taus, N. S. (2008). Ovine herpesvirus 2 replicates initially in the lung of experimentally infected sheep. *J Gen Virol* 89 (Pt 7), 1699-708.

Li, H., Karney, G., O'Toole, D. and Crawford, T. B. (2008). Long distance spread of malignant catarrhal fever virus from feedlot lambs to ranch bison. *Can Vet J* 49 (2), 183-5.

Loken, T., Aleksandersen, M., Reid, H. and Pow, I. (1998). Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway. *Vet Rec* 143 (17), 464-7.

Masters, A. M., Galvin, D. A. and Cousins, D. V. (2003). Sequence variation at a Bmy I/Rsa I restriction site in ovine herpes virus 2. *Mol Cell Probes* 17 (5), 211-4.

Literaturverzeichnis

McGeoch DJ, Dolan A, Ralph AC.(2000). Toward a Comprehensive Phylogeny for Mammalian and Avian Herpesviruses. *J Virol.* 2000 Nov;74(22):10401-6.

McGeoch DJ, Gatherer D, Dolan A. (2005). On phylogenetic relationships among major lineages of the Gammaherpesvirinae. *J Gen Virol.* 2005 Feb;86(Pt 2):307-16.

Mettenleiter, T., Keil, G. M., Fuchs, W. (2008). *Molecular Biology of Animal Herpesviruses*, Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Meurens, F., Keil, G. M., Muylkens, B., Gogev, S., Schynts, F., Negro, S., Wiggers, L. and Thiry, E. (2004). Interspecific recombination between two ruminant alphaherpesviruses, bovine herpesviruses 1 and 5. *J Virol* 78 (18), 9828-36.

Mirangi, P. K. and Kang'ee, F. M. (1999). Diagnosis of malignant catarrhal fever using the polymerase chain reaction. *Vet Rec* 145 (19), 558-9.

Muller-Doblies, U. U., Li, H., Hauser, B., Adler, H. and Ackermann, M. (1998). Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J Clin Microbiol* 36 (10), 2970-2.

Murphy, M. F., Klieforth, R. B., Lahijani, R. S. and Heuschele, W. P. (1994). Diagnosis of malignant catarrhal fever by polymerase chain reaction amplification of alcelaphine herpesvirus 1 sequence. *J Wildl Dis* 30 (3), 377-82.

Nielsen, N. O., Oosterhuis, J., Janssen, D., McColl, K., Anderson, M. P. and Heuschele, W. P. (1988). Fatal respiratory disease in Nilgiri tahr: possibly malignant catarrhal fever. *Can J Vet Res* 52 (2), 216-21.

Nishimori, T., Ishihara, R., Kanno, T., Jayawardane, G. L., Nishimori, K., Uchida, I. and Imai, K. (2004). Experimental transmission of ovine herpesvirus-2 in sheep. *J Vet Med Sci* 66 (10), 1171-6.

Literaturverzeichnis

Okeson, D. M., Garner, M. M., Taus, N. S., Li, H. and Coke, R. L. (2007). Ibex-associated malignant catarrhal fever in a bongo antelope (*Tragelaphus euryceros*). *J Zoo Wildl Med* 38 (3), 460-4.

O'Toole, D., Li, H., Roberts, S., Rovnak, J., DeMartini, J., Cavender, J., Williams, B. and Crawford, T. (1995). Chronic generalized obliterative arteriopathy in cattle: a sequel to sheep-associated malignant catarrhal fever. *J Vet Diagn Invest* 7 (1), 108-21.

O'Toole, D., Li, H., Miller, D., Williams, W. R. and Crawford, T. B. (1997). Chronic and recovered cases of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle. *Vet Rec* 140 (20), 519-24.

O'Toole, D., Li, H., Sourk, C., Montgomery, D. L. and Crawford, T. B. (2002). Malignant catarrhal fever in a bison (*Bison bison*) feedlot, 1993-2000. *J Vet Diagn Invest* 14 (3), 183-93.

O'Toole, D., Taus, N. S., Montgomery, D. L., Oaks, J. L., Crawford, T. B. and Li, H. (2007). Intra-nasal inoculation of American bison (*Bison bison*) with ovine herpesvirus-2 (OvHV-2) reliably reproduces malignant catarrhal fever. *Vet Pathol* 44 (5), 655-62.

Pagamjav, O., Sakata, T., Ibrahim el, S. M., Sugimoto, C., Takai, S., Paweska, J. T., Yamaguchi, T., Yasuda, J. and Fukushi, H. (2005). Detection of novel gammaherpesviruses in wild animals of South Africa. *J Vet Med Sci* 67 (11), 1185-8.

Powers, J. G., VanMetre, D. C., Collins, J. K., Dinsmore, R. P., Carman, J., Patterson, G., Brahmbhatt, D. and Callan, R. J. (2005). Evaluation of ovine herpesvirus type 2 infections, as detected by competitive inhibition ELISA and polymerase chain reaction assay, in dairy cattle without clinical signs of malignant catarrhal fever. *J Am Vet Med Assoc* 227 (4), 606-11.

Literaturverzeichnis

Rae, C. A. (1994). Lymphocytic enteritis and systemic vasculitis in sheep. *Can Vet J* 35 (10), 622-5.

Reid HW, Buxton D, Pow I, Finlayson J. (1986). Malignant catarrhal fever: experimental transmission of the 'sheep-associated' form of the disease from cattle and deer to cattle, deer, rabbits and hamsters. *Res Vet Sci.* Jul;41(1):76-81.

Reid, H. W. and Bridgen, A. (1991). Recovery of a herpesvirus from a roan antelope (*Hippotragus equinus*). *Vet Microbiol* 28 (3), 269-78.

Rosbottom, J., Dalziel, R. G., Reid, H. W. and Stewart, J. P. (2002). Ovine herpesvirus 2 lytic cycle replication and capsid production. *J Gen Virol* 83 (Pt 12), 2999-3002.

Rosenberger, G., Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. (1994). *Krankheiten des Rindes*. Berlin, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin.

Russell, G. C., Stewart, J. P. and Haig, D. M. (2009). Malignant catarrhal fever: A review. *Vet J* 179 (3), 324-35.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4 (4), 406-25.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* 1977 Feb 24;265(5596):687-95.

Schock, A. and Reid, H. W. (1996). Characterisation of the lymphoproliferation in rabbits experimentally affected with malignant catarrhal fever. *Vet Microbiol* 53 (1-2), 111-9.

Literaturverzeichnis

Schock, A., Collins, R. A. and Reid, H. W. (1998). Phenotype, growth regulation and cytokine transcription in Ovine Herpesvirus-2 (OHV-2)-infected bovine T-cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* 66 (1), 67-81.

Schultheiss, P. C., Collins, J. K., Austgen, L. E. and DeMartini, J. C. (1998). Malignant catarrhal fever in bison, acute and chronic cases. *J Vet Diagn Invest* 10 (3), 255-62.

Schwyzler, M. and Ackermann, M. (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol* 53 (1-2), 17-29.

Schwyzler, M. (2005). *Herpesviren als Erbschleicher*, Chronos-Verlag, Zürich.

Shih, L. M., Zee, Y. C. and Castro, A. E. (1989). Comparison of genomes of malignant catarrhal fever-associated herpesviruses by restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 109 (1-2), 145-51.

Simon, S., Li, H., O'Toole, D., Crawford, T. B. and Oaks, J. L. (2003). The vascular lesions of a cow and bison with sheep-associated malignant catarrhal fever contain ovine herpesvirus 2-infected CD8(+) T lymphocytes. *J Gen Virol* 84 (Pt 8), 2009-13.

Strohbücker, S. (2005). *Vorkommen und klinische Bedeutung von Infektionen mit dem Ovinen Herpesvirus 2 (OHV-2) bei Rindern und Schafen*. Justus-Liebig-Universität Giessen, JLU Giessen.

Swa, S., Wright, H., Thomson, J., Reid, H. and Haig, D. (2001). Constitutive activation of Lck and Fyn tyrosine kinases in large granular lymphocytes infected with the gamma-herpesvirus agents of malignant catarrhal fever. *Immunology* 102 (1), 44-52.

Literaturverzeichnis

Taus, N. S., Traul, D. L., Oaks, J. L., Crawford, T. B., Lewis, G. S. and Li, H. (2005). Experimental infection of sheep with ovine herpesvirus 2 via aerosolization of nasal secretions. *J Gen Virol* 86 (Pt 3), 575-9.

Taus, N. S., Oaks, J. L., Gailbreath, K., Traul, D. L., O'Toole, D. and Li, H. (2006). Experimental aerosol infection of cattle (*Bos taurus*) with ovine herpesvirus 2 using nasal secretions from infected sheep. *Vet Microbiol* 116 (1-3), 29-36.

Taus, N. S., Herndon, D. R., Traul, D. L., Stewart, J. P., Ackermann, M., Li, H., Knowles, D. P., Lewis, G. S. and Brayton, K. A. (2007). Comparison of ovine herpesvirus 2 genomes isolated from domestic sheep (*Ovis aries*) and a clinically affected cow (*Bos bovis*). *J Gen Virol* 88 (Pt 1), 40-5.

Tham, K. M., Ng, K. and Young, L. W. (1994). Polymerase chain reaction amplification of wildebeest-associated and cervine-derived malignant catarrhal fever virus DNA. *Arch Virol* 135 (3-4), 355-64.

Thonur, L., Russell, G. C., Stewart, J. P. and Haig, D. M. (2006). Differential transcription of ovine herpesvirus 2 genes in lymphocytes from reservoir and susceptible species. *Virus Genes* 32 (1), 27-35.

Traul, D. L., Bhushan, B., Eldridge, J. A., Crawford, T. B., Li, H. and Davies, C. J. (2005). Characterization of *Bison bison* major histocompatibility complex class IIa haplotypes. *Immunogenetics* 57 (11), 845-54.

Traul, D. L., Elias, S., Taus, N. S., Herrmann, L. M., Oaks, J. L. and Li, H. (2005). A real-time PCR assay for measuring alcelaphine herpesvirus-1 DNA. *J Virol Methods* 129 (2), 186-90.

Traul, D. L., Li, H., Dasgupta, N., O'Toole, D., Eldridge, J. A., Besser, T. E. and Davies, C. J. (2007). Resistance to malignant catarrhal fever in American bison (*Bison bison*) is associated with MHC class IIa polymorphisms. *Anim Genet* 38 (2), 141-6.

Literaturverzeichnis

Traul, D. L., Taus, N. S., Lindsay Oaks, J., O'Toole, D., Rurangirwa, F. R., Baszler, T. V. and Li, H. (2007). Validation of nonnested and real-time PCR for diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever in clinical samples. *J Vet Diagn Invest* 19 (4), 405-8.

Twomey, D. F., Campbell, I., Cranwell, M. P., Nettleton, P. F. and Sayers, G. (2006). Multisystemic necrotising vasculitis in a pygmy goat (*Capra hircus*). *Vet Rec* 158 (25), 867-9.

VanDevanter, D. R., Warrener, P., Bennett, L., Schultz, E. R., Coulter, S., Garber, R. L. and Rose, T. M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 34 (7), 1666-71.

Vikoren, T., Li, H., Lillehaug, A., Jonassen, C. M., Bockerman, I. and Handeland, K. (2006). Malignant catarrhal fever in free-ranging cervids associated with OvHV-2 and CpHV-2 DNA. *J Wildl Dis* 42 (4), 797-807.

Whitaker, K. A., Wessels, M. E., Campbell, I. and Russell, G. C. (2007). Outbreak of wildebeest-associated malignant catarrhal fever in Ankole cattle. *Vet Rec* 161 (20), 692-5.

Wright, H., Stewart, J. P., Ileri, R. G., Campbell, I., Pow, I., Reid, H. W. and Haig, D. M. (2003). Genome re-arrangements associated with loss of pathogenicity of the gamma-herpesvirus alcelaphine herpesvirus-1. *Res Vet Sci* 75 (2), 163-8.

Zarnke, R. L., Li, H. and Crawford, T. B. (2002). Serum antibody prevalence of malignant catarrhal fever viruses in seven wildlife species from Alaska. *J Wildl Dis* 38 (3), 500-4.

Danksagung

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

Ich möchte allen danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel möchte ich für die Bereitstellung des Themas und für die langjährige Möglichkeit der Mitarbeit in der Diagnostik danken. Außerdem vielen Dank für die schnelle und gründliche Korrektur meiner Arbeit.

Der größte Dank gilt Dr. Matthias König für die vielen guten Ratschläge, die große Geduld und manchmal auch den Wurf ins kalte Wasser. Danke, dass Du so viel gelesen hast in Deiner Jugend, das kann in vielen Punkten sehr hilfreich sein. Nicht nur im Bereich der virologischen Diagnostik und der Doktorarbeit konnte ich viel lernen, jetzt habe ich auch schon einige Probleme der deutschen Grammatik und der Computerlegasthenie überwunden und eine Fortbildung in nonverbaler Kommunikation erhalten.

Herzlichen Dank an Dr. Jens-Ove Heckel. Auch wenn ich natürlich den Tod der Prinz-Alfred-Hirsche sehr bedaure, ohne diesen Vorfall wäre diese Arbeit nie entstanden. Vielen Dank für den erlebnisreichen Tag im Zoo, die vielen Fotos und die Kontakte, die sich durch die gute Zusammenarbeit ergeben haben.

Ein ganz großes Dankeschön an meine beiden Korrekturleser Stefanie Schmeiser und Deborah Basso. Vielen, vielen Dank für die Zeit, die ihr investiert habt, die guten Tips und die schönen Treffen in Hannover, Greifswald und Staffelstein.

Ebenfalls ein ganz großes Dankeschön an meine lieben Kollegen und Freundinnen Barbara Bank-Wolf, Alexandra Petermann, Susanne Schmid, Monika Grimm, Dominique Chauvet, Christina Schichowski, Claudia Lopez Yomayusa, Bettina Castro-Alvarez und Edmilson Oliveira. Ihr habt dafür gesorgt, dass man immer jemanden um Rat fragen konnte, jemand zum gemeinsamen Essen, Lachen oder Feiern bereit war.

Danksagung

Allen Sammlern und Einsendern von Proben, insbesondere von Wildtieren möchte ich ein herzliches Dankeschön sagen. Vielen Dank an Gudrun Wibbelt vom Leibniz Institut für Zoo- und Wildtierforschung für das Sortieren von ganzen Gefriertruhen. Außerdem möchte ich mich bedanken bei dem Institut für Pathologie und der Klinik für Wiederkäuer der Justus-Liebig-Universität Gießen und ebenfalls bei der Veterinärpathologie und Klinik für kleine Klautiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover, hier auch noch mal vielen Dank für die Bereitstellung der Bilder. Allen Tierärzten, Zootierärzten und Pathologen, die mich unterstützt haben, wie Marja Kik, Joeske Ijzer, Jens Thielebein, Kim van de Put, Maya Kummrow, Kadir Yesilbag, Ute Ziegler und vielen mehr: Vielen Dank für das unermüdliche Sammeln von Proben exotischer Tiere!

Labor-Diagnostik Leipzig möchte ich für die freundliche Bereitstellung des BKF-AK-ELISAs und die gute Zusammenarbeit danken.

Ein herzliches Dankeschön allen lieben Kollegen aus der Diagnostik, die auch heute noch bei jedem Wildtier fragend zu mir kommen. Danke für die gute Atmosphäre und die Unterstützung bei der Arbeit.

Anhang

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	13373	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	13375	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	19061	negativ		negativ				Organe		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	19764			negativ				Organe		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	9319	negativ	negativ	negativ				Liquor		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	10844	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	11071	negativ		negativ				Organe		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	17303	negativ	negativ	negativ				Liquor		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23449	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23450	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23451	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23452	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23453	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23454	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23455	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23456	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23457	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23458	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23460	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23462	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	23463	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Alpaka		Camelidae	Lama pacos	26/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		7364	negativ		negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Antilope		Bovidae		8766	negativ		negativ				Tupfer		
Antilope		Bovidae		13432	negativ		negativ				Serum		
Antilope		Bovidae		13662	negativ	negativ	negativ				Liquor		
Antilope		Bovidae		18590	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		18592	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		18594	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		22793	negativ		negativ			negativ	Lunge		
Antilope		Bovidae		22794	negativ		negativ			negativ	Niere		
Antilope		Bovidae		22795	negativ		negativ			negativ	Lunge		
Antilope		Bovidae		22796	negativ		negativ			negativ	Niere		
Antilope		Bovidae		22797	negativ		negativ			negativ	Lunge		
Antilope		Bovidae		22798	negativ		negativ			negativ	Tupfer		
Antilope		Bovidae		26721	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope	Bongo	Bovidae, Bovinae	Tragelaphus eurycerus	8609	negativ	negativ	negativ			negativ	Organe		
Antilope	Bongo	Bovidae, Bovinae	Tragelaphus eurycerus	22837	negativ		negativ				Organe		
Antilope	Bongo	Bovidae, Bovinae	Tragelaphus eurycerus	22840	negativ		negativ				Organe		
Antilope	Bongo	Bovidae, Bovinae	Tragelaphus eurycerus	22843	negativ		negativ				Organe		
Antilope	Dikdik	Bovidae, Antilopinae	Madoqua	17347	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut	AHV-1-PCR negativ	
Antilope	Dikdik	Bovidae, Antilopinae	Madoqua	21849	negativ	negativ	negativ				Tupfer, Organe		
Antilope	Nilgau-Antilope	Bovidae, Bovinae	Boselaphus tragocamelus	62/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20878	negativ		negativ				Nasentupfer		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20879	negativ		negativ				Nasentupfer		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20880	negativ		negativ				Nasentupfer		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20881	negativ		negativ				Nasentupfer		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20883	negativ		negativ				Organe		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20884	negativ		negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20888	negativ		negativ				Organe		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20889	negativ		negativ				Organe		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20890	negativ		negativ				Organe		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20891	negativ		negativ				Zunge		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	20892	negativ		negativ				Lippe		
Antilope	Oryx	Bovidae, Hippotraginae	Oryx leucoryx	323/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope	Säbelantilope	Bovidae, Hippotraginae	Oryx dammah	212/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope	Sitatunga	Bovidae, Bovinae	Tragelaphus spekkii	5999	negativ	negativ	negativ		negativ		Tupfer, EDTA-Blut		
Antilope	Sitatunga	Bovidae, Bovinae	Tragelaphus spekkii	6003	negativ	negativ	negativ		negativ		Tupfer, EDTA-Blut		
Antilope	Sitatunga	Bovidae, Bovinae	Tragelaphus spekkii	6355	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope	Sitatunga	Bovidae, Bovinae	Tragelaphus spekkii	7911	negativ		negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		737	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		741	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		894	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		895	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		896	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		897	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		898	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		899	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		900	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		901	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		3957	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Antilope		Bovidae		16833	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16834	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16835	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16836	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16837	negativ	negativ	negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Antilope		Bovidae		16838	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16839	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16840	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16841	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16842	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16843	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16844	negativ	negativ	negativ				Organe		
Antilope		Bovidae		16845	negativ	negativ	negativ				Organe		
Bison		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	9888	negativ		negativ				Organe		
Bison		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	15821	positiv	positiv	positiv				EDTA-Blut, Serum	BKF-Erkrankung	
Bison		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	19762			negativ				Organe		
Bison		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	23029	negativ	negativ	negativ				Organe		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	20569					negativ		Serum		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	20570					negativ		Serum		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	20571					negativ		Serum		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	20572					negativ		Serum		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	20573					negativ		Serum		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	20574					negativ		Serum		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	20575					negativ		Serum		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	20576					negativ		Serum		
Bison	Präriebison	Bovidae, Bovinae	Bison bison bison	282/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Bison	Waldbison	Bovidae, Bovinae	Bison bison athabascæ	26961	positiv		positiv	OvHV-2		positiv	Organe	BKF-Erkrankung	
Bison		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	208/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Dromedar		Camelidae	Camelus dromedarius	19063	negativ	negativ	negativ				Organe		
Dromedar		Camelidae	Camelus dromedarius	21254	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Dromedar		Camelidae	Camelus dromedarius	21255	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ducker	Gelbrückenducker	Bovidae, Cephalophina	Cephalophus silvicultor	160/08	negativ	negativ	negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ducker	Rodlucker	Bovidae, Cephalophinae	Cephalophus natalensis	6639	negativ		negativ				EDTA-Blut	AIHV-1-PCR negativ	
Elch		Cervidae, Capreolinae	Alces alces	1183	positiv	positiv	positiv				Organe	BKF-Erkrankung	
Elch		Cervidae, Capreolinae	Alces alces	19406	negativ		negativ				Organe		
Elch		Cervidae, Capreolinae	Alces alces	27846	positiv	positiv	positiv	OvHV-2			Organe	BKF-Erkrankung	
Elch		Cervidae, Capreolinae	Alces alces	21078	negativ	negativ	negativ				Organe		
Elch		Cervidae, Capreolinae	Alces alces	22166	positiv	positiv	negativ				Organe	BKF-Erkrankung	
Elch		Cervidae, Capreolinae	Alces alces	22529	negativ	negativ	negativ				Organe		
Gams		Bovidae, Rupicaprinae	Rupicapra rupicapra	159/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Gayal		Bovidae, Bovinae	Bos gaurus frontalis	34/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Gayal		Bovidae, Bovinae	Bos gaurus frontalis	394/07	negativ	negativ	positiv	negativ		negativ	Organe	ORF73-PCR positiv	
Gazelle	Mhorr gazelle	Bovidae, Antilopinae	Gazella dama mhorr	22528	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Gazelle	Mhorr gazelle	Bovidae, Antilopinae	Gazella dama mhorr	227/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Gazelle	Mhorr gazelle	Bovidae, Antilopinae	Gazella dama mhorr	68/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Gazelle	Thomson Gazellen	Bovidae, Antilopinae	Eudorcas thomsoni	6753	negativ	negativ	negativ			positiv	Organe	AIHV-1-PCR negativ, EHV-PCR positiv, Seq zwischen EHV-1 und EHV-9	
Gazelle	Thomson Gazellen	Bovidae, Antilopinae	Eudorcas thomsoni	6754	negativ	negativ	negativ			negativ	Organe	AIHV-1-PCR negativ, EHV-PCR negativ	
Gazelle	Thomson Gazellen	Bovidae, Antilopinae	Eudorcas thomsoni	6755	negativ	negativ	negativ			positiv	Organe	AIHV-1-PCR negativ, EHV-PCR positiv, Seq zwischen EHV-1 und EHV-9	

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Gazelle	Thomson Gazellen	Bovidae, Antilopinae	Eudorcas thomsoni	6756	negativ	negativ	negativ			positiv	Organe	negativ, EHV-PCR positiv, Seq zwischen EHV-1 und EHV-9	
Gazelle	Thomson Gazellen	Bovidae, Antilopinae	Eudorcas thomsoni	6757	negativ	negativ	negativ			positiv	Organe	AIHV-1-PCR negativ, EHV-PCR positiv, Seq zwischen EHV-1 und EHV-9	
Gazelle		Bovidae		3853	negativ	negativ	negativ				Organe		
Gerenuk		Bovidae, Antilopinae	Litocranius walleri	7599	negativ	negativ	negativ			negativ	Organe		
Gnu		Bovidae, Alcelaphinae	Connochaetes	26300	negativ	negativ	negativ				Organe	AIHV-1-PCR negativ	
Gnu	Streifengnu	Bovidae, Alcelaphinae	Connochaetes taurinus	6638	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut	AIHV-1-PCR negativ	
Gnu	Streifengnu	Bovidae, Alcelaphinae	Connochaetes taurinus	7882	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		negativ
Gnu		Bovidae, Alcelaphinae	Connochaetes	2919					negativ		Serum		
Goral	Mittelchinesischer Goral	Bovidae, Caprinae	Naemorhedus goral	280/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch		Cervidae		6864	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch		Cervidae		11066	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch		Cervidae		11068	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Bucharahirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus elaphus bactrianus	23/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Damwild	Cervidae, Cervinae	Elaphodus cephalophus	1644	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Hirsch	Damwild	Cervidae, Cervinae	Elaphodus cephalophus	3637	negativ	negativ	negativ			negativ	DNA		
Hirsch	Damwild	Cervidae, Cervinae	Elaphodus cephalophus	18787	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Damwild	Cervidae, Cervinae	Elaphodus cephalophus	23296	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Hirsch	Damwild	Cervidae, Cervinae	Elaphodus cephalophus	27865	negativ	negativ	negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Hirsch	Davidshirsch	Cervidae, Cervinae	Elaphurus davidianus	20932	positiv	positiv	positiv				EDTA-Blut	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Davidshirsch	Cervidae, Cervinae	Elaphurus davidianus	61/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Dybowski-	Cervidae, Cervinae	Cervus nippon hortulorum	18548	positiv	positiv	positiv				Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Sikahirsch	Cervidae, Cervinae	Axis axis	19/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Indischer Axischirsch	Cervidae, Cervinae	Axis axis	193/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Indischer Axischirsch	Cervidae, Cervinae	Axis axis	337/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Indischer Schweinhirsch	Cervidae, Cervinae	Axis porcinus	5/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Leierhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus eldi	337/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Leierhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus eldi	337/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Leierhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus eldi	350/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Leierhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus eldi	360/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Mesopotamischer Damhirsch	Cervidae, Cervinae	Dama dama mesopotamica	19528	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Mesopotamischer Damhirsch	Cervidae, Cervinae	Dama dama mesopotamica	336/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	3524	positiv	positiv	positiv	OvHV-2			Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	3525	positiv	positiv	positiv	OvHV-2			Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	3526	positiv	positiv	positiv	OvHV-2			Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	3527	negativ	negativ	negativ	negativ			Organe		
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	3528	positiv	positiv	positiv	OvHV-2			Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	24592	positiv	positiv	negativ	CpHV-2	positiv	positiv	EDTA-Blut, Organe, Tupfer	BKF-Erkrankung	27
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	24594	positiv	positiv	negativ				EDTA-Blut, Organe, Tupfer	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	llongo	positiv	positiv	negativ		positiv		Paraffineingebettete Organe	BKF-Erkrankung	negativ
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	Lilly	negativ	negativ	negativ		negativ		Serum		negativ
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	Lisay	negativ	negativ	negativ		positiv		Serum	BKF-Erkrankung	9
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	N140	negativ	negativ	negativ		negativ		Serum		negativ

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	N145	negativ	negativ	negativ		negativ		Serum		negativ
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	N156	negativ	negativ	negativ		negativ		Serum		negativ
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	N158	negativ	negativ	negativ		negativ		Serum		negativ
Hirsch	Prinz-Alfred-Hirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus alfredi	N97	negativ	negativ	negativ		negativ		Serum		negativ
Hirsch	Rothirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus elaphus	19092	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Rothirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus elaphus	44/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Sambar	Cervidae, Cervinae	Rusa unicorn	12/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Sambar	Cervidae, Cervinae	Rusa unicorn	19_06	positiv	positiv	positiv				Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Sambar	Cervidae, Cervinae	Rusa unicorn	294/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Sambar	Cervidae, Cervinae	Rusa unicorn	324/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Sambar	Cervidae, Cervinae	Rusa unicorn	324/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Sambar	Cervidae, Cervinae	Rusa unicorn	325/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Sikahirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus nippon	24843	positiv	positiv	positiv				Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Sikahirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus nippon	24850	positiv	positiv	positiv				Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Sikahirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus nippon	141/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Timorhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus timorensis	2146	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Timorhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus timorensis	19944	positiv	positiv	positiv				Organe	BKF-Erkrankung	
Hirsch	Timorhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus timorensis	170/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Timorhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus timorensis	175/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Timorhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus timorensis	39/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Timorhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus timorensis	79/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch	Weißlippenhirsch	Cervidae, Cervinae	Cervus albirostris	317/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Hirsch		Cervidae		21114	positiv	positiv	positiv	OvHV-2		negativ	Organe	BKF-Erkrankung	
Kamel		Camelidae		1120	negativ	negativ	negativ				Organe		
Kerabau		Bovidae, Bovinae	Bubalus bubalis	186/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Klippspringer		Bovidae, Antilopinae	Oreotragus oreotragus	2030	negativ	negativ	negativ				Serum		
Lama		Camelidae	Lama glama	1178	negativ	negativ	negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Lama		Camelidae	Lama glama	3867			negativ				Organe		
Lama		Camelidae	Lama glama	3884			negativ				Organe		
Mähnspringer		Caprinae, Bovidae	Ammotragus lervia	20027	negativ	negativ	negativ		positiv		EDTA-Blut, Serum		
Mähnspringer		Caprinae, Bovidae	Ammotragus lervia	20030	negativ	negativ	negativ		positiv		EDTA-Blut, Serum		
Mähnspringer		Caprinae, Bovidae	Ammotragus lervia	20033	negativ	negativ	negativ		positiv		EDTA-Blut, Serum		
Moschusochse		Bovidae, Bovinae	Ovibos moschatus	296/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Moschusochse		Bovidae, Bovinae	Ovibos moschatus	298/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Mufflon		Caprinae, Bovidae	Ovis orientalis orientalis	19065	negativ	negativ	negativ				Organe		
Mufflon		Caprinae, Bovidae	Ovis orientalis orientalis	22532	negativ	negativ	negativ				Organe		
Mufflon		Caprinae, Bovidae	Ovis orientalis orientalis	10246	negativ	negativ	positiv		positiv		EDTA-Blut		
Mufflon		Caprinae, Bovidae	Ovis orientalis orientalis	10248	positiv	positiv	positiv		positiv		EDTA-Blut		
Mufflon		Caprinae, Bovidae	Ovis orientalis orientalis	10250	positiv	positiv	positiv		positiv		EDTA-Blut		
Mufflon		Caprinae, Bovidae	Ovis orientalis orientalis	10252	negativ	positiv	positiv		positiv		EDTA-Blut		
Mufflon		Caprinae, Bovidae	Ovis orientalis orientalis	196/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Mufflon		Caprinae, Bovidae	Ovis orientalis orientalis	Debo					negativ		Serum		
Netzgiraffe		Giraffidae	Giraffa camelopardalis reticulata	327/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Netzgiraffe		Giraffidae	Giraffa camelopardalis reticulata	328/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Pudu		Cervidae, Capreolinae	Pudu	1730	negativ	negativ	negativ				Tupfer, Organe		
Pudu		Cervidae, Capreolinae	Pudu	3529	negativ	negativ	negativ	negativ			Organe		
Pudu		Cervidae, Capreolinae	Pudu	15329	negativ	negativ	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Pudu		Cervidae, Capreolinae	Pudu	20036	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut, Serum		
Pudu		Cervidae, Capreolinae	Pudu	20039	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut, Serum		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	19067	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	19068	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	19069	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	19071	negativ	negativ	negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	19072	negativ		negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	22255	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	25034	positiv	positiv	positiv			negativ	Organe	BKF-Erkrankung	
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	153/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	165/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	195/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	200/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	205/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	230/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	234/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	235/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	378/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	379/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	19407	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh		Cervidae, Capreolinae	Capreolus capreolus	25509	negativ	negativ	negativ				Organe		
Reh	Karibu	Cervidae, Capreolinae	Rangifer tarandus	21481	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut, Serum		
Reh	Karibu	Cervidae, Capreolinae	Rangifer tarandus	21482	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut, Serum		
Reh	Karibu	Cervidae, Capreolinae	Rangifer tarandus	21483	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut, Serum		
Riedbock	Bergriedbock	Bovidae, Reduncinae	Redunca fulvorufula	19056	negativ	negativ	negativ				Organe		
Riedbock	Bergriedbock	Bovidae, Reduncinae	Redunca fulvorufula	19057	negativ	negativ	negativ				Organe		
Riedbock	Bergriedbock	Bovidae, Reduncinae	Redunca fulvorufula	19058	negativ	negativ	negativ				Organe		
Riedbock	Bergriedbock	Bovidae, Reduncinae	Redunca fulvorufula	70/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Riedbock		Bovidae, Reduncinae	Redunca fulvorufula	01/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Rind	Watussirind	Bovidae, Bovinae	Bos taurus	11228	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut	AIHV-1-PCR negativ	
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	754	positiv	positiv	positiv				Organe		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	3558	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	3559	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	3560	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	3561	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	3562	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	9627	positiv		positiv				Organe		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	11538	positiv		positiv				Organe		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	14563			negativ				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	14564			positiv				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	14565			positiv				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	14566			negativ				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	14567			positiv				EDTA-Blut	ORF73-PCR positiv	
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	14568			positiv				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	14569			positiv				EDTA-Blut		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	19665	positiv		positiv				Geschässel		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	19765			positiv				Organe		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	19886	negativ		positiv				Organe		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	20900	positiv		positiv				Organe		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	21394	positiv		positiv				Organe		
Schaf	Braunes Bergschaf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	20902	positiv		positiv				Organe		
Schaf	grau gehörnte Heidschnucke	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	351/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Schaf	Heidschnucke	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	20901	negativ		negativ				Organe		
Schaf	Hissar-Schaf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	19070	positiv		positiv				Organe		
Schaf	Kamerunschaf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	2447	positiv		positiv				Organe		
Schaf	Kamerunschaf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	217/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Schaf	Kreishornschauf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon cycloceros	19064	negativ		negativ				Organe		
Schaf	Kreishornschauf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon cycloceros	158/08	negativ	negativ	negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Schaf	Kreishornschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon cycloceros	185/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Schaf	Kreishornschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon cycloceros	213/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Schaf	Mähnschaf	Bovidae, Caprinae	Ammotragus lervia	23291	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Schaf	Mähnschaf	Bovidae, Caprinae	Ammotragus lervia	24889	negativ	negativ	negativ	negativ			Organe		
Schaf	Merino	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	6625			positiv				Organe		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	2022	negativ		positiv				Organe		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	19920	negativ	negativ	negativ				Tupfer		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	19921	negativ	negativ	negativ				Tupfer		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	19922	positiv	positiv	positiv				Tupfer		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	19923	negativ	negativ	negativ				Tupfer		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	21229					positiv		Serum		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	21230					positiv		Serum		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	21231					negativ		Serum		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	21232					positiv		Serum		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	21233					negativ		Serum		
Schaf	Quessantschaf f	Bovidae, Caprinae	Ovis orientalis aries	21234					positiv		Serum		
Schaf	Schwarzkopf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	22203	positiv		positiv				Organe		
Schaf	Schwarznaesenschaf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	105/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Schaf	Schwarznaesenschaf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	74/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Schaf	Walliser Schwarznaesenschaf	Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	207/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	48	positiv		positiv	OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		<=47
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	49	negativ		positiv	OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		<=5
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	50	negativ		positiv	OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		<=5
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	11239	positiv		positiv				Organe		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	21228					positiv		Serum		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	OM 83	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	OM 84	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	OM 86	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	OM 89	negativ	negativ	positiv	OvHV-2			DNS		
Schaf		Bovidae, Caprinae	Ovis ammon	OM 92	positiv	negativ	positiv	OvHV-2			DNS		
Steinbock		Bovidae, Caprinae	Capra ibex	19086	negativ	negativ	negativ				Organe		
Steinbock	Alpensteinbock	Bovidae, Caprinae	Capra ibex	40/08	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			Organe		
Steinbock	nub. Steinbock	Bovidae, Caprinae	Capra ibex nubiana	20882	positiv	positiv	negativ	CpHV-2		negativ	Organe		
Steinbock	nub. Steinbock	Bovidae, Caprinae	Capra ibex nubiana	20885	positiv	positiv	negativ	CpHV-2 und OvHV-2		negativ	Organe		
Steinbock	nub. Steinbock	Bovidae, Caprinae	Capra ibex nubiana	20886	positiv	positiv	negativ			negativ	Organe		
Steinbock	nub. Steinbock	Bovidae, Caprinae	Capra ibex nubiana	20887	positiv	positiv	negativ			negativ	Organe		
Steinbock	Westkaukasischer Steinbock	Bovidae, Caprinae	Capra caucasica	15327	positiv	positiv	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Steinbock	Westkaukasischer Steinbock	Bovidae, Caprinae	Capra caucasica	15328	positiv	positiv	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Steinbock		Bovidae, Caprinae	Capra ibex	13829	positiv	positiv	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Steinbock		Bovidae, Caprinae	Capra ibex	13831	positiv	positiv	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Steinbock		Bovidae, Caprinae	Capra ibex	19050	negativ	negativ	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Steinbock		Bovidae, Caprinae	Capra ibex	19053	negativ	negativ	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Trampellier		Camelidae	Camelus bactrianus	23148	negativ	negativ	negativ				Organe		
Trampellier		Camelidae	Camelus bactrianus	23187	negativ	negativ	negativ				Organe		
Trampellier		Camelidae	Camelus bactrianus	237/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Trampellier		Camelidae	Camelus bactrianus	405/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Vikunja		Camelidae	Vicugna vicugna	16709	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut		
Vikunja		Camelidae	Vicugna vicugna	16711	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut		
Wasserbock	Ellipsenwasserbock	Bovidae, Reduncinae	Kobus ellipsiprymnus	197/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Wasserbock	Ellipsenwasserbock	Bovidae, Reduncinae	Kobus ellipsiprymnus	221/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Wasserbock	Ellipsenwasserbock	Bovidae, Reduncinae	Kobus ellipsiprymnus	241/07	negativ	positiv	negativ				Organe	Zellkultur auf MDBK/SFT-R negativ	

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Wasserbüffel		Bovidae, Bovinae	Bubalus arnee	13926	negativ		negativ		negativ		Serum, EDTA-Blut		
Wisent		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	19059	negativ		negativ				Organe		
Wisent		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	21313	negativ		negativ				Organe		
Wisent		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	26724	negativ	negativ	negativ				Organe		
Wisent		Bovidae, Bovinae	Bison bonasus	20956	negativ		negativ				Organe		
Yak		Bovidae, Bovinae	Bos grunniens	20855	negativ		negativ				Organe		
Yak		Bovidae, Bovinae	Bos grunniens	20899	negativ		negativ				Organe		
Yak		Bovidae, Bovinae	Bos grunniens	21925	negativ		negativ				Organe		
Zebu	Zwergzebu	Bovidae, Bovinae	Bos primigenius indicus	21670	negativ	negativ	negativ				Tupfer		
Zebu	Zwergzebu	Bovidae, Bovinae	Bos primigenius indicus	21671	negativ	negativ	negativ				Tupfer		
Zebu	Zwergzebu	Bovidae, Bovinae	Bos primigenius indicus	21672	negativ	negativ	negativ				Tupfer		
Zebu	Zwergzebu	Bovidae, Bovinae	Bos primigenius indicus	21673	negativ	negativ	negativ				Tupfer		
Zebu	Zwergzebu	Bovidae, Bovinae	Bos primigenius indicus	22513					negativ		Serum		
Zebu	Zwergzebu	Bovidae, Bovinae	Bos primigenius indicus	22514					negativ		Serum		
Zebu	Zwergzebu	Bovidae, Bovinae	Bos primigenius indicus	22515					positiv		Serum		
Zebu	Zwergzebu	Bovidae, Bovinae	Bos primigenius indicus	22516					negativ		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	98	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	99	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	2770	positiv		positiv				Organe		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	3553	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	3554	positiv		negativ				EDTA-Blut		

Tierart	Rasse	Familie, Unterrfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchun gsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	hircus Capra aegagrus f. hircus	3555	positiv		negativ	CphV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	3556	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	3557	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	6324	positiv	positiv	negativ				Organe		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8935	negativ		negativ		positiv		EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	11358	negativ		negativ				Nasentupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	12346	negativ		negativ				Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	12357	positiv		positiv				Organe	BKF- Erkrankung	
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	19416	positiv		negativ				EDTA-Blut, Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	20062	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	21121	positiv		negativ	CphV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22475	negativ		negativ		negativ		EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22806	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22992	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	23292	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	23293	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	23294	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	23295	positiv		negativ				EDTA-Blut		

Anhang

Tierart	Rasse	Familie, Untertamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	hircus Capra aegagrus f. hircus	24890	positiv		positiv	negativ			Organe		
Ziege	Girgentanaziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22512					negativ		Serum		
Ziege	Girgentanische Ziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	19062	negativ		negativ				Organe		
Ziege	Langohrziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	176/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Ziege	Langohrziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	177/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Ziege	Owamboziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22510					positiv		Serum		
Ziege	Owamboziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22511					positiv		Serum		
Ziege	Schneeziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	19055	negativ		negativ				Organe		
Ziege	Schneeziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	19060	negativ		negativ				Organe		
Ziege	Schneeziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	171/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Ziege	Schneeziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	172/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Ziege	Schraubenziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	11581	positiv	positiv	negativ		positiv		Serum		
Ziege	Schraubenziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	11582	positiv	positiv	negativ		positiv		Serum		
Ziege	Schraubenziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	11583	positiv	positiv	positiv		positiv		Serum		
Ziege	Schraubenziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	35/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Ziege	Schraubenziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	393/07	negativ	negativ	negativ				Organe		
Ziege	Walliser Ziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	162/08	negativ	negativ	negativ				Organe		
Ziege	Walliser Ziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	163/08	negativ	negativ	negativ				Organe		

Tierart	Rasse	Familie, Unterrfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	hircus Capra aegagnus f. hircus	10254	positiv	positiv	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	10256	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	10258	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	10260	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	16295	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	16297	negativ	negativ	negativ		negativ		EDTA-Blut		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	16311	negativ	negativ	negativ		positiv		EDTA-Blut		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22492					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22493					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22494					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22495					negativ		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22496					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22497					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22498					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22499					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22500					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22501					negativ		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	22502					positiv		Serum		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	hircus Capra aegagrus f. hircus	22503					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22504					negativ		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22505					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22506					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22507					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22508					positiv		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22509					negativ		Serum		
Ziege	Zwergziege	Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	26484	positiv		negativ				Organe		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	1Eva	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	1LD	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	1Ri	positiv		positiv				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	2LD	negativ		negativ	negativ	negativ		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	2Eva	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	2Ri	positiv		positiv				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	3LD	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	3Eva	positiv	positiv	negativ			negativ	EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	3Ri	positiv		positiv				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	4LD	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		<=16

Tierart	Rasse	Familie, Untertamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	4Eva	positiv		negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	4Ri	positiv		schwach positiv				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	5Eva	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	5Ri	positiv		negativ				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	5LD	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	6Ri	negativ		negativ				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	6Eva	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	6LD	positiv		positiv	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	7LD	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	7Ri	negativ		negativ				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	7Eva	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8Eva	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8LD	positiv		positiv	OvHV-2	negativ		EDTA-Blut		27
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8Ri	positiv		positiv				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	9LD	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	9Eva	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	9Ri	positiv		positiv				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	10LD	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ

Tierart	Rasse	Familie, Untertamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	hircus Capra aegagrus f. hircus	10Eva	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	10Ri	positiv		positiv				DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	11	positiv		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	12	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	13	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	14	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	15	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		3
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	16	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	18	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	19	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	20	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		9
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	21	schwach positiv		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		<=3
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	23	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	24	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	25	negativ		negativ	negativ	negativ		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	26	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	27	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		16
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	28	negativ		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	29	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	30	positiv		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		9
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	31	negativ		negativ	negativ	negativ		EDTA-Blut		3
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	32	positiv		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	33	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	34	schwach positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	35	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		3
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	36	negativ		positiv	OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	37	negativ		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	38	positiv		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		3
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	39	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		5
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	40	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		5
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	41	negativ		negativ	negativ	nicht auswertbar		EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	42	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	43	positiv		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		3

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	44	positiv		positiv	CpHV-2 und OvHV-2	positiv		EDTA-Blut		5
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	45	negativ		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	46	positiv		negativ	CpHV-2	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	47	negativ		negativ	negativ	positiv		EDTA-Blut		negativ
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	1516	negativ	negativ	negativ				Organe		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	2916	negativ	negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	3955	negativ	negativ	positiv				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8702				negativ			EDTA-Blut, Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8705				negativ			EDTA-Blut, Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8708				CpHV-2			EDTA-Blut, Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8711				negativ			EDTA-Blut, Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8714				negativ			EDTA-Blut, Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	8717				negativ			EDTA-Blut, Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	9015	positiv	positiv	negativ				EDTA-Blut, Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	9364	positiv		negativ		positiv		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	12080					negativ		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17425		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17427		negativ	negativ				EDTA-Blut		

Tierart	Rasse	Familie, Unterrfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchun- gsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17429		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17431		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17433		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17435		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17437		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17439		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17441		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17443		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17445		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	17447		negativ	negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	18285		negativ	negativ				Tupfer, EDTA- Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	18288		negativ	negativ				Tupfer, EDTA- Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	18291		positiv	negativ				Tupfer, EDTA- Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	18294		negativ	negativ				Tupfer, EDTA- Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	19924	negativ	negativ	negativ				Tupfer		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	21225					positiv		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	21226					positiv		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	21227					negativ		Serum		

Tierart	Rasse	Familie, Unterrfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchun gsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21377				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21381	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21383				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21390				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21392	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21420				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21421	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21426				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21440	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21447				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21449				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21461	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21462	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21464				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21468				CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21469	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21473	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagnus f. hircus	21474	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			EDTA-Blut		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	21476				negativ			EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22020					positiv		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22065					negativ		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22066					positiv		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22067					negativ		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22068					negativ		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22069					negativ		Serum		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	22992		positiv					EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	25058	positiv		positiv				Organe	BKF-Erkrankung	
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	25550	positiv		positiv			positiv	Organe	BKF-Erkrankung, ORF73-PCR positiv	
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	25551	positiv		positiv				Organe	BKF-Erkrankung	
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	25653	positiv		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	13407/Kron	positiv		positiv				Serum, EDTA-Blut	BKF-Erkrankung	
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	1905KY	positiv		positiv			negativ	EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	Bulz	positiv		negativ				EDTA-Blut		16
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	Hennes	negativ		negativ				EDTA-Blut		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT01	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT02	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		

Tierart	Rasse	Familie, Unterfamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT03	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT04	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT05	negativ	negativ	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT05	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT05	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT08	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT09	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT10	negativ	negativ	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT11	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT12	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT13	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT14	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	MT15	positiv	positiv	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG03	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG05	negativ	positiv	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG07	negativ	positiv	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG10	positiv	negativ	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG11	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		

Anhang

Tierart	Rasse	Familie, Untertamilie	lat.	Bezeichnung	GlyB-PCR	Pol-PCR	Teg-PCR	realtime-PCR	ELISA	PAN-Herpes	Untersuchungsmaterial	Bemerkungen	SNT (1:x)
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG13	negativ	positiv	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG14	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG15	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG17	positiv	positiv	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG18	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG20	positiv	positiv	negativ	fraglich			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG28	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG29	positiv	positiv	negativ	CpHV-2			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG33	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		
Ziege		Bovidae, Caprinae	Capra aegagrus f. hircus	ZG34	negativ	negativ	negativ	negativ			DNS		



© Jens-Ove Heckel



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: 978-3-8359-5771-8



9 783835 195771 8