



Nationales  
**Symposium**  
für Zoonosenforschung

7.- 8. Oktober 2009 | Berlin

**2009**

Programm und Abstractband



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

Organisation | Ansprechpartner  
Geschäftsstelle der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen  
Standort Berlin  
Tel.: 030 - 31 01 19 70  
E-Mail: [info@zoonosen.net](mailto:info@zoonosen.net)  
Internet: [www.zoonosen.net](http://www.zoonosen.net)





**Herausgeber**

Nationale Forschungsplattform für Zoonosen  
c/o TMF e.V.  
Neustädtische Kirchstr. 6  
10117 Berlin

## Inhaltsverzeichnis

Grußwort des Bundesministeriums für Bildung und Forschung .....	2
Grußwort der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen .....	4
Programm .....	7
Über die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen .....	14
Forschungsförderung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen .....	18
Vorträge.....	20
Keynote-Vorträge.....	21
Verbund- und Projektpräsentationen .....	23
BMELV-Projekt zur aviären Influenza.....	35
Forschungs-Sofortprogramm Influenza an den Ressortforschungseinrichtungen .....	39
Workshop Immunität .....	42
Workshop Diagnostik und Epidemiologie I.....	56
Workshop Diagnostik und Epidemiologie II.....	72
Poster: Immunität.....	88
Poster: Diagnostik.....	107
Poster: Epidemiologie und Surveillance .....	149
Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen .....	194
Geschäftsordnung für Projektantragsverfahren .....	204
Teilnehmerverzeichnis.....	210

## **Grußwort des Bundesministeriums für Bildung und Forschung**

Bei fast allen neuen Erregern der vergangenen Jahre, so bei SARS, der Vogelgrippe und zuletzt in diesem Jahr bei der Neuen Influenza A/H1N1 bekannt als „Schweinegrippe“ – handelt es sich um Zoonosen, Erreger, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden. Diese Infektionskrankheiten haben in den zurückliegenden Jahren stark zugenommen. Gründe dafür sind neben der gestiegenen Mobilität und der weltweit wachsenden Bevölkerung auch die Veränderungen in der Nutztierzucht und -haltung.

Nahezu zwei Drittel aller bekannten humanpathogenen Erreger werden vom Tier auf den Menschen weitergegeben. Daher brauchen wir dringend ein besseres Verständnis über den Übergang des Erregers vom Tier auf den Menschen und über die Anpassungsvorgänge im neuen Wirt. Nur so können notwendige Maßnahmen zur Prävention und Therapie dieser zoonotischen Infektionskrankheiten entwickelt werden.

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Forschung zu zoonotischen Infektionskrankheiten ist die intensive Zusammenarbeit von Vertretern aus Human- und Veterinärmedizin.

Vor diesem Hintergrund hat die Bundesregierung bereits 2006 ressortübergreifend Maßnahmen zur Zoonosenforschung initiiert. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung stellt dafür rund 30 Millionen Euro zur Verfügung. Ein zentrales Anliegen ist der Aufbau geeigneter Strukturen für die interdisziplinäre Zusammenarbeit. Gefördert werden neun interdisziplinäre Forschungsverbünde zu unterschiedlichen zoonotischen Infektionskrankheiten.

Um einen regelmäßigen wissenschaftlichen Austausch der Zoonosenforscher in Deutschland zu ermöglichen, hat das BMBF federführend ein jährliches Treffen der Wissenschaftler in Berlin initiiert. Im September 2007 trafen sich die Zoonosenforscher erstmals. Im Oktober 2008 wurde die zweite Veranstaltung ebenfalls mit großer Resonanz durchgeführt.

Ich freue mich, dass das jährliche Treffen der Zoonosenforscher inzwischen zu einer festen Institution wird und dieses Jahr zum dritten Mal stattfindet. Die Organisation des Symposiums übernimmt seit diesem Jahr die Geschäftsstelle der Forschungsplattform für Zoonosen. Mit der vom BMBF geförderten Forschungsplattform wird ein umfangreiches

# Grußwort des Bundesministeriums für Bildung und Forschung

---

Informations- und Servicenetzwerk für alle in Deutschland aktiven Forschungsgruppen im Bereich der Zoonosen etabliert.

Ich wünsche allen Teilnehmern erfolgreiche Tage und anregende Diskussionen in Berlin.

MinR´in Dr. Gabriele Hausdorf

### **Grußwort der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen**

Der Tradition der Zoonosen-Workshops aus den Jahren 2007 und 2008 folgend, findet dieses Jahr das Nationale Symposium für Zoonosenforschung erstmals unter der Leitung der neu gegründeten Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen statt. Das Symposium soll im Gegensatz zu den Strategie-orientierten Workshops der letzten Jahre, nun eine verstärkt wissenschaftliche Ausrichtung haben und steht daher allen Wissenschaftlern, die in Deutschland an Zoonosen arbeiten und forschen, offen.

Erstmals wurde allen interessierten Wissenschaftlern ermöglicht, zu diesem Symposium Beiträge zu den Forschungsbereichen Immunität, Diagnostik und Epidemiologie einzureichen. Besonders herausragende Forschungsergebnisse werden im Rahmen des Symposiums als Vorträge präsentiert. Darüber hinaus wird mit Posterpräsentationen die breite Forschungsaktivität abgebildet. An dieser Stelle möchten wir allen Teilnehmern danken, die einen Beitrag eingereicht haben und auf diese Weise zum Gelingen des Symposiums beigetragen haben.

Die Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen möchte auf diesem Weg zu einer zunehmenden Vernetzung zwischen der human- und veterinärmedizinischen Forschung in Deutschland beitragen und insbesondere dem wissenschaftlichen Nachwuchs in angenehmer Umgebung die Gelegenheit geben, sich kennenzulernen und auszutauschen.

Bitte treten Sie der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen als neue Mitglieder zahlreich bei und gestalten Sie Ihr Arbeitsumfeld in der Zoonosenforschung in Deutschland aktiv mit. Der alljährlich anlässlich des Symposiums durch die Mitglieder gewählte Interne Beirat soll Ihre Interessen wahrnehmen und die Aktivitäten der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen lenken.

Wir möchten unserem Förderer, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, danken, das den Start der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen ermöglicht und bestens begleitet hat. Ebenso möchten wir den Keynote-Speakern und den Moderatoren der Sitzungen unseren Dank aussprechen, die jeder einzeln zur Gestaltung des Programms beigetragen haben.

## Grußwort der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

Wir freuen uns mit Ihnen auf ein spannendes Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2009 und wünschen Ihnen allen zwei beruflich erfolgreiche und persönlich bereichernde Tage in Berlin.



Prof. Dr. S. Ludwig

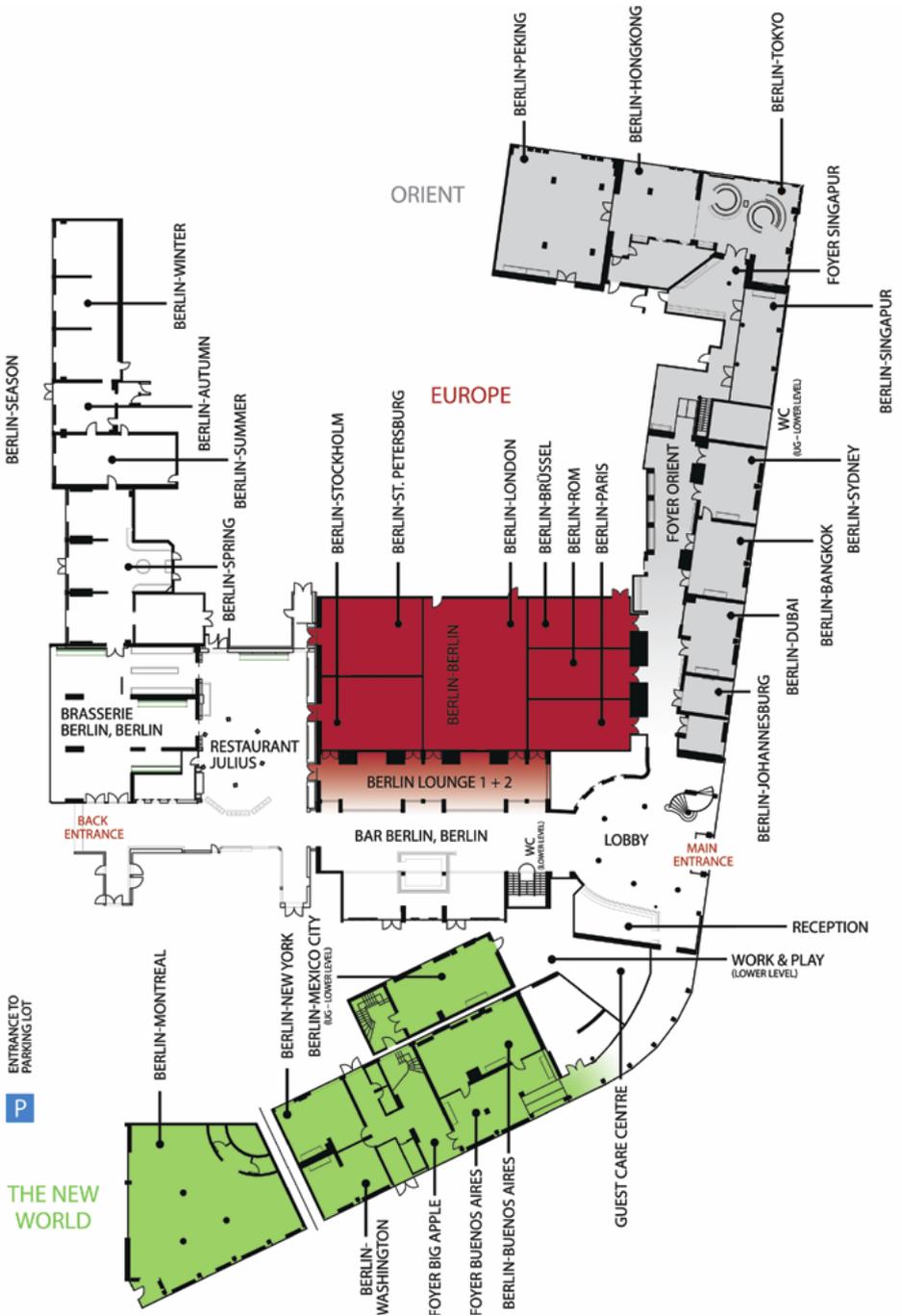


Prof. Dr. M. Groschup



S.C. Semler

# Grüßwort der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen



## Programm

### 1. Tag (Mittwoch, 07.10.09)

Ab 9.00 Uhr: **Registrierung**

11.00 Uhr: **Begrüßung**

Vertreter der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

**Grußworte**

Vertreter des Bundesministeriums für Bildung und Forschung

### 1. Session: Bakterien – Prof. Dr. Allerberger, Graz

11.15 Uhr: **BMBF-Verbund Botulinom**

Prof. Dr. Böhnelt, Göttingen und Prof. Dr. Dressler, Hannover

Chronischer humaner Botulismus in einem landwirtschaftlichen Betrieb mit chronischem Rinderbotulismus

11.35 Uhr: **BMBF-Verbund FBI-Zoo**

Dr. Mellmann, Münster

Singlelocus Sequenztypisierung (SLST) von Zoonoseerregern

11.55 Uhr: **BMBF-Verbund ZooMAP**

Prof. Dr. Hornef, Hannover

Internalisierungsabhängige Erkennung von Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis durch intestinale Epithelzellen

12.15 Uhr: **BMELV-Projekt: MAP bei Rindern**

PD Dr. Menge, Jena

Neu Ansätze für die Frühdiagnostik der bovinen MAP-Infektion

12.30 Uhr: **BMBF-Verbund Q-Fieber**

PD Dr. Neubauer, Jena und Dr. Brockmann, Stuttgart

Prävalenz, Risikofaktoren und klinischer Verlauf des Q-Fiebers beim Menschen

- 12.50 Uhr: **BMBF-Verbund Zoonotische Chlamydien**  
Dr. Sachse, Jena und Prof. Dr. Essig, Ulm  
Identification of immunoreactive proteins in ovine and human Chlamydia abortus infection
- 13.10 Uhr: **P A U S E**
- 2. Session: Parasiten & Viren – Prof. Dr. Groschup, Insel Riems**
- 14.00 Uhr: **BMBF-Verbund Toxonet01**  
Prof. Dr. Schlüter, Magdeburg und Prof. Dr. Däubener, Düsseldorf  
Cellular and humoral immune reactions during toxoplasmosis: Importance in parasite resistance and diagnostic
- 14.20 Uhr: **BMBF-Verbund SARS**  
Prof. Dr. Drosten, Bonn und PD Dr. Pöhlmann, Hannover  
Bedeutung von TMPRSS2 für die Ausbreitung von Influenza und anderen respiratorischen Viren
- 14.40 Uhr: **BMBF-Forschungsverbund Arboviren**  
Prof. Dr. Hufert, Göttingen und Dr. Weidmann, Göttingen  
Development of new diagnostic tools for the detection of european arboviruses
- 15.00 Uhr: **BMELV-Projekt: West-Nile-Virus**  
Dr. Ulbert, Leipzig  
West-Nile-Virus: Impfstoffentwicklung und epidemiologische Studien
- 15.15 Uhr: **BMBF-Verbund FluResearchNet**  
Prof. Dr. Haller, Freiburg  
Interferons as emergency antiviral agents against highly pathogenic influenza A viruses: efficacy evaluation in animal transmission models
- 15.35 Uhr: **BMELV-Projekte zur aviären Influenza**  
Entwicklung innovativer Therapieformen  
Dr. Pauli, Erlangen

Innovatives Barriersystem gegen aviäre Influenza  
für die Freilandhaltung  
Prof. Dr. Bauer, München

16.05 Uhr: **P A U S E**

16.20 Uhr: **Forschungs-Sofortprogramm Influenza und  
aktuelle Entwicklungen im Bereich der  
Neuen Grippe - Prof. Dr. Ludwig, Münster**

Forschung zur Influenza und Influenzaviren am  
RKI

PD Dr. Wolff, Robert Koch-Institut, Berlin

Influenzavirusforschung am Friedrich-Loeffler-  
Institut - Vorstellung ausgewählter Projekte und  
Ergebnisse

PD Dr. Beer, Friedrich-Loeffler-Institut, Riems

Untersuchungen zur Entwicklung und  
Wirksamkeitsbestimmung neuer

Pandemieimpfstoffe

PD Dr. Wagner, Paul-Ehrlich-Institut, Langen

17.05 Uhr: **P A U S E**

17.20 Uhr: **Plenum der Zoonosenplattform – S.C.  
Semler, Berlin**

- Vorstellung der Zoonosenplattform,
- Darstellung der Ziele
- Bericht der Geschäftsstelle und des  
provisorischen internen Beirats über das  
Förderjahr 2009
- Plenum über die Ziele und Aufgaben der  
Zoonosenplattform
- Wahl der Mitglieder des Internen Beirats

19.15 Uhr: **Konstituierende Sitzung des Externen  
Beirats**

Ab 19.30 Uhr: **Abendessen / Get-Together**

**2. Tag (Donnerstag, 08.10.09)**

- 09.00 Uhr: **KEYNOTE: Emerging Zoonoses: Response and Preparedness**  
Prof. Dr. Feldmann, Hamilton, Montana, USA
- 09.30 Uhr: **Phylogenie, Bioinformatik und Amplikon-Resequenzierung von Zoonose-Erregern**  
Prof. Dr. Harmsen, Münster
- 09.45 Uhr: **Neue Bioinformatische Methoden für die Analyse von bakteriellen Genomen**  
Dr. Deyneko, Braunschweig
- 10.00 Uhr: **Einsatz von Bakteriophagen zur Bekämpfung von Campylobacter**  
Dr. Hertwig, Berlin
- 10.15 Uhr: **PAUSE**
- 10:30 Uhr bis 14:15 Uhr **Drei parallele Workshops**

**I. Workshop - Immunität – Dr. Wolff, Berlin**

- 10.30 Uhr: Human-pathogene, aviäre und porcine Influenzaviren zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Vermehrung in einem humanen ex vivo Lungen-Infektionsmodell – V. Weinheimer  
NS1 of pathogenic H5N1 avian influenza virus suppresses interferon synthesis in mice but not chickens – Prof. Dr. Staehli  
H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses are susceptible against interferon type I treatment in vitro and in vivo – Prof. Dr. Planz  
H5N1 Influenza A Virusisolate aus Vögeln und Menschen stimulieren das humane Typ I Interferonsystem unterschiedlich stark – M. Matthaei  
Influenza A Virus inhibits Type I IFN Signaling via NF- $\kappa$ B dependent Induction of SOCS-3 Expression – Prof. Dr. Ludwig

11.30 Uhr: **Posterbegehung: Immunität**

12.30 Uhr: **MITTAGSPAUSE**

13.15 Uhr: Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and is highly sensitive to the interferon-stimulated gene viperin – Dr. Överby  
Intracellular mechanisms of MHC I-antigen processing in chlamydia-infected professional APCs – Dr. Knittler  
Host-adaptation and the zoonotic potential of Salmonella serovars – Dr. Tedin  
Persistence of Toxoplasma gondii and parasite control in skeletal muscle – Prof. Dr. Lüder

**II. Workshop – Diagnostik und Epidemiologie I – Prof. Dr. Erfle, München**

10.30 Uhr: Epidemiologie und Surveillance von Zoonosen: Aufgaben und Aktivitäten des RKI – Prof. Dr. Stark  
Porzine Influenzaviren - Risikopotential für den Menschen – Dr. Zell  
Epidemic cowpoxvirus infections in Germany – Dr. Nitsche  
First evidence for Toscana virus-associated encephalitis emerging north of the alps – PD Dr. Meyer-König  
Vorkommen von West-Nil-Virus-Antikörpern bei Wildvögeln in Deutschland – Dr. Ziegler

11.30 Uhr: **Posterbegehung:**

12.30 Uhr: **MITTAGSPAUSE**

13.15 Uhr: SARS-like coronaviruses in European bats – Dr. Drexler  
Use of viral pseudotypes to analyze the ability of the S protein of bat coronaviruses to mediate infection – Dr. Herrler

Differentielle ACE2-Herabregulierung durch die Spike-Proteine von SARS-Coronavirus und Coronavirus NL63 – Prof. Dr. Pöhlmann

On the way to a cure: Identification of Cyclosporin A as inhibitor of SARS-CoV replication by analysis of virus-host protein-protein interactions via an undirected systems biology approach – Dr. von Brunn

### **III. Workshop – Diagnostik und Epidemiologie II – Prof. Dr. Wagner, Wien**

10.30 Uhr: New DNA microarray tests for rapid genotyping of *Chlamydomonas psittaci* and *Chlamydia trachomatis* – Dr. Sachse

Nicht nur die Wiederkäuer - Die Reservoirs für *Coxiella burnetii* (Q-Fieber) – Dr. Henning

Molekulare Epidemiologie von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* – Charakterisierung eines Erregers mit geringer genetischer Heterogenität – I. Fritsch

Erster Nachweis atypischer *Toxoplasma gondii*-Genotypen in Deutschland - Dr. Schares

Die zoonotische Komponente des MRSA-Komplexes: MRSA bei beruflich mit dem Schwein exponierten Personen – Dr. Meemken

11.30 Uhr: **Posterbegehung: Epidemiologie**

12.30 Uhr: **MITTAGSPAUSE**

Netzwerk "Nagetier-übertragene Pathogene" in Deutschland: Plattform für eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zu Nagetieren und Zoonoseerregern – Dr. Ulrich

Nagetier-übertragene Zoonosen entlang eines Klimagradienten im Nationalpark Bayerischer Wald – Dr. Essbauer

Numerical response of ticks in relation to small rodent density – F. Rühle

Rickettsioses: emerging zoonoses in Germany – Dr. Dobler

14.15 Uhr: **P A U S E**

14:45 Uhr: **Geoinformationssysteme in der Zoonosenforschung**

Dr. Staubach, Wusterhausen

15.00 Uhr: **KEYNOTE: Bakterielle Zoonosenerreger: blinde Passagiere erobern eine Neue Welt**

Prof. Dr. Dr. h.c. Karch, Münster

15.30 Uhr: **Abschlussdiskussion: Perspektiven und zukünftige Aufgaben der nationalen Forschungsplattform für Zoonosen**

Moderation: Prof. Dr. Groschup – Prof. Dr. Ludwig – S.C. Semler

Ca. 16.30 Uhr: **Ende des Symposiums der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen 2009**

### **Über die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen**

Im Rahmen der Forschungsvereinbarung zu Zoonosen vom 22.03.2006 zwischen den Bundesministerien für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), für Bildung und Forschung (BMBF) und für Gesundheit (BMG) wurden Fördermittel in Höhe von 60 Mio. € zur Verfügung gestellt, um das Themenfeld der zoonotischen Infektionskrankheiten erfolgreich bearbeiten zu können und die Prävention, Diagnose und Therapien von zoonotischen Infektionskrankheiten langfristig zu verbessern. In einem ersten Schritt wurde dazu im März 2006 das Forschungs-Sofortprogramm Influenza des Bundes (FSI) initiiert. In einem zweiten Schritt wurde vom BMBF am 01.04.2006 die Bekanntmachung zur Förderung von Forschungsverbänden zu zoonotischen Infektionskrankheiten veröffentlicht. Im Rahmen dieser Fördermaßnahme werden seit Juli 2007 neun interdisziplinäre Forschungsverbände für zunächst drei Jahre gefördert.

In einem dritten Schritt wurde entsprechend den Richtlinien aus der Bekanntmachung des BMBF vom 13.03.2008 die nationale Forschungsplattform für Zoonosen (im Folgenden Zoonosenplattform genannt) etabliert. Sie wird vom BMBF rückwirkend zum 01.01.2009 für zunächst drei Jahre gefördert. Am 26.03.2009 wurden vom BMBF Richtlinien zur Förderung weiterer Forschungsverbände zu ausgewählten zoonotischen Infektionskrankheiten veröffentlicht. Im Rahmen dieser Bekanntmachung besteht für die bestehenden neun Forschungsverbände die Möglichkeit, eine zweite Förderphase von nochmals drei Jahren zu beantragen. Zudem erfolgt eine Öffnung für neue Verbände zu gesundheitspolitisch relevanten Themen wie Antibiotika-Resistenzen und vernachlässigten zoonotischen Infektionskrankheiten in ärmeren Ländern. Diese neuen Verbände werden mit in die Forschungsplattform eingebunden.

### **Ziele und Aufgaben**

Der Aufbau der Zoonosenplattform dient der Koordination und Vernetzung der Zoonosenforschung in Deutschland, insbesondere der Förderung der Zusammenarbeit der FSI-Projekte, der BMELV-Vorhaben zur Bekämpfung von Zoonosen bei Tieren und der interdisziplinären BMBF-Forschungsverbände zu zoonotischen Infektionskrankheiten. Perspektivisch soll die Zoonosenplattform die Zoonosenforschung in Deutschland auch international vertreten. Ziel ist es, eine breite horizontale Vernetzung zwischen biomedizinischer Grundlagenforschung, Human- und Veterinärmedizin einerseits und universitärer und

## Über die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen

---

außeruniversitärer Forschung in Deutschland andererseits zu fördern, sowie einen verbesserten Informationsfluss zu gewährleisten und durch einen verstärkten Erfahrungsaustausch auf nationaler und internationaler Ebene die Forschungsaktivitäten im Bereich der Zoonosenforschung zu forcieren.

Dazu dienen die Durchführung von jährlichen Symposien und Themenworkshops, die Bündelung und Aufbereitung der Forschungsförderungsmöglichkeiten für Mitglieder in Form eines Support Desk, die Bereitstellung von standardisiertem und qualitativ hochwertigem Probenmaterial sowie der Aufbau eines Datenbank-Internet-Portals seitens der Geschäftsstelle der Zoonosenplattform. Ein wichtiges Standbein der Zoonosenplattform ist die Initiierung und Begleitung themen- und standortübergreifender Projekte, die von den Mitgliedern der Zoonosenplattform als kleine Pilot- oder Querschnittsprojekte beantragt werden können. Darüber hinaus trägt eine zuverlässige, faktenorientierte Information der interessierten Öffentlichkeit, Medien und Politik über Zoonosen zu diesen Zielen bei.

### **Organisation**

Die Zoonosenplattform ist ein institutionalisierter Zusammenschluss der BMBF-Forschungsverbände zu Zoonosen und weiteren Wissenschaftlern, die im Bereich Zoonosen in Deutschland forschen. Sie setzt sich aus dem Plenum aller Mitglieder, dem internen Beirat, dem externen Beirat und der Geschäftsstelle zusammen. Am 16.09.2009 wurde vom internen Beirat die Satzung der nationalen Forschungsplattform für Zoonosen einstimmig verabschiedet und ist seitdem in Kraft. Diese Satzung ist keine Satzung im vereinsrechtlichem Sinne, sondern als Grundsatzpapier der Zoonosenplattform zu verstehen. Den vollständigen Wortlaut der Satzung finden Sie auf Seite 194.

### **Mitglieder**

Jeder Wissenschaftler, der sich mit der Zoonosenforschung beschäftigt und durch öffentliche Gelder gefördert wird oder in den letzten drei Jahren in einer wissenschaftlich anerkannten Fachzeitschrift zu Fragestellungen aus dem Bereich der Zoonosenforschung publiziert hat, kann durch eine einfache Registrierung Mitglied der Forschungsplattform werden. Mitglieder werden in den Verteiler der Zoonosenplattform aufgenommen und von der Geschäftsstelle über Aktivitäten und Veranstaltungen informiert. Nur Mitglieder sind bei der Wahl des internen Beirats vorschlags-, stimm- und wahlberechtigt. Die Registrierung als Mitglied ist online unter [www.zoonosen.net](http://www.zoonosen.net) oder auch hier vor Ort auf

# Über die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen

---

dem Symposium möglich. Bei Interesse wenden Sie sich bitte an die Anmeldung im Foyer. Die Mitarbeiter der Geschäftsstelle helfen Ihnen gerne weiter.

## **Interner Beirat**

Auf dem jährlichen Symposium wird der interne Beirat durch das Plenum gewählt und besteht aus 15 anerkannten Wissenschaftlern, die das Steuerungsgremium der Zoonosenplattform bilden. Er tritt vier bis fünfmal im Jahr zusammen und trifft alle wissenschaftsrelevanten Entscheidungen, die von der Geschäftsstelle umgesetzt werden.

## **Externer wissenschaftlicher Beirat**

Der externe Beirat berät die Zoonosenplattform in ihrer wissenschaftlichen Arbeit und strategischen Ausrichtung. Darüber hinaus wirkt er an der fachlichen Begutachtung der Pilot- und Querschnittsprojekte, die von der Zoonosenplattform ausgeschrieben werden, mit.

## **Geschäftsstelle**

Um der Vielfalt der bestehenden grundlagenwissenschaftlichen und klinischen Aktivitäten im Bereich Zoonosen und dem damit verbundenen Unterstützungsbedarf gerecht zu werden, ist die Geschäftsstelle der Forschungsplattform an drei eng miteinander verzahnten Standorten angesiedelt:

- Berlin c/o Telematikplattform für Medizinische Forschungsnetze e.V.,
- Münster c/o Institut für Molekulare Virologie, Westfälische Wilhelms-Universität und
- Greifswald - Insel Riems c/o Friedrich-Loeffler-Institut.

Durch diese drei Standorte werden die Expertise im infrastrukturellen und organisatorischen Bereich, die universitäre Forschung und die Ressortforschung sowie die verschiedenen Fachrichtungen innerhalb der Plattform repräsentiert. Die Geschäftsstelle koordiniert die Zusammenarbeit und Kommunikation der BMBF-Forschungsverbünde zu Zoonosen untereinander und baut ein starkes wissenschaftliches Netzwerk auf. Dabei dient sie als zentrale Ansprechpartnerin für alle Wissenschaftler, die im Bereich der zoonotischen Infektionskrankheiten forschen.

Der Schwerpunkt des Standorts Berlin besteht dabei in der Bereitstellung der Infrastruktur sowie der Initiierung und Begleitung themen- und standortübergreifender Projekte.

## Über die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen

---

Der Standort Münster befasst sich schwerpunktmäßig mit der Anbahnung von nationalen und internationalen Kooperationen und der Forschungsförderung. Weitere Informationen zum Bereich Forschungsförderung finden Sie auf Seite 18.

Am Standort Greifswald - Insel Riems liegt der Schwerpunkt in der Registrierung, Harmonisierung und Standardisierung der vorhandenen Ressourcen.

### **Entwicklungsstand & Ausblick**

Seit März wurde die Geschäftsstelle an allen drei Standorten erfolgreich aufgebaut und miteinander vernetzt. Weitere Schwerpunkte der Aufbauarbeiten umfassten die Organisationsstrukturen, Geschäftsprozesse und Gremien der Zoonosenplattform. So wurden am 16.09.2009 vom vorläufigen internen Beirat die Satzung und das Antragsverfahren für Pilot- und Querschnittsprojekte verabschiedet. Hier auf diesem Symposium findet nun am 7. Oktober die erste Plenumsitzung mit den Wahlen zum internen Beirat statt. Alle Mitglieder der Zoonosenplattform sind vorschlags-, stimm- und wahlberechtigt. Ebenfalls am 7. Oktober tritt der externe wissenschaftliche Beirat zu seiner konstituierenden Sitzung zusammen.

Unter [www.zoonosen.net](http://www.zoonosen.net) wurde die Website der Zoonosenplattform eingerichtet. Diese Internetpräsenz dient als zentrales Informations- und Kommunikationsportal sowohl für Mitglieder als auch für die breite Öffentlichkeit und wird nun sukzessiv erweitert und ausgebaut.

Das diesjährige Symposium für Zoonosenforschung 2009, das erstmalig von der Zoonosenplattform veranstaltet wird, steht in einer Reihe mit den BMBF-Zoonosen-Workshops 2007 und 2008. Es dient als Forum zur Präsentation und Diskussion der wissenschaftlichen Ergebnisse der einzelnen Projekte und wird jährlich fortgesetzt.

Weiterhin veranstaltet die Zoonosenplattform themenspezifische Workshops, die der fachspezifischen Kommunikation und Kooperation dienen. So findet am 12. und 13. Oktober in Berlin der internationale Workshop „Common Cold – SARS – Pandemic Influenza: Novel strategies to fight respiratory viral diseases“ statt. Weitere Workshops zu „Neglected Diseases“, „Elektronisches Meldewesen“ und „Zoonotische ZNS-Infektionen“ sind zu Beginn bzw. für das Frühjahr 2010 geplant. Weitere Informationen, Ankündigungen und aktuelle Termine finden Sie auf der Website [www.zoonosen.net](http://www.zoonosen.net).

Für Fragen, Anregungen und Diskussionen steht Ihnen die Geschäftsstelle der nationalen Forschungsplattform für Zoonosen unter [info@zoonosen.net](mailto:info@zoonosen.net) oder telefonisch unter 030/31011970 gern zur Verfügung.

### **Forschungsförderung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen**

Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen ist eine wissenschaftsgetriebene Dachorganisation, die die deutsche infektiologische Forschungslandschaft weiter stärken soll. Sie wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen wird inhaltlich ressortübergreifend vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), und dem Bundesministerium für Gesundheit (BMG) getragen und durch die Ressortforschungseinrichtungen des BMG und des BMELV unterstützt.

Mit der Etablierung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen steht eine strategisch vernetzende Infrastruktur zur Verfügung, die ein zentrales Informations- und Servicenetzwerk aufbaut, um schnell funktionsfähige, flexible und nachhaltige Lösungen für die Erforschung, Prävention und Bekämpfung von Zoonosen zu entwickeln und umzusetzen.

Um effektiv den Herausforderungen der Zoonosenforschung begegnen zu können, gewinnt die nationale sowie internationale Zusammenarbeit immer mehr an Bedeutung. Häufig sind interdisziplinäre Forschungsansätze in Forschungsverbänden erforderlich um die Forschungsziele zeitnah zu erreichen, daher ist die Einwerbung von Drittmitteln für die Erforschung zoonotischer Infektionskrankheiten von zentraler Bedeutung. Durch die Erschließung zusätzlicher Fördermittel durch nationale und internationale Förderorganisationen können große Verbundforschungsvorhaben schneller realisiert werden. Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen baut am Geschäftsstellenstandort Münster eine Management-Einheit auf, die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler in allen Phasen der Anbahnung und Durchführung von Verbundförderaktivitäten unterstützt. Ziele der Forschungsförderung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen sind die Anbahnung neuer Forschungsverbände, die Aufbereitung und Bereitstellung themenspezifischer Forschungsinformationen sowie das Management bei der Planung und Durchführung von Verbundförderprojekten.

Zur Stärkung der nationalen und internationalen Vernetzung werden themenspezifische Forschungsinformationen gesammelt und vor allem in Form von Datenbanken aufbereitet. Sukzessiv werden von der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen Datenbanken zu Infektionserregern, zu

## Forschungsförderung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

---

öffentlich geförderten Forschungsvorhaben sowie zu forschungsaktiven Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern aufgebaut. Diese themenspezifischen Forschungsinformationen stehen zukünftig – unter Berücksichtigung der relevanten Datenschutzaspekte – sowohl Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern als auch der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen zur proaktiven Anbahnung von weiteren Verbundprojekten zur Verfügung.

Wie die aktuellen Entwicklungen im Bereich der Influenza-Forschung zeigen, muss die Forschung unter Umständen schnell und schlagkräftig auf neue Herausforderungen reagieren können. Um diese Herausforderungen zu meistern, stehen der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen für innovative Pilotprojekte separate Fördermittel des BMBF zur Verfügung. Alle Wissenschaftler, die auf dem Gebiet der Zoonosenforschung aktiv sind, können diese Mittel beim Standort Berlin beantragen. Die Begutachtung erfolgt anhand definierter Kriterien durch ein Fachgremium. Details regelt die Geschäftsordnung zum Projektantragsverfahren der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen (Seite 204). Im Zuge der Förderung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen können seitens des BMBF auch verbundübergreifende Querschnittsaktivitäten zwischen den bestehenden, interdisziplinären Forschungsverbänden gefördert werden. Weitere Informationen zur Forschungsförderung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen finden Sie unter [www.zoonosen.net](http://www.zoonosen.net).

# Vorträge

**Keynote-Vorträge**

### **Emerging Zoonoses: Response and Preparedness**

Heinz Feldmann

Laboratory of Virology, Rocky Mountain Laboratories, Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health

Zoonotic diseases are a major challenge for animal and human health worldwide as evidenced by the emergence/re-emergence of avian influenza, Nipah virus, SARS-CoV, Rift Valley fever virus and other exotic or more common pathogens. Many countries have established infectious disease centers with primary responsibility for disease surveillance, reference microbiology and quality assurance, preparedness and response to these threat agents. Rapid reference diagnostics is provided in most of these centers but on-site diagnostic capabilities are still underdeveloped and often hamper national and international outbreak investigations. The animal/human health response mandate cannot be accomplished without a strong research component focused on pathogen biology, pathogenesis and immune response to provide the fundamental data and concepts for the development of antivirals, therapeutics and vaccines.

## **Verbund- und Projektpräsentationen**

### **Chronischer humaer Botulismus in einem landwirtschaftlichen Betrieb mit chronischem Rinderbotulismus**

Dressler, D. (Klinik für Neurologie, Medizinische Hochschule Hannover)

Botulismus beschreibt die Intoxikation eines Organismus mit Botulinum Toxin (BT). Beim Menschen kann diese Intoxikation exogen, etwa durch verunreinigte Nahrungsmittel oder durch Aerosole und Stäube, oder endogen durch eine BT-Produktion im Organismus, wie beim Wundbotulismus oder beim Kinderbotulismus, erfolgen. Üblicherweise ist der Botulismus eine perakute lebensbedrohliche Erkrankung. Attenuierte Verläufe sind jedoch vereinzelt beschrieben. Nicht beschrieben ist bislang ein chronischer Botulismus. In einem landwirtschaftlichen Betrieb war seit 2.5 Jahren Rinderbotulismus aufgetreten. Dabei konnte freies BT der Gruppe C/D im Kot nachgewiesen werden. In diesem Betrieb untersuchten wir 8 Personen. HRS, ein 29-jähriger Mann, litt seit 2 Jahren unter Muskelschwäche, die in Phasen von etwa 4 bis 6-wöchiger Dauer auftrat. Zwischen den Phasen kam es zu einer mehrwöchigen partiellen Erholung. Zusammen mit der Muskelschwäche klagte der Patient über ein Schweregefühl der Augenlider, ein Kloßgefühl beim Schlucken, ein Steifigkeitsgefühl in der Mundregion, eine Blendempfindlichkeit, eine Trockenheit des Mundes und der Augen und ein wiederholtes Schleiersehen. Seit 2 Monaten war es zu einem gehäuften Harndrang mit täglich 20-maligen Ausscheidungen geringer Harnmengen bei fortbestehendem Restharngefühl gekommen. In der neurologischen Untersuchung, die in einer Phase der partiellen Rückbildung der Beschwerden stattfand, zeigten sich eine symmetrische, eher distal betonte, mäßig ausgeprägte Tetraparese (MRC-Kraftgrad 3 bis 4) und eine Dysarthrie. Der sonstige klinische Befund war unauffällig. HKS, ein 32-jähriger Mann, litt seit 2 Jahren ebenfalls unter einer Muskelschwäche, die in Phasen von etwa 3 bis 4-wöchiger Dauer auftrat. Zwischen den Phasen kam es zu einer mehrwöchigen partiellen Erholung. Zusammen mit der Muskelschwäche klagte der Patient über ein Schweregefühl der Augenlider, die zu einem auffällig vermehrten Stirnrunzel geführt habe, ein Kloßgefühl beim Schlucken, eine Augentrockenheit mit Fremdkörpergefühl, eine vermehrte Blendempfindlichkeit und ein 7 bis 8-maliges Wasserlassen pro Tag bei fortbestehendem Restharngefühl. In der neurologischen Untersuchung, die in einer Phase partieller Rückbildung der Beschwerden stattfand, zeigten sich eine symmetrische, mäßig ausgeprägte Tetraparese (MRC-Kraftgrad 3 bis 4) und eine Dysarthrie. Der sonstige klinische Befund war unauffällig. MG, ein 29-

jähriger Mann litt seit Aufnahme seiner Tätigkeit in dem betroffenen Betrieb vor 1 Jahr ebenfalls unter Muskelschwäche, die in Phasen von etwa 2 bis 3-wöchiger Dauer auftrat. Zwischen den Phasen kam es zu einer partiellen Erholung. Zusammen mit der Muskelschwäche klagte der Patient über einen gehäuften Harndrang mit 30-maligen Ausscheidungen geringer Harnmengen bei fortbestehendem Restharngefühl, gehäufte Diarrhoen und eine vermehrte Blendempfindlichkeit. In der neurologischen Untersuchung, die in einer Phase der partiellen Rückbildung der Beschwerden stattfand, zeigten sich eine symmetrische Tetraparese (MRC Kraftgrad 3 bis 4) und ein bilateral reduzierter Lidschluß. NJ, eine 18-jährige Frau mit regelmäßigem Rinderkontakt litt seit 2 Jahren an heftigem Sodbrennen und epigastrischen Schmerz. Ihre weitere Anamnese und ihre neurologische Untersuchung waren unauffällig. Beim Ausschluß anderer Ursachen diagnostizierten wir bei den Patienten HRS, HKS und MG das Vorliegen eines chronischen Botulismus. Bei der Patientin NJ könnte eine BT-induzierte distale Oesophagus-Sphinkter-Schwäche vorliegen. 3 Personen mit gelegentlichem Rinderkontakt waren anamnestisch und klinisch-neurologisch unauffällig. Damit ist erstmalig das Krankheitsbild des chronischen Botulismus beim Erwachsenen beschrieben worden. Weitere Untersuchungen müssen folgen. Dabei werden neben dem Nachweis von freiem BT, der Bildung von BT-Antikörpern, neurophysiologischen Untersuchungen und gezielter weiterer apparativer Diagnostik insbesondere die Intoxikationswege zu untersuchen sein. Möglich erscheint eine intestinale Besiedelung mit Clostridium botulinum oder aber eine kontinuierliche exogene Zufuhr von BT. Schlußendlich wird zu untersuchen sein, welche epidemiologische Relevanz dieses neue Krankheitsbild haben wird. Botulismus beschreibt die Intoxikation eines Organismus mit Botulinum Toxin (BT). Beim Menschen kann diese Intoxikation exogen, etwa durch Nahrungsmittel, Aerosole und Stäube, oder endogen durch eine in situ-Produktion von BT, wie beim Wundbotulismus oder Kinderbotulismus, erfolgen. Üblicherweise ist der Botulismus eine perakute lebensbedrohliche Erkrankung. Attenuierte Verläufe sind jedoch vereinzelt beschrieben. Nicht beschrieben ist bislang ein chronischer Botulismus beim Erwachsenen. In einem landwirtschaftlichen Betrieb war seit 2.5 Jahren Rinderbotulismus mit Nachweis von freiem BT der Gruppe C/D im Kot aufgetreten. In diesem Betrieb untersuchten wir 8 Personen. HRS (29 Jahre, männlich) litt seit 2 Jahren unter Muskelschwäche, die in Phasen von etwa 4 bis 6-wöchiger Dauer auftrat. Zwischen den Phasen kam es zu einer mehrwöchigen partiellen Erholung. Zusammen mit der Muskelschwäche klagte der Patient über ein Schweregefühl der Augenlider, ein Kloßgefühl beim Schlucken, ein Steifigkeitsgefühl in der Mundregion, eine Blendempfindlichkeit, eine Trockenheit des Mundes und der Augen und ein wiederholtes

Schleiersehen. Seit 2 Monaten war es zu einem gehäuften Harndrang mit täglich 20-maligen Ausscheidungen geringer Harnmengen bei fortbestehendem Restharngefühl gekommen. In der neurologischen Untersuchung, die in einer Phase der partiellen Rückbildung der Beschwerden stattfand, zeigten sich eine symmetrische, mäßig ausgeprägte Tetraparese (MRC-Kraftgrad 3-4) und eine Dysarthrie. Der sonstige klinische Befund war unauffällig. HKS (32 Jahre, männlich) litt seit 2 Jahren ebenfalls unter einer Muskelschwäche, die in Phasen von etwa 3 bis 4-wöchiger Dauer auftrat. Zwischen den Phasen kam es zu einer mehrwöchigen partiellen Erholung. Zusammen mit der Muskelschwäche klagte der Patient über ein Schweregefühl der Augenlider, die zu einem auffällig vermehrten Stirnrunzel geführt habe, ein Kloßgefühl beim Schlucken, eine Augentrockenheit mit Fremdkörpergefühl, eine vermehrte Blendempfindlichkeit und ein 7 bis 8-maliges Wasserlassen pro Tag bei fortbestehendem Restharngefühl. In der neurologischen Untersuchung, die in einer Phase partieller Rückbildung der Beschwerden stattfand, zeigten sich eine symmetrische, mäßig ausgeprägte Tetraparese (MRC-Kraftgrad 3-4) und eine Dysarthrie. Der sonstige klinische Befund war unauffällig. MG (29 Jahre, männlich) litt seit Aufnahme seiner Tätigkeit in dem betroffenen Betrieb vor 1 Jahr ebenfalls unter Muskelschwäche, die in Phasen von etwa 2 bis 3-wöchiger Dauer auftrat. Zwischen den Phasen kam es zu einer partiellen Erholung. Zusammen mit der Muskelschwäche klagte der Patient über einen gehäuften Harndrang mit 30-maligen Ausscheidungen geringer Harnmengen bei fortbestehendem Restharngefühl, gehäufte Diarrhoen und eine vermehrte Blendempfindlichkeit. In der neurologischen Untersuchung, die in einer Phase der partiellen Rückbildung der Beschwerden stattfand, zeigten sich eine symmetrische Tetraparese (MRC-Kraftgrad 3-4) und ein bilateral reduzierter Lidschluß. NJ (18 Jahre, weiblich) mit regelmäßigem Rinderkontakt litt seit 2 Jahren an heftigem Sodbrennen und epigastrischem Schmerz. Ihre weitere Anamnese und ihre neurologische Untersuchung waren unauffällig. Beim Ausschluß anderer Ursachen diagnostizierten wir bei den Patienten HRS, HKS und MG das Vorliegen eines chronischen Botulismus. Bei der Patientin NJ könnte eine BT-induzierte distale Oesophagusphinkter-Schwäche vorliegen. 3 Personen mit gelegentlichem Rinderkontakt waren anamnestisch und klinisch-neurologisch unauffällig. Damit ist erstmalig das Krankheitsbild des chronischen Botulismus beim Erwachsenen beschrieben. Weitere Untersuchungen (Nachweis von freiem BT, BT-Antikörpern, neurophysiologische Untersuchungen, gezielte weitere apparative Diagnostik) müssen folgen. Der Intoxikationsweg kann auf einer intestinalen Besiedelung mit *Clostridium botulinum* oder aber auf einer kontinuierlichen exogenen BT-Zufuhr basieren. Schlußendlich wird

die epidemiologische Relevanz dieses neuen Krankheitsbildes zu untersuchen sein.

### **Neue Ansätze für die Frühdiagnostik der bovinen MAP-Infektion**

Menge, C.<sup>1</sup>; Bauerfeind, R.<sup>1</sup>; Abdulmawjood, A.<sup>2</sup>; Akinden, Ö.<sup>2</sup>; Fischer, M.<sup>2</sup>; Wagner, H.<sup>2</sup>; Seeger, T.<sup>3</sup>; Bridger, P.<sup>1</sup>; Schillinger, S.<sup>1</sup>; Bulun, H.<sup>1</sup>; Doll, K.<sup>3</sup>; Bülte, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut f. Hygiene & Infektionskrankheiten d. Tiere, <sup>2</sup>Institut f. Tierärztl. Nahrungsmittelkunde, <sup>3</sup>Klinik f. Wiederkäuer & Schweine, Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Labordiagnostik der Infektion von Rindern mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist derzeit in der frühen Infektionsphase fast unmöglich. In einem vom BMELV geförderten interdisziplinären Ansatz sollen innovative Verfahren entwickelt werden, die eine sensitive und spezifische Erkennung der Infektion schon im Kälberalter ermöglichen. Goldstandard der frühen MAP-Diagnostik ist die Untersuchung des Ileocaecallymphknotens. Hier lässt sich der Erreger bereits detektieren bevor er über den Kot ausgeschieden wird. Ein Ziel des Projektes ist es, ein minimal-invasives Verfahren zur Biopsie intestinaler Lymphknoten beim Kalb zu entwickeln und mit einer verbesserten molekularbiologischen Nachweismethodik (Nachweis von F57 und IS*Mav2* mittels RT-PCR) zu kombinieren. Bei Kälbern aus Paratuberkulose-Problembetrieben konnten wir damit bereits MAP-spezifische DNA in Lymphknoten-Bioptaten nachweisen. Der Nutzen der indirekten Infektionsdiagnostik wird durch die Besonderheiten der durch MAP ausgelösten Immunantwort erheblich eingeschränkt. MAP induziert zunächst vor allem eine zellvermittelte Immunreaktion. MAP-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen sezernieren Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), dessen Menge in stimulierten Vollblutproben als diagnostischer Parameter verwendet werden kann. Wegen falsch-positiver Reaktionen, die durch Natürliche Killerzellen verursacht werden, war der Test bei Kälbern bislang unbrauchbar. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie weisen wir deshalb MAP-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf Einzelzellebene anhand ihrer IFN- $\gamma$ -Bildung oder der Expression von Aktivierungsmarkern nach. In der frühen Phase der Infektion können auch Antikörper gegen MAP nachweisbar sein. Allerdings sind die derzeit verfügbaren ELISAs hinsichtlich Sensitivität und Spezifität unbefriedigend. Von uns wurde deshalb ein Durchflußzytometrie-Verfahren entwickelt, in dem intakte MAP-Bakterien als korpuskuläre Testantigene verwendet werden. Diese neuartigen Ansätze in der Paratuberkulose-Diagnostik werden derzeit im Rahmen eines Infektionsversuches und eines Feldversuches an Kälbern und Kühen evaluiert.

### **Zoonotische Chlamydien -Modelle für chronische und persistente Infektionen bei Mensch und Tier**

Sachse, K.; Friedrich-Loeffler-Institut (Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit), Institut für Molekulare Pathogenese, Jena

Seit eineinhalb Jahren besteht der Forschungsverbund "Zoonotische Chlamydien - Modelle für chronische und persistente Infektionen bei Mensch und Tier", welcher im Rahmen des Schwerpunkts "Zoonotische Infektionskrankheiten" vom BMBF gefördert wird. Das Netzwerk umfasst acht Einzelprojekte, die zu gleichen Teilen von erfahrenen Chlamydienforschern aus der Human- und Veterinärmedizin geleitet werden. In ihnen sollen die Häufigkeit von Infektionen abgeschätzt, Übertragungsmechanismen vom Tier auf den Menschen erforscht und der Infektionsverlauf bei Mensch und Tier auf molekularer Ebene untersucht werden. Weitere Ziele sind die Verbesserung der Labordiagnostik und die Weiterentwicklung der medikamentösen Behandlung von Chlamydieninfektionen beim Menschen, die von Tieren übertragen worden sind.

Eine Prävalenzstudie zum Vorkommen zoonotischer Chlamydien und ihrer Übertragung auf den Menschen ist noch im Gange (Gernot Rohde, Universität Bochum). Tendenziell scheint von den Chlamydien-infizierten Rindern (77 % der Betriebe positiv) keine nennenswerte Gefährdung für die dort Beschäftigten auszugehen. Das Modell der *Chlamydophila (C.)-psittaci*-Infektion im Kalb wurde erfolgreich etabliert (Petra Reinhold, FLI Jena). Damit ist es möglich, je nach Infektionsdosis eine klinisch nahezu inapparente wie auch eine klinisch manifeste chlamydiale Infektion der Lunge zu induzieren. Der Gruppe um Andreas Essig (Universitätsklinik Ulm) gelang der Nachweis von 40 immunreaktiven Proteinen des zoonotischen Erregers *C. abortus*, welcher vom Schaf auf den Menschen übertragen werden kann. Bei einer Studie zur Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirtszelle konnte die Gruppe von Frank Hänel und Hans Peter Saluz (Hans-Knöll-Institut Jena) zeigen, dass das sekretierte chlamydiale Protein IncA mit dem humanen Zellprotein G3BP1 spezifisch interagiert, wodurch offenbar eine Verbindung zum Signaltransduktionssystem hergestellt wird. Die immunologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen in der Gruppe von Michael Knittler (FLI, Tübingen) führten zum erstmaligen Nachweis einer infektionsabhängigen Induktion der Expression funktionaler Komponenten des MHC I-Reifungsweges für Chlamydien-infizierte dendritische Zellen. Neue Daten, die für das Verständnis der Effizienz einer antibiotischen Behandlung von humanen Chlamydieninfektionen essentiell sind, lieferte

die Gruppe von Eberhard Straube und Jürgen Rödel (Universitätsklinikum Jena). Mit Hilfe eines in-vitro-Modells der replikativen lytischen Infektion von Epithelzellen wurden u.a. die minimale inhibitorische und die minimale chlamydzidale Konzentration verschiedener Antibiotika gegenüber *C. psittaci* und *C. abortus* ermittelt. Schließlich erarbeitete die Gruppe des Koordinators Konrad Sachse (FLI, Jena) einen neuen Schnelltest zur Genotypisierung von *C. psittaci*, welcher auf der DNA-Mikroarraytechnik basiert. Nach umfangreichen *in-silico*-Sequenzanalysen wurden spezifische Oligonukleotidsonden zur Identifizierung der Genotypen dieses Zoonoseerregers definiert. In der Studie konnte gezeigt werden, dass außer den gegenwärtig allgemein akzeptierten 9 *ompA*-Genotypen noch mindestens 6 weitere Typen natürlicherweise vorkommen. Der inzwischen bereits validierte Test wurde in Kombination mit einem bereits etablierten Mikroarraytest im Rahmen des Verbundes zur direkten Genotypisierung von *C. psittaci* aus klinischen Proben bereits im Routinebetrieb eingesetzt. Mit diesen neuen Daten und dem erreichten Stand der Kooperation zwischen den Einzelprojekten ist der Chlamydienverbund auf einem guten Weg, die anspruchsvollen Ziele zu erreichen und am Ende der Förderphase mit vielen neuen Erkenntnissen zu den zoonotischen Chlamydieninfektionen aufzuwarten.

## Identifizierung immunreaktiver Proteine bei *Chlamydia abortus* Infektionen von Mensch und Tier

Essig, A.; Simnacher, U; Forsbach-Birk, V.; (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Ulm)

*Chlamydia abortus* (*C. abortus*) ist ein weit verbreiteter Infektionserreger bei Wiederkäuern, insbesondere bei Schafen, und kann, wenn schwangere Frauen gegenüber infizierten Tieren exponiert sind, zu Spontanaborten und lebensbedrohlichen Infektionen führen. Bakterielle Proteine, die vor allem im natürlichen Wirt exprimiert werden, kommen als potentielle Pathogenitätsfaktoren in Frage und bieten neue Ansätze für Diagnostik, Therapie und Vakzine-Entwicklung. Ziel des vorliegenden Projektes war daher die vergleichende Identifizierung immunreaktiver Proteine während der ovinen und humanen Infektion mit den Methoden der serologischen Proteomanalyse und in-vivo induzierten Antigen Technologie (IVIAT).

Mittels 2D-Immunelektrophorese von Lysaten gereinigter Elementarkörperchen von *C. abortus* konnten mehr als 40 immunreaktive Spots massenspektrometrisch identifiziert und somit erstmals ein umfassendes Profil immunogener *C. abortus*-Proteine erstellt werden. Aufgrund von Sequenzhomologien zu anderen bereits bekannten bakteriellen Proteinen lassen sich die identifizierten Proteine zum Teil auch funktionell charakterisieren. Unter den identifizierten Membranproteinen findet sich das *C. abortus*-MOMP (major outer membrane protein), dessen Homologe sich bereits bei verwandten *Chlamydia spp.* wie *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* als immunreaktiv erwiesen haben. Entsprechendes gilt für das *C. abortus* Homolog des „heat shock“ Proteins HSP60. Von besonderem Interesse sind immunreaktive „hypothetische“ Proteine, für die eine Sekretion über das TypIII-Sekretionssystem (T3SS) postuliert wird, und die damit potentielle Virulenzfaktoren darstellen. Erste vergleichende 2D-Immunelektrophoresen mit humanem Seren zeigen im Vergleich zum Tiermodell ähnliche Profile. Komplementär dazu erfolgt das Screening einer Expressionsgenbank von *C. abortus* mit Seren von Tieren und Patientinnen mit gesicherter *C. abortus*-Infektion. Durch Präabsorption der Seren mit in-vitro kultivierten Chlamydien sollen die speziell unter in-vivo Bedingungen exprimierten Proteine weiter charakterisiert werden (IVIAT).

Die vorliegenden Daten bieten die Grundlage für eine rationale Auswahl spezifischer Marker für die Serodiagnostik der *C. abortus*-Infektion bei Mensch und Tier und können damit zu einer Verbesserung der Labordiagnostik zoonotischer Chlamydieninfektionen führen. Darüber hinaus erhoffen wir uns von der weiteren Untersuchung immunreaktiver

## Verbund- und Projektpräsentationen

---

Virulenz-assoziiierter Proteine ein besseres Verständnis der Erreger-Wirts Interaktion auf molekularer Ebene.

## **Development of new diagnostic tools for the detection of european arboviruses**

Weidmann, M.<sup>1</sup>; Hasib, L.<sup>1</sup>; Dilcher, M.<sup>1</sup>; Meyer-König, U.<sup>2</sup>; Dobler, G.<sup>3</sup> and Hufert, F.<sup>1</sup>

1. Institute of Virology, University Medical Center Goettingen; 2. Dept. of Virology, Institute for Medical Microbiology, Freiburg; 3; Institute of Microbiology, German Armed Forces, Muenchen

**Introduction:** The aetiology of 50 % of all aseptic-meningo-encephalitis (ME) cases remains unclear after routine diagnostics have been performed. Several clinical studies have reported that European arbovirus infections cause neurological disorders like meningitis, encephalitis and meningitis-encephalitis. The suspect viruses are seven tick-borne arboviruses (Eyach virus (EYAV), Tribec (TRBV), Erve virus (ERVEV), Bahnja virus (BHAV), Uukuniemi (UUKV), Tick-borne encephalitis virus (TBEV)), three sandfly-borne viruses (Toscana virus (TOSV), Sandfly Sicilian (SFSV), and Sandfly Naples (SFNV)) and four mosquito-borne viruses (Tahyna virus (TAHV), Batai virus (BATV), Inkoo virus (INKV), and West Nile virus (WNFV)). Traditional virological diagnostic methods for the identification of these viruses are worldwide only available in very few specialised laboratories. Thus we are aiming at developing up to date molecular and serological diagnostic assays.

**Methods and Results:** Microarray detection: A combined Multiplex Ligation dependent Probe amplification (RT-MLPA) and flow through chip hybridisation system (PAM4U chip system, PamGene) for all the above listed viruses is under development. It allows the detection of an amplified artificial signal molecule, which is generated by ligating two flanking probes at a hybridisation site. The amplified ligated product is hybridized on a 3-D aluminium oxide matrix chip, which has very short hybridisation times and a high sensitivity. So far results indicate sensitivities of 10 molecules detected for TOSV, TRBV, INKV 100 copies detected for WNV, TAHV BATV, and 1000 copies detected for UUKV by combined RT-MLPA and flow through hybridisation. Ongoing development includes probe systems for SFSV, TBEV, EYAV, BAHNV, ERVEV.

**Real-time PCR:** New real time assays were developed for TRBV, UUKV, and WNV (sensitivities determined  $10^2$ ,  $10^2$  and 10 detected molecules). The development of an assay for EYAV and BHAV is ongoing. To be able to develop an assay for TRBV we fully sequenced segments 2-4, 6-9 and obtained partial sequences of segments 1. The phylogenetic analysis of these sequences confirms a close relationship to Nuggetvirus. A new PCR

for SFSV helped to identify and to characterized a new Type of SFSV, which occurred in a recent outbreak in Turkey.

Cytometric bead array (CBA): Using in vitro expression of viral nucleocapsid proteins we are developing a serological multiplex CBA for the analysis of sera and CSF. So far 13 proteins of 10 viruses have been expressed using the RTS 100 system (Roche). A large number of patient samples from ME cases have been collected. All were re-screened for the routine parameters HSV1, HSV2, VZV, Enteroviruses and TBEV and yielded negative results. These samples of ME cases with unknown aetiology are to be tested with the new CBA, which is still under development. Using immunofluorescence assays, we could discover the first autochthonous TOSV positive cases in Southwest Germany, indicating the first emergence of TOSV north of the alps.

Conclusion: These new methods may help to clarify the aetiology of the unclear aseptic ME cases in man, and will help to determine the prevalence of these viruses in ticks, mosquitos, sandflies, rodents, deer and other hosts. Altogether new insights in epidemiology and viral ecology are expected.

**BMELV-Projekt zur aviären Influenza**

### **BMELV- Projekt: Innovatives Barriersystem gegen Aviäre Influenza für die Freilandhaltung – Statusbericht.**

Projektpartner: Bauer, J.: Lehrstuhl für Tierhygiene, Technische Universität München; Haidn, B.: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising; Kekulé, A.: Institut für Medizinische Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität, Halle; Institut für Biologische Sicherheitsforschung GmbH, Halle

Im Zusammenhang mit der Aviären Influenza wurde 2005 in einigen europäischen Ländern die Stallpflicht für Geflügel angeordnet. Ziel dieser Maßnahme war und ist es, die Übertragung der Krankheit von Wildtieren auf das Nutzgeflügel zu unterbinden. Auf den ersten Blick scheint dies eine einfache und Ziel führende Lösung zu sein, für die ökologische Geflügelhaltung stellt sie jedoch aus betriebstechnischen, rechtlichen, ökonomischen und tierethischen Gründen ein großes Problem dar. Deshalb wird versucht zu prüfen, ob die Verhinderung des unmittelbaren Kontaktes zwischen Wild- und Nutztier durch eine speziell gestaltete Voliere einen ausreichenden Infektionsschutz bietet. Zudem gilt es, das Risiko einer anthropogenen Einschleppung von Infektionserregern mit Hilfe einer Schleuse zu minimieren. Parallel dazu laufen Untersuchungen zur Prüfung von Konstruktionen, Einzäunungen und Abdeckungen, verschiedener Materialien, der Praktikabilität von Auf- und Abbau sowie zur Bewertung von Investition und den laufenden Kosten.

Zur Prüfung der Schutzfunktion wurden zehn Versuchseinheiten, die jeweils aus einer Voliere und dem entsprechenden Kontrollareal bestehen, an verschiedenen Standorten in Deutschland errichtet. Fünf davon dienen zur vergleichenden Erfassung des Eintrages organischer Matrix aviären Ursprungs; hierzu wurden die Flächen mit Kunstrasen ausgelegt, der mit Geflügelatruppen bestückt ist. In den weiteren fünf Einheiten werden so genannte Sentinelherden gehalten (SPF-Tiere, geimpft gegen ND). Alle Versuchseinheiten werden in regelmäßigen Abständen über ein Jahr hinweg beprobt.

Der Eintrag von organischem Material aviären Ursprungs wird durch den quantitativen Nachweis eines „vogelspezifischen“ Gens (mitochondriales Cytochrom B) erfasst. Die Methode erwies sich als zuverlässig: Die Proben von 37 Vogelarten führten zu positiven Ergebnissen, die Untersuchung von Proben anderer Tierarten (n=23; u. a. Reptilien) verlief negativ. Zusätzlich wird ein Nukleinsäurenachweis von Influenza Virus A mittels real-time RT-PCR durchgeführt. Die Tiere der Sentinelherden werden laufend bakteriologisch und virologisch (Nachweis von Antikörpern und viraler Nukleinsäuren) untersucht. Bisher konnten in den Blutproben

keine Antikörper gegen die ausgewählten Markerviren (u.a. Influenza Virus A) nachgewiesen werden. In den Kloakentupferproben wurden für das Geflügel typische Bakterienarten (z.B. *C. jejuni*, *E.coli*, *Enterococcus spp.*) gefunden.

Die Daten, die von den geschützten und ungeschützten Arealen bzw. Tieren gewonnen werden, werden vergleichend analysiert und statistisch ausgewertet, um das Ausmaß eines möglichen Schutzeffektes zu objektivieren.

### **Entwicklung neuer Therapieverfahren gegen IAV-Infektionen**

Pauli, E. (ViroLogik GmbH, Erlangen)

Infektionen mit Influenza A Viren (IAV) führten in dem vergangenen Jahrhundert zu katastrophalen Pandemien, wobei allein die Spanische Grippe 1918/1920 bis 50 Millionen Opfer forderte. IAV ist ein in Wasservögeln zirkulierendes Virus, das auf den Menschen übertragen werden kann, wo es durch Superinfektionen zu Reassortantenbildung kommen kann. Diese neuen Virusvarianten haben ein nicht einzuschätzendes Pandemiepotenzial.

Medikamente, die gegenwärtig zur antiviralen Therapien eingesetzt werden, zielen ausschließlich auf virale Komponenten ab, wie z.B. die Hemmung der Neuraminidaseaktivität oder der M2-Ionenkanalaktivität. Aufgrund der hohen Mutationsrate von IAV besteht bei einem solchen Therapieansatz die Gefahr der schnellen Resistenzbildung gegen diese Medikamente. Im Gegensatz dazu besitzt das humane Genom eine millionenfach geringere Mutationsrate. Die Hemmung von Wirtszellkomponenten, auf die das Virus während seines Replikationszyklus angewiesen ist, bietet daher ein interessantes „target“ für die Entwicklung neuer Therapieverfahren. Hierbei kann das Virus durch Mutationen die fehlende zelluläre Komponente nicht ersetzen.

Das 26S-Proteasom - Hauptkomponente des Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) - ist ein solches zelluläres „target“, das durch Proteasominhibitoren (PI) selektiv gehemmt werden kann. In der Zelle ist es für den Abbau von Ubiquitin-markierten Substraten verantwortlich. Eine antivirale Wirkung von PIs verschiedener Substanzklassen gegen IAV konnte sowohl im Zellkulturmodell, als auch im Tiermodell nachgewiesen werden.

**Forschungs-Sofortprogramm Influenza an den  
Ressortforschungseinrichtungen**

**Friedrich-Loeffler-Institut,  
Paul-Ehrlich-Institut,  
Robert Koch-Institut**

## **Untersuchungen zur Entwicklung und Wirksamkeitsbestimmung neuer Pandemieimpfstoffe**

Wagner, R.; Göpfert, C.; Suezter, Y.; Schwantes, A.; Sutter, G.; Holznagel, E.;  
Plesker, R.; Möller, P.; Blümel, J.

Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland

Die traditionellen interpandemischen Influenzaimpfstoffe bieten einen wirksamen Schutz gegen im Vorfeld identifizierbare jährlich auftretende Virusstämme. Zum Schutz einer immunologisch naiven Bevölkerung gegen neue Virusvarianten mit Pandemiepotenzial sind diese Impfstoffe allerdings nicht ausreichend geeignet. Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung neuartiger Impfstoffkonzepte zur Pandemieprävention ein zentraler Aspekt der am PEI durchgeführten Forschungsarbeiten. Dabei verfolgen wir zunächst den Ansatz der Expression von Influenzaantigenen mit Hilfe des Vacciniavirus MVA. Bisher konnten wir zeigen, dass rekombinante MVA-Vektorkonstrukte, die das Hämagglutinin des pandemischen Stammes A/Vietnam/1194/04 (H5N1) exprimieren, im Mausmodell eine protektive Immunantwort hervorrufen. Interessanterweise ist der Schutz nicht auf eine Infektion mit dem homologen Virus beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf andere H5N1-Stämme wie A/Indonesien/5/05 oder A/HongKong/156/97. Unsere neuesten Daten belegen zudem, dass nach zweimaliger Gabe dieses MVA-Vektorvirus eine ähnliche kreuzreaktive Immunantwort auch in Makaken induziert wird. Dies macht die potenzielle Bedeutung der MVA-Vakzinierung auch für den Menschen deutlich. Wir sind gegenwärtig dabei, diese Untersuchungen auf den im April 2009 neu aufgetretenen H1N1-Pandemie-stamm („Schweinegrippe“) auszudehnen, um die universelle Nutzbarkeit des MVA-Systems zur Entwicklung von Pandemieimpfstoffen zu erforschen.

Ein weiteres wichtiges Betätigungsfeld ist eng verknüpft mit den Zulassungsaufgaben des PEI in Kooperation mit der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA). So trat im Rahmen der Verfahren für die Musterzulassungen der pandemischen H5N1-Impfstoffe klar zutage, dass die Genauigkeit und der Grad der Standardisierung der zur Wirksamkeitsbestimmung eingesetzten serologischen Tests äußerst unzureichend sind. Daher wurden die drei klassischen serologischen Wirksamkeitstest, - dies sind der Hämagglutinationshemmtest (HI), der Neutralisationstest (NT) und der Hämolysetest (SRH) - am Institut etabliert und Anstrengungen zur Verbesserung der Standardisierung unternommen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten konnten bereits erfolgreich

## Forschungs-Sofortprogramm Influenza an den Ressortforschungseinrichtungen

---

bei der Teilnahme des PEI an einer europäischen Ringstudie der EDQM („European Directorate for the Quality of Medicines“) zur Ermittlung der Standardisierbarkeit der Methoden und Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Labore eingebracht werden. Durch Testung einer großen Anzahl von Seren aus klinischen Studien konnten jüngst wichtige Erkenntnisse zum bestehenden Immunstatus in der Bevölkerung gegen die neue pandemische H1N1-Influenza und die durch saisonale Impfung erreichbare Kreuzreaktivität gewonnen werden. Die etablierte serologische Methodik ist darüber hinaus auch von zentraler Bedeutung für die gegenwärtig laufenden Frettchen-studien zur Ermittlung des Einflusses neuer Adjuvanzien auf die Wirksamkeit pandemischer H1N1-Impfstoffen. Das PEI stellt die für diese Untersuchungen benötigten Versuchstiere aus der hauseigenen Frettchenzucht zur Verfügung.

**Workshop Immunität**

## **Human-pathogene, aviäre und porcine Influenzaviren zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Vermehrung in einem humanen ex vivo Lungen-Infektionsmodell**

Weinheimer, V. (Robert Koch-Institut); Becher, A.; Hippenstiel, S. (Medizinische Klinik m. S. Infektiologie Charité); Wolff, T. (Robert Koch-Institut); Bauer, T. (HELIOS Klinikum Emil von Behring, Berlin); Tönnies, M. (HELIOS Klinikum Emil von Behring, Berlin)

Einleitung: Saisonale Influenzaviren, hoch-pathogene aviäre H5N1 Viren sowie die neuen pandemischen swine origin „ H1N1 Viren replizieren im humanen Respirationstrakt, während niedrig-pathogene aviäre Viren sich dort kaum vermehren. Humane respiratorische Epithelzellen exprimieren sowohl aviäre als auch humane Rezeptoren, so dass diese Unterschiede nicht allein durch unterschiedliche Rezeptorverteilung erklärt werden können. Wir untersuchen daher die Hypothese, dass die angeborene Immunität eine entscheidende Rolle bei der Restriktion spielt und diese Barriere von hoch-pathogenen Viren durch bisher nicht identifizierte Mechanismen durchbrochen wird.

Methoden: Um den Beitrag der angeborenen Immunität zur Abwehr von Grippeviren im humanen Respirationstrakt zu untersuchen, wurde ein humanes ex vivo Lungenkulturmodell aus Patientenmaterial etabliert. Im Gegensatz zu häufig untersuchten permanenten Zelllinien, bleibt bei diesen Explantaten die Komplexität der verschiedenen Zelltypen in der humanen Lunge erhalten. In diesem komplexen Modell wurden unterschiedliche Viren mittels Standardplaquetests und Immunhistochemie auf ihre Vermehrungsfähigkeit sowie ihren Zelltropismus untersucht.

Ergebnisse und Diskussion: Sowohl ein saisonales H3N2 Virus als auch ein hoch-pathogenes H5N1 Patientenisolat replizierten effizient in dem Lungenmodell, während ein niedrig-pathogener aviärer Stamm sich kaum vermehrte. Interessanterweise zeigten das human-pathogene und das aviäre Virus einen unterschiedlichen Zelltropismus: der saisonale Stamm infizierte überwiegend Zellen im Bereich der Bronchiolen, während das niedrig-pathogene aviäre Virus vor allem in Zellen in den Alveolen nachweisbar war. Neue pandemische „swine-origin „ H1N1 Viren zeigten im Vergleich zu einem klassischen porcinen Influenzavirus ein erhöhtes Wachstum, welches jedoch deutlich unter dem des saisonalen Stammes lag. Dies deutet auf eine noch unvollständige Adaptation für den unteren

Respirationstrakt hin, die möglicherweise die bisher überwiegend milden klinischen Verläufe bei Patienten erklären könnte.

Derzeit untersuchen wir im Detail die nach Infektion induzierten Zytokine und Signalmoleküle, um deren Beitrag zur Speziesbarriere zu klären.

## **NS1 of pathogenic H5N1 avian influenza virus suppresses interferon synthesis in mice but not chickens.**

Penski, N. (Virology, University of Freiburg); Krohmann, C.; Kothlow, S. (Animal Physiology, University of Munich); Gohrbrandt, S.; Hundt, J. (FLI, Riems); Kothlow, S. (Institute of Animal Physiology, University of Munich); Veits, J.; Breithaupt, A.; Stech, J.; Vahlenkamp, T. (Friedrich-Löffler-Institut); Kaspers, B. (Institute of Animal Physiology, University of Munich); Staeheli, P. (Department of Virology, University of Freiburg)

We generated mutants of a highly pathogenic H5N1 influenza A virus that either contain a C-terminally truncated NS1 gene or lack NS1 altogether. As expected, the mutant viruses were attenuated in chicken embryo cells and activated type I interferon (IFN) genes much more strongly than wild-type virus. The mutant viruses were also attenuated in mice and induced much more IFN in mouse lungs than wild-type virus. Surprisingly, however, a different picture emerged when 5-week-old chickens were challenged with these viruses. The NS1-deficient virus was highly attenuated, but the mutant virus expressing C-terminally truncated NS1 retained a high degree of virulence and was able to kill chickens, although with delayed kinetics compared to wild-type virus. At early and late times post infection, the mutant viruses induced lower rather than higher levels of type I IFN in the lung or other tissues of infected chickens compared to wild-type virus, suggesting that NS1 cannot suppress IFN gene expression in at least one cell population of the chicken which produces large amounts of this cytokine in response to viral infection. Interestingly, treatment of chicken embryo cells or tracheal explants with chicken IFN-alpha prior to infection did not strongly inhibit replication of the wild-type H5N1 virus. Similarly, intravenous treatment of chickens with high doses of exogenous chicken IFN-alpha prior to and during infection failed to confer protection against wild-type H5N1 virus challenge. Taken together our data indicate that the primary role of the influenza A virus NS1 protein during infection of birds is not suppression of IFN synthesis and that type I IFN does not contribute substantially to resistance of chickens against highly pathogenic influenza A viruses.

## **H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses are susceptible against interferon type I treatment in vitro and in vivo**

Planz , O.; Haasbach, E. (Friedrich-Loeffler-Institut); Droebner , K.; Vogel , A. B. (Friedrich-Loeffler-Institut, Institute of Immunology)

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus infection leads to high lethality in mammals as a result of extensive alveolar immune inflammatory infiltrates causing tissue damage that compromises lung function. Additionally, H1N1 viruses are a major topic of human health care especially after the last pandemic of the new emerging swine-origin influenza virus (S-OIV). The innate immune response to influenza A viruses initially involves the production of type I and II interferons (IFN). Innate cytokine responses, such as alpha/beta interferon (IFN- $\alpha/\beta$ ) or IFN- $\gamma$ , play a crucial role in determining the rate of virus replication in the initial stage of the infection and in shaping the initial inflammatory and downstream adaptive immune responses. The fact that there is an urgent need for new antivirals against influenza virus and that type I IFN is already in clinical use raise the question whether IFN type I treatment would be suitable against influenza virus infection. In our study we examined the effect of IFN alpha on the replication of HPAI H5N1 and S-OI virus in vitro and in vivo after IFN- $\alpha$  treatment. Therefore, we treated mice intranasally (i.n.) with low dose IFN- $\alpha$  (1000 units) during virus infection. A single pretreatment reduces progeny virus titer in the lung up to 1.4 log units. The antiviral effect against H5N1 was increased up to 2 log units after multiple pretreatment. Survival analyses shown that IFN- $\alpha$  treatment protected mice against a lethal H5N1 influenza virus infection. Furthermore we determined reduction of S-OIV titers in vitro and in vivo. The used IFN- $\alpha$  units cause no toxicological findings in the spleen or liver. Our data gave rise to the assumption that oral IFN type I treatment leads to the induction of antiviral cytokines that might be involved in the reduction of H5N1 and S-OI virus titer in the lung.

## **H5N1 Influenza A Virusisolate aus Vögeln und Menschen stimulieren das humane Typ I Interferonsystem unterschiedlich stark**

Matthaei, M.; Weinheimer, V.; Wolff, T. (Robert Koch-Institut)

Einleitung: Hoch-pathogene H5N1-Influenza A Viren (IAV) werden direkt von Vögeln auf den Menschen übertragen. Diese Infektionen verlaufen zu über 60% fatal und können begleitet sein von einer starken nicht-adaptiven Immunantwort und hoher Viruslast. Frühere Untersuchungen von H5N1-Patientenisolaten in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen führten zu unterschiedlichen Aussagen über die Aktivierung der nicht-adaptiven Immunität und deren Einfluss auf die Vermehrung der H5N1-Stämme. Ein direkter Vergleich zwischen H5N1-Vogel- und Patientenisolaten in humanen Zellen erfolgte bisher in keiner Studie. Die antiviralen Typ I Interferone (IFN)-alpha und -beta, sind wichtige Mediatoren der nicht-adaptiven Immunantwort. Epidemische IAV unterdrücken mit ihrem Nichtstrukturprotein1 (NS1) die Induktion von Typ I IFNs, während einige Studien eine starke Typ I IFN-Induktion durch H5N1-Stämme beschreiben. Dies könnte auf eine eingeschränkte Funktionalität der H5N1-NS1-Proteine in humanen Zellen deuten und zu einer verstärkten Zytokininduktion zumindest beitragen. Wir fragten uns daher, ob H5N1- Patienten- oder Vogelisolate das Typ I IFN-System im Vergleich zu epidemischen IAV in humanen Zellen unterschiedlich modulieren.

Methodik: Zwei aviäre H5N1-Isolate und zwei H5N1-Isolate aus Patienten wurden hinsichtlich Vermehrungsfähigkeit und Typ I IFN-Induktion mit einem saisonalen H3N2-Stamm verglichen. Mittels reverser Genetik wurden weiterhin reassortante Viren generiert, die die jeweiligen H5N1-NS-Segmente in Hintergrund des H3N2-Stammes tragen. Virusvermehrung in humanen Lungenepithelzellen und in humanem Lungengewebe wurde durch Plaquetests untersucht. Die IFN-beta-Konzentration in Zellkulturüberständen wurde per ELISA bestimmt, sowie die Vermehrung der Viren nach Zugabe von IFN-alpha in das Zellkulturmedium. Der Einfluss der H5N1-NS1-Proteine auf die Aktivierung des humanen IFN-beta-Promotors wurde in einem Reporterassay untersucht.

Ergebnisse: Die zwei aviären H5N1-Isolate erreichten geringere Titer in humanem Lungengewebe und in Lungenepithelzellen und induzierten eine stärkere IFN-beta-Sekretion als die H5N1-Patientenisolate. Die rekombinanten H3N2-NS-Reassortanten replizierten ohne eine starke Typ I IFN-Antwort auszulösen. Alle NS1-Proteine unterdrückten effizient die

Aktivierung eines humanen IFN-beta-Promotors. Die Vermehrung aller Stämme wurde durch Zugabe von IFN-alpha in das Zellkulturmedium inhibiert.

Diskussion: Unsere Ergebnisse zeigen, dass die H5N1-NS1-Proteine im Hintergrund eines saisonalen H3N2-IAV die Replikation des wt-H3N2-Stammes komplementieren und die Aktivierung des Typ I IFN-Systems unterdrücken. Die hohe IFN-beta-Induktion durch die H5N1-Vogelisolat in humanen Zellen wird demnach durch andere virale Faktoren verursacht und ist wahrscheinlich Ursache für ihre geringe Vermehrung. Dies und die IFN-Sensitivität aller Stämme deuten auf eine ähnliche Wirksamkeit von Typ I IFN im Menschen, wie in Mäusen, Frettchen und Meerschweinchen hin, in denen eine IFN-Behandlung die Viruslast bei H5N1-Infektionen deutlich senkt. Die in humanen Zellen funktionellen H5N1-NS1-Proteine untermauern das pandemische Potential dieser Stämme und deuten auf Veränderungen in den anderen viralen Proteinen hin, die den Patientenisolaten eine gute Vermehrung in humanen Zellen ermöglichen und den Vogelisolaten fehlt.

## **Influenza A Virus inhibits Type I IFN Signaling via NF- $\kappa$ B dependent Induction of SOCS-3 Expression**

Pauli, E. (Institute of Molecular Virology, Münster); Wolff, T. (Robert-Koch-Institut); Roth, J. Viemann, D. (Institute of Immunology and Department of Pediatrics, Münster); Ludwig, S. (Institute of Molecular Virology, Münster)

The type I interferon (IFN) system is a first line of defense against viral infections. Viruses have developed various mechanisms to counteract this response. So far, the interferon antagonistic activity of influenza A viruses was mainly observed on the level of IFN $\beta$  gene induction via action of the viral NS1 protein. Here we present data indicating that influenza A viruses not only suppress IFN $\beta$  gene induction but also inhibit type I IFN signaling through a mechanism involving SOCS-3 gene induction. Our study was based on the observation that in cells that were infected with influenza A virus and subsequently stimulated with IFN $\alpha/\beta$ , STAT1 phosphorylation was strongly reduced. This impaired STAT1 activation was not due to the action of viral proteins but rather appeared to be induced by accumulation of viral 5' triphosphate RNA in the cell. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins are potent endogenous inhibitors of JAK/STAT signaling. Closer examination revealed that SOCS-3 but not SOCS-1 mRNA levels increase in an RNA- and NF- $\kappa$ B-dependent but type I IFN-independent manner early in the viral replication cycle. This direct viral induction of SOCS-3 mRNA and protein expression appears to be relevant for suppression of the antiviral response since in SOCS-3 deficient cells a sustained phosphorylation of STAT1 correlated with elevated expression of type I IFN-dependent genes. As a consequence, progeny virus titers were reduced in SOCS-3 deficient cells or in cells where SOCS-3 expression was knocked-down by siRNA. These data provide first evidence that influenza A viruses suppress type I IFN signaling on the level of JAK/STAT activation. The inhibitory effect is at least in part due to the induction of SOCS-3 gene expression, which results in an impaired antiviral response.

## **TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS DELAYS INTERFERON INDUCTION AND IS HIGHLY SENSITIVE TO THE INTERFERON-STIMULATED GENE VIPERIN**

Överby, A. (Department of Virology, IMM, University of Freiburg); Dobler, G. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr); Niedrig, M. (Robert Koch Institut); Guo, J.; (Drexel University College of Medicine, Doylestown, Pennsylvania, USA); Weber, F.; (Department of Virology, IMM, University of Freiburg)

Tick borne encephalitis virus (TBEV) is an important human pathogen both in Europe and in Asia. TBEV can cause mild and severe encephalitis in humans with a case fatality range of between 0.5-2.0% for central European strains and 5-20% for far eastern strains. No antiviral drug is currently available against TBEV, however, it is known that an intact interferon (IFN) system is important for clearing flavivirus infections. The project aims to determine if TBEV induces IFN upon infection and which IFN-induced antiviral proteins are acting on TBEV. The IFN induction of TBEV was analyzed by real time qRT-PCR and assays for secreted IFN. We observed that TBEV significantly delays the induction of IFN genes compared to a control virus, resulting in the absence of secreted IFN even 24 h after infection. In line with this, the IFN transcription factor IRF3 was only weakly activated by TBEV. We also analyzed the IFN sensitivity of TBEV by pre-treating cells with different amounts of IFN alpha and measuring virus replication in cells and virus load in the supernatant. TBEV turned out to be extremely sensitive to IFN, as viral RNA and titres were reduced by up to 1000-fold after treatment with 100 units IFN alpha. To identify the cellular protein mediating the anti-TBEV effect of IFN alpha, we performed a screen of inducible cell lines expressing individual IFN-stimulated genes with antiviral activity. This screen identified viperin, a novel and so far only insufficiently characterized membrane protein, as a very strong inhibitor of virus replication. Viperin was able to reduce TBEV multiplication by a factor of 10.000. Thus, TBEV most likely delays the induction of IFN genes after infection in order to have a headstart in replication, since the virus is extremely sensitive towards IFN. Viperin is most likely the major player mediating this IFN sensitivity.

## **Intracellular mechanisms of MHC I-antigen processing in chlamydia-infected professional APCs**

Knittler, M.; Fiegl, D.; Weißer, T.; Rufer, E. (Friedrich-Loeffler-Institut, Tübingen, Institut für Immunologie)

Introduction: cytotoxic T lymphocytes (CTLs) monitor cells for non-self protein expression by scanning their surface for MHC I molecules presenting antigenic peptides. Recognition of MHC I-bound peptide epitopes by antigen-specific CTLs mediates the efficient clearance of pathogenic infections. Dendritic cells (DCs) are likely to be the first professional antigen presenting cells (APCs) that are encountered by zoonotic and host-specific chlamydiae during infection. It is thought that CTLs primed by infected DCs play an important role in the effective immune response against chlamydial infection. Normally, CTLs are activated by MHC I-presented peptide antigens that are generated within the cytosol by the proteasome. However, chlamydial inclusions do apparently not intersect with this classical pathway of antigen processing. Despite the crucial role of the CTLs the intracellular pathways of chlamydial antigen processing and presentation by MHC I in infected APCs is still unclear.

Methods, Results & Discussion: To investigate MHC I-presentation of chlamydial antigens in DCs we performed in vitro-infection studies using the DC cell line JAWS II. We demonstrate by cell biological, immunological and biochemical methods that *C. psittaci* infection leads to maturation of DCs as shown by morphological changes as well as secretion of different proinflammatory cytokines and chemokines. Chlamydia-infected DCs are additionally characterized by an increased expression of GBP1 suggesting an activation of cell-autonomous resistance mechanisms during infection and DC maturation.

By immunofluorescence studies we observed at early time points of infection a co-localization of chlamydial vacuoles with late endosomes containing cathepsin D, which is believed to play an essential role in the antigen processing of the vacuolar MHC I cross-presentation. Furthermore, upon chlamydial infection surface presentation of MHC I-complexes is up-regulated. This is accompanied by an increased expression of the transcription factor RFX5, MHC I and the chaperone tapasin that controls intracellular MHC I assembly and maturation. This induction of the MHC I-pathway seems to require to some extent autocrine TNF- $\alpha$  signaling. In contrast, however, no comparable stimulation was observed for the peptide transporter TAP, which is functionally essential for the classical antigen presentation. Most

interestingly, our experiments revealed that during DC-infection post-ER MHC I molecules are translocated from the Golgi/TGN to cathepsin D-containing compartments indicating for the first time that DCs are indeed able to cross-present chlamydial antigens via a TAP-independent vacuolar MHC I-pathway. On the basis of our new findings we postulate that the vacuolar MHC I-pathway plays key role in the intracellular processing of chlamydial antigens. We are currently setting up an assay in which we analyze the activation of chlamydia-specific CTLs by infected DC variants that are silenced for the different components of the classical and non-classical MHC I-machinery. This will provide further detailed information on the function of cell-autonomous resistance and the mechanisms of MHC I-presentation in chlamydia-infected APCs.

## Host-adaptation and the zoonotic potential of *Salmonella* serovars

Tedin, K.; Maurischat, S.; Molina, A.; Walk, N; Schwerk, P. (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin)

Introduction: Serovars of the facultative, intracellular pathogen *Salmonella enterica* are estimated to be responsible for up to 20 million cases of Typhoid and more than 1 billion cases of gastroenteritis with over 3 million deaths each year. However, not all *Salmonella* serovars are infectious for humans, many are host-adapted or persist within certain animal populations. The zoonotic potential of *Salmonella* lies in the high adaptability of this pathogen. Host-adapted serovars can acquire a broad host-range specificity, and broad host-range serovars can also adapt to specific hosts. Recent studies have shown that host immune responses play a decisive role in the ability for certain serovars to establish infections, indicating serovar-specific interactions between *Salmonella* and its host plays a key role in determining the zoonotic potential of a serovar. Our project seeks to understand the basis for the differences in immune responses to different *Salmonella* serovars. Methods: Invasion and intracellular growth characteristics of broad host range and host-adapted *Salmonella* serovars were performed in intestinal epithelial and macrophage cell lines of human, mouse, porcine and chicken origins. We also compared intracellular growth of the serovars in chicken macrophage cell lines at both 37°C and 42°C, the normal body temperature of chickens. Host innate immune responses to infection by different *Salmonella* serovars and mutants were determined using NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter constructs in cell lines of different species. Results: Despite differences in invasion rates among the serovars in different cell lines, all were invasive for the host cells regardless of the species. However, differences were observed between serovars for their ability to survive or grow in macrophage cell lines. While all serovars survived after uptake by chicken macrophage at 37°C, at 42°C, only *S. typhimurium* and *S. enteritidis* were able to survive or grow, *S. choleraesuis* (swine-adapted) and *S. dublin* (cattle-adapted) were killed. In other experiments, differences in the activation of NF- $\kappa$ B in response to different serovars were observed, suggesting bacterial characteristics are involved in eliciting different innate immune responses. Discussion: All serovars so far tested were capable of infecting both intestinal epithelial and macrophage cell lines of human, mouse, porcine and chicken origins, although to different extents. Intracellular growth in macrophage cell lines however, revealed differences between broad host range and host-

adapted serovars for survival in these immune cell lines, indicating the host cell responses to the different serovars plays a large role in the outcome of the infection. Interestingly, despite the apparent reduced intracellular growth of host-adapted serovars such as *S. choleraesuis* compared to a broad host range serovar such as *S. typhimurium* in standard invasion assays, detailed characterization showed the intracellular growth rates of both serovars were identical, *S. choleraesuis* appears to induce host cell killing at an earlier time point, leading to an apparent reduction in the bacterial load in infected cells, but which could indicate a more rapid release of the bacteria and accelerated infection of new cells in the host. The basis for this observation, and a possible role for bacterial modulators of host immune responses will be discussed.

## **Persistence of *Toxoplasma gondii* and parasite control in skeletal muscle**

Lüder, C.; Takacs, A.; Ferreira da Silva, M.;(Institute for Medical Microbiology, University Medical Center Göttingen)

*Toxoplasma gondii* is widespread within the human population worldwide and is an important opportunistic pathogen of humans with immature or suppressed immune responses. One of the most common ways of transmission of *T. gondii* to humans is via ingestion of raw or undercooked meat from chronically infected livestock. The differentiation of fast-growing tachyzoites to the bradyzoite stage, the parasite persistence within tissue cysts, and the host factors that control these events in skeletal muscle cells are critical for this route of transmission.

We used primary skeletal muscle cells (SkMC) from mouse embryos and C2C12 permanent SKMC in order to elucidate mechanisms that regulate the replication and trigger stage conversion of the parasite in muscular tissue. Myoblasts were differentiated in vitro to mature multi-nucleated myotubes as revealed by the expression of muscle-specific transcription factors MyoD and Myogenin as well as myosin heavy chain and by displaying regular contractions. After infection with a clinical isolate of *T. gondii*, tachyzoites invaded SkMC and C2C12 cells and started to replicate within 24 hours of infection. Remarkably, intracellular tachyzoites readily differentiated to bradyzoites in SkMC without the need of exogenous stress factors. Double immunofluorescence labelling revealed significantly more bradyzoite-containing vacuoles in SkMC than in murine fibroblasts at 24 hours until 6 days after infection. Furthermore, transcript levels of bradyzoite-specific ENO1 but not tachyzoite-specific ENO2 strongly increased in *T. gondii*-infected SkMC until 6 days of infection. Treatment of differentiated SkMC or C2C12 cells with IFN- $\gamma$  alone or in combination with TNF- $\alpha$  strongly decreased the replication of *Toxoplasma* in these cells as determined by quantitative growth assays using b-Gal transgenic parasites. Immunofluorescence microscopy revealed that both intracellular replication and host cell invasion over time were impaired in IFN- $\gamma$ -treated muscle cells. Unexpectedly, reduced replication of *T. gondii* in activated muscle cells did not promote the differentiation towards the bradyzoite stage.

In conclusion, we have established specific interactions of *T. gondii* with differentiated muscle cells that may be of prime importance for one of the major routes of transmission to humans via meat products of livestock.

Supported by BMBF-fund TOXONET01.

**Workshop Diagnostik und Epidemiologie I**

### **Epidemiologie und Surveillance von Zoonosen: Aufgaben und Aktivitäten des RKI**

Stark, K. (Robert Koch-Institut, FG 35 Gastroenterologische Infektionen, Zoonosen und tropische Infektionen, Berlin)

Über zwei Drittel der in Deutschland meldepflichtigen Infektionserreger sind Zoonosen. Die Surveillance-Daten erlauben wichtige Aussagen über die räumlich-zeitliche Dynamik der Infektionskrankheiten. Sie schaffen die Voraussetzung für die Früherkennung und Untersuchung von Ausbrüchen und bilden eine gute Basis für epidemiologische Studien und mathematische Modellierungen.

Aufgrund ihrer Häufigkeit und hohen Ausbruchspotentials sind die durch Lebensmittel übertragenen Infektionen (z. B. Salmonellen, Campylobacter) von großer Bedeutung. Dies gilt ebenso für viele vektorübertragenen Infektionen, die in der räumlichen Verteilung und im zeitlichen Trend stark variieren können. Ihr Auftreten ist durch vielfältige Faktoren bedingt (Tierreservoirs, Vektoren, menschliche Verhaltensweisen), deren Zusammenspiel noch zu wenig verstanden ist und verstärkt untersucht werden sollte.

Im Vortrag werden die Aufgaben des RKI im Bereich der Zoonosen-Surveillance skizziert und ausgewählte epidemiologische Projekte vorgestellt. Dabei soll der Nutzen und der weitere Bedarf der interdisziplinären Kooperation zwischen Bundesinstituten, Landes- und Lokalebene und dem akademischen Bereich verdeutlicht werden.

### **Porzine Influenzaviren - Risikopotential für den Menschen**

Zell, R.; Wutzler P.; (Institut für Virologie und Antivirale Therapie) Bengsch, S.  
(Institut für Transfusionsmedizin)

Einleitung: Die gegenwärtig beim Menschen zirkulierenden H1N1- und H3N2-Influenza-A-Viren verursachen die saisonale Influenza. Daneben kommt es gelegentlich zu zoonotischen Infektionen. Beispielhaft seien die mit einer hohen Letalität einhergehenden menschlichen Infektionen durch hochpathogene aviäre H5N1-Stämme genannt. Wie die aktuelle Influenzavirus-Situation zeigt, können zoonotische Infektionen auch ein pandemisches Potential haben. Bei Schweinen werden regelmäßig Influenzaviren verschiedener genetischer Linien nachgewiesen. So treten in Nordamerika seit 1918 classical swine Viren vom Subtyp H1N1 sowie seit 1997 Tripelreassortanten verschiedener Subtypen mit Gensegmenten aus classical swine, aviären und humanen Stämmen auf. Die in Europa prävalenten Schweineinfluenzaviren etablierten sich 1979 nach Übertragung eines aviären H1N1-Virus auf das Schwein. Drei Subtypen zirkulieren in europäischen Schweinepopulationen und haben hier die classical swine Viren verdrängt. Die H1N1-Stämme werden als „avian-like“, bezeichnet, die H3N2- und H1N2-Reassortanten als „human-like“, da ihre Hämagglutinin- und Neuraminidasegene von humanen Viren stammen. Seit 1999 treten europäische Schweineinfluenzaviren auch in Hong Kong auf. Daneben wurden in den letzten Jahren in Südostasien (Hong Kong, Thailand, Philippinen) wiederholt Reassortanten aus europäischen Schweineinfluenzaviren und classical swine bzw. amerikanischen Tripelreassortanten isoliert. Auch der neue H1N1-Pandemiestamm ist durch Reassortierung eines eurasischen H1N1-Schweineinfluenzavirus mit einer nordamerikanischen Tripelreassortanten wahrscheinlich in dieser Region entstanden.

Zoonotische Infektionen wurden mit allen bekannten genetischen Linien von Schweineinfluenzaviren nachgewiesen. Für die eurasischen Schweineinfluenzaviren wurden bisher sieben Fälle zoonotischer Infektionen des Menschen dokumentiert. Humane Infektionen mit diesen Viren sind durch eine insgesamt milde Symptomatik gekennzeichnet. Demgegenüber weisen zoonotische Infektionen durch classical swine Viren eine mitunter ausgeprägte Klinik auf und können auch zum Tode führen.

Methode: Die Studie wurde als Seroprävalenzstudie angelegt. Zwischen Dezember 2007 und April 2009 wurden Seren von 118 Probanden aus Thüringen mit häufigem Kontakt zu Schweinen (Schweinemäster,

Tierärzte, Schlachter) im Hämagglutinationshemmtest und Virusneutralisationstest auf Antikörper gegen 9 porcine Influenzavirusisolate (je 3 der prävalenten Subtypen H1N1, H1N2, H3N2) sowie gegen saisonale Influenzaviren (je 1 H1N1 und H3N2) und ein humanes H1N2-Isolat getestet. Als Kontrollgruppe dienten 118 Seren von Blutspendern ohne Kontakt zu Schweinen. Alters- und Geschlechtsverteilung der beiden untersuchten Gruppen waren gleich.

Ergebnisse: Voruntersuchungen mit kommerziell erhältlichen ELISA-Kits zeigten, daß 99 % der Teilnehmer beider Gruppen im Laufe ihres Lebens eine Influenzavirusinfektion durchgemacht hatten. 48 % der Exponierten und 51 % der Kontrollgruppe wiesen Antikörper gegen Influenzaviren der Saison 2006/07 auf. Seren von 18 Exponierten wiesen in beiden Testen übereinstimmend erhöhte Titer gegenüber verschiedenen europäischen Schweineinfluenzaviren aller drei Subtypen auf. Am häufigsten fanden sich Infektionen mit H3N2-Viren (18/18) gefolgt von Infektionen durch H1N2- (9/18) und H1N1-Stämme (3/18). Dreizehn von 18 positiven Befunden wurden durch Untersuchung eines Folgeserums bestätigt; in 5/18 Fällen war die Entnahme eines Zweitserums nicht möglich. Die Prävalenz kann abhängig von Subtyp und Berufsgruppe bis zu 22,7 % (7,8-45,4 %,  $p < 0,001$ ) betragen. Die meisten dieser Infektionen wurden bei Probanden mit zehnjähriger oder längerer Expositionszeit nachgewiesen. Kein Serum der Kontrollgruppe wies einen erhöhten Antikörpertiter gegen porcine Influenzaviren auf.

Diskussion: In dieser thüringenweiten Pilotstudie wurde gezeigt, dass regelmäßiger Kontakt mit Schweinen zu zoonotischen Infektionen mit den in Europa prävalenten avian-like H1N1- und human-like H1N2- und H3N2-Stämmen führen kann. Solche Infektionen sind häufiger als aufgrund sporadischer Virusisolierungen erwartet.

### **EPIDEMIC COWPOXVIRUS INFECTIONS IN GERMANY**

Nitsche, A.; Kurth, A. (Robert Koch-Institut, Berlin); Kuczka, A. (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper, KREFELD); Becker, C. (HELIOS Klinikum Krefeld); Pauli, G. (Robert Koch-Institut), Nitsche, A. (Robert Koch-Institut)

Einleitung: Several zoonotic infections by orthopoxviruses (OPV) are representing a threat to humans today. Cowpox (CPXV) has been enzootic in cattle in Europe, however, no such infections were diagnosed in Germany over the last decades. Instead, individual cases of CPXV infections are increasingly found in cats and their owners. Both cats and humans present with local exanthema on arms and legs or in the face. Although it is generally regarded as a self-limiting disease, immunosuppressed patients can develop lethal systemic disease that resembles a variola virus infection. Here we report a cumulated incidence of human CPXV infections transmitted directly from pet rats.

Methodik: Crust material, swabs and serum from patients presenting with CPXV-typical skin lesions were subjected to either real-time PCR assays specific for humanpathogenic poxviruses or to serology testing by immunofluorescence staining of CPXV-infected cells with the patient's serum. OPV-positive specimens were typed by sequencing of the complete hemagglutinin ORF. Ergebnisse: All patients had a case history showing close contact to pet rats and were PCR positive for OPV only. Few patients had been vaccinated with Vaccinia virus. In all cases the virus was isolated and identified as an identical CPXV strain. However, in comparison to recent CPXV infections found in Germany, this virus represented a new strain. In addition, all patients showed significant OPV-specific titers.

Diskussion: We could show for the first time that the same CPXV strain is detected in rat populations over a time period of six months. In this context, the increasing popularity of pet rats implicates the risk of cowpox virus transmission to humans. The screening of pet rats for poxviruses should be discussed in the future.

## **First evidence for Toscana virus-associated encephalitis emerging north of the alps**

Meyer-König, U.; Schneider, K.; Özdemir, S. Abteilung Virologie, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg); Weidmann, M. (Institut für Virologie, Universitätsmedizin Göttingen); Dobler, G. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr); Hufert, F. (Institut für Virologie, Universitätsmedizin Göttingen)

Introduction: Toscana virus (TOSV), a member of the bunyavirus family (genus Phlebovirus), is transmitted by the bite of infected sandflies (*Phlebotomus perniciosus* and *perfiliewi*) which are present in the Mediterranean. TOSV appears to be 1 of the 3 major viral pathogens involved in aseptic meningitis acquired during the summer in this area. In Germany so far only imported cases associated with travelling into endemic areas have been reported. Since the first description of *Phlebotomus perniciosus* in 2001 in Germany these flies became endemic esp. in South-West Germany possibly due to global warming. Up to 60% of all meningoencephalitis (ME) cases in Germany are of unknown aetiology. It is highly likely that neurotropic viruses such as TOSV are responsible for some of the unknown ME cases. To prove this hypothesis we analyzed the prevalence of TOSV specific antibodies (ab) in ME cases of unknown origin collected in Southern Germany.

Material and Methods: Between the years 2003 and 2009 a total of 3878 samples (1868 CSFs and 2010 sera) from 1770 patients with suspected ME were collected. Patients' material was obtained either from the University Hospital Freiburg or the Department of Neurology, Klinikum Pforzheim. The medical records were screened and patients were grouped according to the clinical data. Infectious neurologic disease with unknown agent was found in 150 of 1770 cases. In parallel, a healthy control group consisting of 373 employees of the University Clinics of Freiburg was analyzed. TOSV-serology was performed by indirect immunofluorescence (IFA). Additionally, CSFs were analyzed for TOSV by in house RT-PCR. Missing routine diagnostic testing was completed to exclude known aetiologies of ME.

Results: The seroprevalence study of the healthy control group revealed that 29 / 373 (7.7%) were anti-TOSV-IgG positive. However, 7/28 (2.5%) were anti-TOSV-IgM positive at a dilution titre of 1:10 indicating low specificity. Testing of samples from cases with acute ME of unknown aetiology (n = 150) showed that 12 / 85 (14%) of the cases were positive in TOSV-IgG-IFA and 53 / 150 (35%) in TOSV-IgM-IFA. Possible TOSV-infected symptomatic cases were defined as follows: isolated TOSV-IgM-

titers > 1:40 or simultaneous detection of IgG and IgM ab with IgM titers > 1:20. A total of 10/150 (6.6%) of cases fulfilled this definition. None of these previously had been in an endemic area. TOSV-RT-PCR was negative in all cases. However, in one of the cases intrathecal TOSV- IgG ab could be detected.

Conclusions: We could discover the first autochthonous human TOSV infections in South-West Germany indicating the emergence of TOSV north of the Alps. We found that TOSV infections were the cause of unknown ME cases in up to 6.6%. Therefore, TOSV has to be considered in diagnosis and management of infectious neurologic disease in Germany.

### **Vorkommen von West-Nil-Virus-Antikörpern bei Wildvögeln in Deutschland**

Ziegler, U.; Seidowski, D.; Keller, M.; Groschup, M. (Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger)

Die durch Insekten übertragbaren Viruskrankheiten erfahren angesichts des eingeleiteten Klimawandels bei Mensch und Tier eine zunehmende Beachtung. Zu diesen durch sog. Arbo-Viren (Abkürzung für ‚arthropod-borne‘) verursachten Erkrankungen gehört auch das West-Nil-Virus (WNV), ein in Deutschland noch exotisches Virus der Familie Flaviviridae, das besonders seit seiner Einschleppung und epidemischen Ausbreitung in Nordamerika auch in Europa erhebliche Aufmerksamkeit erfährt. Das Virusreservoir stellen infizierte Vögel dar. Die Hauptüberträger des WNV sind Stechmücken der Gattung *Culex*. Die Virusinfektion kann beim Menschen als sog. Fehlwirt zu einer Enzephalitis führen und hat in den Vereinigten Staaten seit seiner Einschleppung im Jahre 1999 zu mehr als 1000 Todesfällen geführt.

Bei ersten Studien in Deutschland (2000, 2002-2005) wurden bei bis zu 10% der untersuchten Vogel-Serumproben Antikörper gegen WNV nachgewiesen, meist jedoch mit nur niedrigem Titer. WNV-spezifische Nukleinsäuren waren in keiner der Proben zu finden (Linke et al. 2007). Gleiches gilt auch für die am FLI durchgeführte Studie in den Jahren 2002-2003, zum WNV-Vorkommen bei ca. 1000 untersuchten Wildvögeln. In den untersuchten 323 gepoolten Rachen- und Kloakentupferproben konnte kein WNV bzw. WNV-Genom nachgewiesen werden (Schirrmeyer et al. 2004). Da die als WNV-Vektoren fungierenden Stechmückenarten in Deutschland vorkommen, ist eine Einschleppung des WNV-Erregers und seine enzootische Etablierung prinzipiell nicht auszuschließen. Deshalb wurde ein Forschungsprojekt am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) bearbeitet, das in ein Verbundprojekt zur Zoonoseforschung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) eingebunden ist.

Im Rahmen dieser Studie wurden serologische WNV-Untersuchungen und der virus- bzw. nukleinsäurebasierte Erregernachweis zur Überwachung der Zugvögel- und einheimischen Vogelpopulationen durchgeführt. Als serologische Methoden kamen ein indirekter Immunfluoreszenztest basierend auf kommerziellen Objektträgern der Firma Euroimmun Corp., Lübeck, sowie ein micro-Neutralisationstest (modifiziert nach Linke et al. 2007) zur Anwendung. Der Virusgenom-Nachweis erfolgte mittels spezifischer realtime-PCR-Verfahren.

Dazu wurden insgesamt über 2.700 Blutproben aus 72 Wildvogelspezies, sowohl Zug- als auch Standvögel untersucht. Dabei wurde ein besonderes

Augenmerk auf die Sperlingsvögel (Passeriformes) gerichtet, darunter auch Krähenvögel, denen eine zentrale Rolle bei der Verbreitung des Erregers zugeschrieben wird. Weiterhin wurden zur Überwachung der einheimischen Vogelpopulation neben den Proben der freilebenden Standvögel auch mehrere tausend Proben von Freilandgeflügel (Enten, Gänse, Hühner) untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurden ähnliche Ergebnisse wie bei den vorangegangenen Studien gefunden: positive Antikörper-Nachweise bei Zugvögeln, aber bisher nicht bei Standvögeln oder freilebendem Wirtschaftsgeflügel. Wir fanden in 11 von 72 Wildvogelspezies WNV-Antikörper mittels Immunfluoreszenztest. In 10 Vogelspezies konnten diese Antikörper mittels Neutralisationstest bestätigt werden. WNV-Genom konnte in keiner der bislang untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die Untersuchungen sollen zur fortlaufenden Überwachung der Haus- und Wildtierbestände hinsichtlich der Einschleppung von West-Nil- und anderen Flaviviren fortgesetzt werden. Zusammenfassend lässt sich derzeit kein akutes WNV-Geschehen für Deutschland nachweisen. Der Viruseintrag kann über Zugvögel erfolgen. Der Nachweis von geringen Antikörpertitern in der Wildvogelpopulation (speziell langstreckenziehende Zugvögel) spricht für den Kontakt des Virus im Endemiegebiet. Die weitere Klimaerwärmung und das Vordringen der Vektoren könnten jedoch den Vormarsch der Erkrankung nach Deutschland begünstigen. Diese Studie kann zur nationalen Risikobewertung dienen.

### **SARS-like Coronaviruses in European Bats**

Drexler, J. F. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre); Gloza-Rausch, F. (Noctalis, Centre for Bat Protection and Information / Zoological Institute, Department of Ecology, University of Kiel); Glende, J. (Institute of Virology, University of Hannover Veterinary Faculty); Corman, V. M. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre); Goettsche, M. (Noctalis, Centre for Bat Protection and Information / Zoological Institute, Department of Ecology); Seebens, A. (Noctalis, Centre for Bat Protection and Information); Yordanov, S. (Forestry Board Directorate of Strandja Natural Park, Malko Tarnovo, Bulgaria); Zhelyazkov, L. (Forestry Board Directorate of Strandja Natural Park, Malko Tarnovo, Bulgaria); Hermanns, U. (Bat Conservation and Research Group Mecklenburg-Vorpommern); Müller, M. A. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre); Vallo, P. (Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic); Herrler, G. (Institute of Virology, University of Hannover Veterinary Faculty); Drosten, C. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre)

**Background:** The aetiologic agent of the 2002/03 international severe acute respiratory syndrome (SARS)-epidemic was identified as a novel coronavirus (CoV) in 2003. The epidemic originated in China and in 2005, Chinese horseshoe bats (*Rhinolophus sinicus*) were recognised as the likely host of this zoonotic virus. Since then, a growing number of novel bat coronaviruses has been identified in bats. Bats may be the original host for all extant coronaviruses.

**Methodology/Principal findings:** Feces from five European *Rhinolophus* species (*R. euryale*, *R. blasii*, *R. ferrum-equinum*, *R. mehelyi*, *R. hipposideros*) and 14 other vespertilionid bat species were sampled in Strandja Natural Park, Bulgaria. All samples were tested for coronavirus RNA. Four novel group 1b CoV could be identified in bats belonging to *Myotis*, *Miniopterus*, *Nyctalus*, and *Rhinolophus* species. Additionally, a SARS-like group 2b CoV were found in all but one of the *Rhinolophus* species sampled. 101 of 386 (26.2%) of individual *Rhinolophus* samples were positive for the SARS-like virus in specific real time RT-PCR. Median virus concentration was 160,000 RNA copies per gram of feces. A group 1b CoV was frequently co-detected in the same bats. In general, this virus had the same concentrations as the SARS-like virus. No differences in virus prevalence or concentration could be observed in samples originating from two different seasons. The spike protein gene of the Bulgarian SARS-like virus was cloned in a vesicular stomatitis virus (VSV) pseudotyping system and tested for its potential to mediate virus entry into human cells. No entry was observed in several different cell lines.

**Conclusions/Significance:** The first finding of a SARS-like group 2b CoV outside of China implicates a significant extension of the region of potential endemicity of this coronavirus group. However, RNA

concentrations in feces were moderate and the spike protein of this virus did not mediate entry pseudotyped VSV. This suggests a limited risk of zoonotic transmission of European SARS-like bat viruses.

## **Use of viral pseudotypes to analyze the ability of the S protein of bat coronaviruses to mediate infection**

Herrler, G.; Glende, J.; (Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover)

The S protein of coronaviruses plays a central role in the initiation of infection, because it mediates both binding to cell surface receptors and fusion of the viral with the cellular membrane. To analyze the function of the S proteins independent of other coronavirus proteins, we generated viral pseudotypes based on vesicular stomatitis virus that contain on the surface the S protein of coronaviruses. In this way, we demonstrated the cholesterol dependence of the entry process mediated by the S protein of SARS coronavirus. Viral pseudotypes were also used to analyze the S protein of a SARS-like bat coronavirus. We were able to show that this S protein of a bat coronavirus derived from a *Rhinolophus* species was able to mediate infection of cells derived from a *Rhinolophus* species. This result demonstrates that viral pseudotypes can be used to analyze the S-mediated tropism of bat coronaviruses.

### **Differentielle ACE2-Herabregulierung durch die Spike-Proteine von SARS-Coronavirus und Coronavirus NL63**

Pöhlmann, S. (Medizinische Hochschule Hannover); Kuri, T.; Weber, F. (Universität Freiburg); Eichler, J. (Universität Erlangen-Nürnberg); Drosten, C. (Universität Bonn); Glowacka, I. (Medizinische Hochschule Hannover),

Einleitung: Das hochpathogene severe acute respiratory syndrome Coronavirus (SARS-CoV) und das gering pathogene Coronavirus NL63 verwenden beide die Carboxypeptidase angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) als Rezeptor für den Eintritt in Zielzellen. Die Expression von ACE2 schützt vor Lungenversagen und wird durch das Spike (S)-Protein von SARS-CoV negativ reguliert. Es wurde postuliert, dass die Interferenz von SARS-S mit der ACE2-Expression eine wichtige Rolle in der SARS-Pathogenese spielen könnte. Das Ziel unserer Untersuchungen war es, den molekularen Mechanismus der ACE2-Herabregulation durch SARS-S aufzuklären, und mögliche Unterschiede zu NL63-S herauszuarbeiten. Methodik: Die ACE2-Bindung von rekombinant hergestelltem SARS-S bzw. NL63-S wurde mit Hilfe von FACS-, ELISA- und BiaCore-Experimenten analysiert. Für die Bestimmung des SARS-S- und NL63-S-vermittelten Eintritts in Zielzellen wurden pseudotypisierte, lentivirale Vektoren eingesetzt. Die Ausbreitung von SARS-CoV und NL63 in infizierten Vero-Zellen wurde mit Hilfe von quantitativer RT-PCR bestimmt. Ergebnisse: Wir konnten zeigen, dass SARS-S mit höherer Affinität an ACE2 bindet als NL63-S. Die Behandlung von Zellen mit löslichem und virus-assoziiertem SARS-S induzierte die Abgabe von ACE2 in den Zellkulturüberstand. Dieser Effekt wurde auch nach Inkubation mit NL63-S beobachtet, die Freisetzung von ACE2 in das Zellkulturmedium war jedoch deutlich weniger effizient. Weiterhin zeigten unsere Analysen eine markante Reduktion der ACE2-Expression in SARS-CoV- jedoch nicht in NL63-infizierten Vero Zellen, und wir gehen davon aus, dass dieser Effekt ebenfalls auf ACE2-Abgabe in den Zellkulturüberstand zurückzuführen ist. Die Inhibition der zellulären Protease ADAM17/TACE, für die eine Rolle bei der ACE2-Proteolyse beschrieben worden war, führte zu einer vollständigen Blockierung der ACE2-Freisetzung, und nach Behandlung von Zellen mit ADAM17/TACE wurden keine Hinweise auf eine S-Protein-induzierte ACE2-Herabregulation erhalten. Inhibitionsstudien demonstrierten schließlich, dass die ACE2-Proteolyse für die virale Vermehrung nicht notwendig ist. Diskussion: Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die in der Literatur dokumentierte ACE2-Herabregulation durch SARS-S vollständig auf die S-Protein-induzierte Spaltung von ACE2

durch ADAM17/TACE zurückzuführen ist. Dieser Prozess ist für die virale Ausbreitung in Zellkultur verzichtbar, könnte jedoch die SARS-CoV-Vermehrung und Pathogenese in infizierten Personen beeinflussen: Die S-Protein induzierte Proteolyse von ACE2 könnte die Superinfektion von Zielzellen verhindern und das lösliche ACE2 die Infektiosität von Viren reduzieren. Außerdem könnte die ACE2-Proteolyse die Lungenpathogenese fördern, da das abgespaltene ACE2 zwar enzymatisch aktiv ist, jedoch vermutlich eine hohe lokale ACE2-Konzentration notwendig ist, um Schutz gegen Lungenschädigung zu vermitteln.

## **On the way to a cure: Identification of Cyclosporin A as inhibitor of SARS-CoV replication by analysis of virus-host protein-protein interactions via an undirected systems biology approach**

Schöpf, J. (Max-von-Pettenkofer-Institut, Lehrstuhl Virologie); Muth, D. (3); Ebel, F. (Max-von-Pettenkofer Institut, Lehrstuhl Bakteriologie, LMU München); von Dall'armi, E. (1), Endesfelder, M. (1); Glowaka, I. (Medizinische Hochschule Hannover); Bertram, S. (Medizinische Hochschule Hannover); Pöhlmann, S. (Medizinische Hochschule Hannover); Herrler, G. (Tierärztliche Hochschule Hannover); Thiel; V. (Kantospital, St. Gallen); Thiel, H. J. (Justus-Liebig-Universität Gießen); Weber, F. (4); Drosten, C. (3); Haas, J. (1,10); von Brunn, A. (1), (5) Max-von-Pettenkofer Institut, Lehrstuhl Bakteriologie, LMU München, (6) Medizinische Hochschule Hannover, (7) Tierärztliche Hochschule Hannover, (8) Kantospital, St. Gallen, (9) Justus-Liebig-Universität Gießen, (10) Division of Pathway Medicine, University of Edinburgh, UK

Einleitung: Coronaviren sind bedeutende Human- und Tierpathogene mit dem zootischen SARS-CoVirus als dem aggressivsten Vertreter im Menschen. Um die Pathogenese zu verstehen ist es notwendig, die viralen und zellulären Netzwerke von Schlüssel-molekülen und Signalwegen aufzudecken. Hierzu benutzen wir Kompletengenom- Ansätze mittels Hochdurchsatz Technologien, um über die Kenntnis der Interaktionen von viralen und Wirtsproteinen Zielstrukturen für die antivirale Intervention zu identifizieren.

Methodik: Das SARS-CoV Genom enthält 14 funktionelle offene Leseraster (ORFs), welche für die Expression von bis zu 29 nicht- strukturellen, strukturellen und akzessorischen Proteinen verantwortlich sind. Wir haben ein virales Orfeom hergestellt, indem wir alle ORFs und eine Reihe von Subfragmenten ohne Transmembranregionen in GATEWAY- kompatible Plasmide klonierten, welche die rasche Überführung in pro- und eukaryotische Expressionsvektoren erlaubt. Interaktionstests wurden mittels automatisierter Hefe-Zwei-Hybrid (H2H) Systeme, PCR Amplifikation, Sequenzierung und Blast Analysen identifiziert. Eine Reihe von Wechselwirkungen wurden in einem zweiten eukaryotischen Interaktionstestsystem, basierend auf der kreuzweisen Fusion viraler und zellulärer Partner an Protein A und Luciferase (modifiziertes Lumiersystem) validiert.

Ergebnisse: Im H2H System wurden bisher 132 hochkonfidente, 383 einmal auftretende, 245 klebrige „ und 282 Interaktanden aus den 3'- nicht translatierten Bereich der zellulären cDNAs gefunden. Über 80 Interaktionen der ersten beiden Y2H Kategorien wurden mit einem modifizierten Lumier Interaktionstestsystem (s.u.) untersucht. Bei einem

Z-Faktor größer oder gleich 1 wurden 46% und 33% positiver Interaktanden in den Kategorien "hochkonfident" und "niedrig konfident" gefunden. Es wurden verschiedene zelluläre Stoffwechselwege identifiziert, in welche SARS-CoV Proteine eingreifen. Für das virale nsp1 konnten wir zum erstenmal zeigen, daß es unter anderen mit drei Klassen von Proteinen wechselwirkt, welche den Calcineurin/NFAT (Nuclear Factor of Activated T- cells) Stoffwechselweg beeinflussen. Dieser ist unter anderem für die Regulation von Cytokinen von großer Bedeutung und könnte vor dem Hintergrund der Entwicklung von Cytokinstürmen in SARS-CoV- infizierten Patienten wichtige pathogenetische Hinweise liefern. Bei den Interaktoren handelt es sich um zwei Vertreter der Immunophilinen oder FK506 bindenden Proteine (FKBP1A/B), drei Cyclophilinen (PPIA, PPIG, PPIH) und zwei Calcipressinen (RCAN1 und RCAN3). In einem NFAT-Reporter Überexpressionstest ("Firefly" Luciferase mit NFAT Promotorsequenzen) wurde der NFAT Transkriptionsfaktor durch nsp1 Transfektion in 293 und Jurkat Zellen hochreguliert. Dieser Effekt wurde durch Cotransfektion von RCAN3 oder dem Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) aufgehoben. In einem ähnlichen Testansatz wurde die Regulation von Interleukin Promotoren (IL-2, IL-4, IL-5, IL-8) durch nsp1 beeinflusst. In *in vitro* Inhibitionstests konnte die Virusreplikation in Vero Zellen durch die Zugabe von CsA beinahe vollständig unterdrückt werden. Diskussion: Im Rahmen unserer zunächst ungerichteten Virus- Wirt Protein- Protein Interaktionsanalysen konnten wir eine Reihe von viralen und zellulären Wechselwirkungen identifizieren, welche wichtige Zielstrukturen für antivirale Therapien darstellen. Die Identifizierung des zellulären Chaperons PPIA als Interaktionspartner von viralen Proteinen hat sich als außerordentlich bedeutend erwiesen: Die Bindung des Cyclosporin A an PPIA ist wohl etabliert und wird seit langem zur Immunsuppression von Transplantationspatienten eingesetzt. Für SARS-CoV könnte sich das PPIA - ähnlich wie bei HCV und HIV - als Schlüsselmolekül für antivirale Strategien erweisen. Die molekularen Mechanismen der Wechselwirkung mit viralen Proteinen müssen aufgeklärt werden.

**Workshop Diagnostik und Epidemiologie II**

## **New DNA microarray tests for rapid genotyping of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydia trachomatis***

Sachse, K.; Feige, J. (Friedrich-Loeffler-Institut); Slickers, P.; Ehricht, R. (Clondia Chip Technologies, Jena)

Introduction: Rapid typing of microbial pathogens remains an important issue in diagnostic laboratories of both human and veterinary medicine, particularly when slow-growing microorganisms are involved, such as *Chlamydophila* (Cp.) *psittaci*, the agent of avian and human psittacosis, and *Chlamydia* (C.) *trachomatis*, which is causing trachoma and sexually transmitted diseases. While demands on quality, quantity and rapidity of microbiological diagnosis are steadily increasing, the inherent limitations of currently used PCR assays are becoming evident as they normally provide information only on the presence or absence of a particular agent. As soon as one has to deal with subtle differences between species or strains, such as SNPs, PCR is no longer the method of choice. In this situation, DNA microarray technology appears as a promising alternative, the most useful advantage of which is the strictly nucleotide sequence-based identification of the microorganism, which allows a significant increase in specificity of detection.

Methods: Comprehensive in silico analysis of *ompA* sequences of Cp. *psittaci* was conducted on all available 210 GenBank entries, from which a total of 63 unique sequences were combined in an alignment. To distinguish among the existing serotypes/genotypes, 35 oligonucleotide probes recognising targets from variable domains (VDs) 2 and 4 were derived (size 22 - 30 nt, T<sub>m</sub> 59.7 - 61.2°C). Each genotype probe was spotted four-fold, the controls 15-fold, thus bringing the total number of spots on the array to 155. In the case of C. *trachomatis*, a total of 408 GenBank entries including 92 unique sequences were found and 61 oligonucleotide probes (20-31 nt, T<sub>m</sub> 59-61°C) were selected from VD1, 2 and 4. Each probe was spotted three-fold, the controls 15-fold (in total 198 spots). For testing, DNA is extracted from specimens using standard procedures. Subsequently, the DNA template is amplified and biotinylated by multiplex PCR using VD-specific primer pairs. The hybridisation reaction is conducted in ArrayTube vessels. The protocol includes the following major steps: conditioning, hybridisation at 50°C for 60 min, three wash steps at increasing stringency, blocking and staining of binding sites using streptavidin-conjugated peroxidase. Finally, hybridisation signals are measured and processed. A specially designed pattern recognition software can be used, which facilitates the assignment of the obtained hybridisation pattern to the respective genotype.

Results and Discussion: The study of *ompA* gene sequences has revealed a remarkable genetic diversity within the species *Cp. psittaci*. We suggest adjustments and extensions to the currently used genotyping scheme, which include the introduction of subgroups to the more heterogeneous genotypes A, E/B and D, as well as six new genotypes representing so far untypable strains. The newly developed microarray-based genotyping assay has been shown to discriminate among all established genotypes and to identify so far untyped strains. Its high specificity even allows detection of SNPs.

Similarly, the *C. trachomatis* microarray has been shown to be capable of recognising each of the currently accepted 17 serovars/genotypes based on specific hybridisation patterns. Ongoing work is focusing on further optimisation and testing of clinical samples to render the assays suitable for routine diagnosis.

## **Nicht nur die Wiederkäuer - Die Reservoirs für *Coxiella burnetii* (Q-Fieber)**

Henning, K.; Hilbert, A. (Friedrich-Loeffler-Institut Wusterhausen)

Die wichtigste Quelle für Infektionen mit *Coxiella burnetii* stellen zweifelsohne die Wiederkäuer dar. Daher stehen diese bei Q-Fieber-Ausbrüchen zu Recht im Focus der Untersuchungen. Neben den Wiederkäuern werden in der Literatur aber auch andere Tierarten genannt, z.B. Pferd, Esel, Hund, Katze und Geflügel, die für Coxiellen-Infektionen empfänglich sind und somit Reservoirs für Erkrankungen beim Menschen darstellen können. Hierbei betrifft die Funktion als Reservoir insbesondere Tiere, mit denen der Mensch recht engen Kontakt hat, wie bei Kuscheltieren (Hund, Katze), aber auch in der Landwirtschaft (Schweine, Geflügel). Zu dieser Problematik laufen aber zurzeit kaum Untersuchungen.

Es wird eine Übersicht über die in der Literatur genannten Spezies gegeben und es werden erste eigene Ergebnisse vorgestellt.

### **Molekulare Epidemiologie von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* - Charakterisierung eines Erregers mit geringer genetischer Heterogenität**

Fritsch, I.; Köhler, H.; Möbius, P. (Friedrich-Loeffler-Institut: Institut für Molekulare Pathogenese, Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose)

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Studie wurden im Rahmen des Zoonoseverbundes ZooMAP erarbeitet. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose, einer in Deutschland endemisch verbreiteten chronischen Darmentzündung des Rindes. Eine Beteiligung des Erregers an der Morbus Crohn Erkrankung des Menschen wird kontrovers diskutiert. MAP besitzt, verglichen mit anderen Bakterien, eine geringe genetische Heterogenität. Um Stämme unterscheiden und mögliche Übertragungswege untersuchen zu können, müssen bei diesem Erreger deshalb die Ergebnisse verschiedener Typisierungsmethoden kombiniert werden. Für andere Bakterien etablierte Methoden wie z. B. das Multilocus sequence typing „ (MLST) besitzen für MAP keine ausreichende Diskriminierungskraft. Das Ziel unseres Teilprojektes besteht in der Differenzierung von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* - Isolatn aus Deutschland und der Etablierung eines neuen standardisierten Typierungsprotokolls mit einer ausreichend hohen Diskriminierungskraft. Über 200 MAP-Rinder-Isolate verschiedener regionaler Herkunft wurden angezüchtet. Die Typisierung erfolgte mit Hilfe der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse, basierend auf dem IS900 (IS900 RFLP) und dem Einsatz von zwei Verdauungsenzymen (BstEII, PstI), der „*Mycobacterium interspersed repetitive unit -Variable number tandem repeat* „ - Analyse (MIRU-VNTR) basierend auf 8 Markern (MIRU 2, 3, 292; VNTR 25, 47, 3, 7, 32) und der „*Multilocus short sequence repeat* „ Analyse (MLSSR) an den Genomloci 1, 2, 8 und 9. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der BioNumerics-Software (Applied Maths, Belgien) ausgewertet. Bisher liegen Ergebnisse für 150 Feldisolate aus 47 epidemiologisch unabhängigen Rinderherden vor, wobei Isolate aus ein bis 36 Rindern je Herde untersucht wurden. Mit jeder Methode konnten Genotypen charakterisiert werden, die besonders häufig auftreten. Die Ergebnisse der verschiedenen Typisierungsmethoden korrelierten nicht miteinander und die Diskriminierungskraft war verschieden. Durch Kombination der Einzelergebnisse konnte die Diskriminierungskraft der Genotypisierung stark erhöht werden. Die Heterogenität der MAP-Isolate aus Deutschland war größer als erwartet. Innerhalb der Herden gab es Unterschiede; in manchen Herden konnte vorwiegend ein MAP-Stamm, in anderen Herden eine Vielzahl von

Genotypen detektiert werden. Die VNTR-Loci 3 und 32 besaßen eine Alleldiversität von nahezu Null. Bei der MLSSR-Typisierung wurde am Locus 1 ebenfalls eine sehr geringe Diversität festgestellt. Am Locus 2 trat bei Isolaten aus ein und derselben Herde mit identischen RFLP- und MIRU-VNTR-Profilen eine unterschiedliche Anzahl von repeats auf, möglicherweise hervorgerufen durch Homoplasie. Deshalb wird derzeit die Stabilität einzelner Marker untersucht. Je nach verwendeter Typisierungsmethode ergaben sich verschiedene epidemiologische Interpretationsmöglichkeiten. Ergebnisse einzelner Methoden können die einer kombinierten Typisierung nicht ersetzen. Die Schlussfolgerungen innerhalb publizierter Studien, in denen nur eine Typisierungsmethode verwendet wurde, gilt es zu überdenken. Durch eine Kombination von Fingerprint-, PCR- und Sequenz-basierten Methoden können MAP-Stämme differenziert und Übertragungswege zwischen Herden, einzelnen Tieren sowie Tier und Mensch detektiert werden. Die Signifikanz einzelner Methodenkombinationen bzw. individueller Typisierungsmarker bezüglich epidemiologischer Interpretationen kann bisher noch nicht abschließend beurteilt werden. Hierfür müssen die noch in Kultur befindlichen MAP-Isolate in die Auswertungen einbezogen werden.

### **Erster Nachweis atypischer *Toxoplasma gondii*-Genotypen in Deutschland**

Schaes, G.; Daland, H.; Wilking, H.; Fröhlich, A.; Conraths, F. (Friedrich-Loeffler-Institut) Pantchev, N.; Globokar Vrhovec, M.; (VetMed Labor GmbH); Barutzki, D.; (Tierärztliches Labor Freiburg); Lüder, C. (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen)

Einleitung: Die Populationsstruktur von *Toxoplasma gondii* ist klonal. In Europa und Nordamerika ist die Mehrzahl der Isolate den klonalen Typen I, II und III zuzuordnen. Typ-I-Stämme sind hochvirulent und bereits die Infektion mit einem einzigen Organismus kann zum Tod einer Maus führen. Nur Infektions-Dosen von mehr als 10.000 Organismen führen im Fall der klonalen Typen II oder III zum Tod von Mäusen. Feliden sind Endwirte von *T. gondii* - im Darm dieser Tierarten findet die sexuelle Entwicklung von *T. gondii* statt, die mit der Ausscheidung von Oozysten endet; Oozysten sind Stadien, die mehrere Monate, eventuell sogar Jahre in der Umwelt überleben können. Oral aufgenommene Oozysten sind wichtige Infektionsquellen für Menschen und Tiere. Die experimentelle Kreuzung von Vertretern der klonalen Typen II und III durch gleichzeitige Infektion einer Katze mit zwei klonalen Typen führte in der F1 Generation zu rekombinanten *T. gondii*, die eine höhere Maus-Virulenz aufwiesen als die Stämme, aus denen sie hervorgegangen sind. Rekombinante und atypische *T. gondii* werden als wichtige Ursache für okuläre und andere schwerwiegende sowie generalisierte Toxoplasmosen angesehen.

Methodik: Katzenkotproben, in denen von privaten Untersuchungseinrichtungen Oozysten mit Durchmessern von 9-15 µm nachgewiesen worden waren, wurden einem kombinierten Sedimentations-Flotationsverfahren unterzogen. Isolierte Oozysten wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf *T. gondii*-DNS untersucht. Acht der auf verschiedenen Chromosomen und eine der im Genom des Apicoplasten lokalisierten Markerregionen (newSAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico) wurden aus *T. gondii*-positiven Proben mittels PCR amplifiziert und durch Restriktionsenzyme charakterisiert.

Ergebnisse: Zwischen Juni 2007 und Dezember 2008 wurden 18.259 Katzenkotproben aus Deutschland untersucht und in 46 (0,25%) dieser Proben *T. gondii*-Oozysten nachgewiesen. Die 46 *T. gondii*-positiven Proben wurden genetisch mittels PCR-RFLP analysiert. Bei 22 weiteren, bereits in einer früheren Studie (Oktober 2004 - November 2006) teilcharakterisierten Proben wurde die Typisierung vervollständigt. Die Mehrzahl der 68 Isolate (n=54) zeigten Typ-II-Allele für alle

chromosomalen Marker und ein Typ-I-Allel für die im Genom des Apicoplasten lokalisierte Markerregion (Apico). Drei Isolate zeigten Typ-II- und ein Isolat Typ-III-Allele für alle Markerregionen. Bei drei Isolaten zeigten sich gemischte oder atypische Allel-Kombinationen. Eines dieser Isolate mit gemischten Typ-II/III-Allelen in mehreren Regionen konnte in der Zellkultur angezüchtet und kloniert werden. Für Mäuse war die Virulenz von Klonen dieses Isolats höher als die anderer Isolate mit ausschließlich Typ-II-Allelen.

Diskussion: Dies ist weltweit der erste Nachweis atypischer und rekombinanter *T. gondii* im Kot einer natürlich infizierten Katze. Da aus dem Kot einer einzigen Katze genotypisch unterschiedliche Varianten einer Rekombination aus den klonalen Typen II und III gewonnen werden konnten, ist sehr wahrscheinlich, dass die Rekombination im Darm der untersuchten Katze erfolgte. Katzen können im Kot mehrere Millionen Oozysten ausscheiden. Diese bleiben mehrere Monate eventuell sogar Jahre infektiös und der Kot einer einzelnen Katze kann zur Infektion zahlreicher Menschen und Tiere führen. Der Fund rekombinanter *T. gondii* in Deutschland macht es erforderlich, festzustellen, in welchem Ausmaß solche rekombinanten *T. gondii* an Toxoplasmen bei Menschen und Tieren in Deutschland beteiligt sind und wo die Hauptquellen solcher Stämme zu suchen sind.

Diese Studie wurde im Rahmen des Zoonoseverbundprojekts Toxonet 01 durchgeführt und wird vom BMBF gefördert (01 KI 0765).

### **Die zoonotische Komponente des MRSA-Komplexes: MRSA bei beruflich mit dem Schwein exponierten Personen**

Meemken, D.; (Außenstelle für Epidemiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover); Jansen, A.; Kleinkauf, N.; Jansen, T. (Robert Koch-Institut Berlin); Blaha, T. (Außenstelle für Epidemiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover)

Einleitung: Seit 2006 häufen sich Publikationen über das Vorkommen von MRSA als symptomlose Besiedler der Nasenschleimhaut von Nutztieren, wobei die meisten Berichte über die Besiedlung von Schweinen vorliegen. Dabei wurde auch über Infektionen sowie über die symptomlose Besiedlung bei in der Landwirtschaft tätigen Menschen berichtet. Damit hat das über lange Zeit ausschließlich humanmedizinische Problem des MRSA-Komplexes eine eindeutige zoonotische Komponente erhalten. Mittlerweile wird der v.a. bei landwirtschaftlichen Nutztieren vorkommende MLST-Typ ST398 als livestock-associated MRSA (laMRSA) bezeichnet. Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist die Abschätzung des Risikos, ob Menschen mit beruflichem Kontakt zum Schwein häufiger mit MRSA besiedelt sind, und aufgrund dieses Trägertums als Carrier von laMRSA-Stämmen in Krankenhäuser fungieren könnten und/oder selbst gefährdet sind, an schwer behandelbare Infektionen zu erkranken.

Methodik: Es wurden Nasenabstriche von folgenden klinisch gesunden Personengruppen mit unterschiedlichem Expositionsgrad zur Tierart Schwein auf das Vorkommen von MRSA kulturell untersucht. a), Praktische Tierärzte, die ausschließlich Schweinebestände betreuen, b), Personal einer mit dem Schwein befassten Forschungseinrichtung, c), Personal der amtlichen Fleischuntersuchung an Schweineschlachthöfen, d), Praktische Tierärzte in Gemischtpraxen (Schwein und Rind), und e), Praktische Tierärzte, die ausschließlich Kleintiere betreuen.

Ergebnisse: Die Ergebnisse der kulturellen Untersuchung der Nasenabstriche von den unterschiedlich zum Schwein exponierten Personengruppen sind in Tabelle 1 dargestellt. Tab. 1: Häufigkeit der nasalen MRSA-Besiedlung bei unterschiedlichen Berufsgruppen  
Berufsgruppe: Expositionsgrad, Anzahl der Personen MRSA positiv (n)  
Tierärzte: ausschließlich in der Schweinebestandsbetreuung, 28, 26 % (10)  
Personal in einer Diagnostikeinrichtung für Schweine, 8, 38 % (3 Amtliche Fachassistenten an Schweineschlachthöfen, 50, 14 % (7 Tierärzte in gemischten Großtierpraxen (Schwein + Rind), 26 23 % (6) Tierärzte: ausschließlich in Kleintierpraxen, 173, 4 % (7).

Diskussion: In den untersuchten Berufsgruppen (Tierärzte mit unterschiedlicher Spezialisierung, amtliche Fachassistenten an Schweineschlachthöfen und Personal in einer tierärztlichen Diagnostikeinrichtung) war der Anteil der Personen mit einer nasalen MRSA-Besiedlung um ein Vielfaches höher als die vom RKI angenommene Besiedelungsrate in der Normalbevölkerung (Schätzungen liegen bei 1-2 %). Innerhalb der untersuchten Berufsgruppen ist die Wahrscheinlichkeit, nasal mit MRSA besiedelt zu sein, bei Menschen mit beruflichem Kontakt zum Schwein, im Gegensatz zu Menschen mit beruflichem Kontakt zu Kleintieren, deutlich erhöht. Obwohl die Untersuchungszahlen für endgültige Schlussfolgerungen zu klein sind, deutet sich ab, dass innerhalb der Personen mit beruflichem Kontakt zu Schweinen wiederum eine Abstufung der Wahrscheinlichkeit der MRSA-Besiedelung vorliegt, wobei der ganztägige aktiv-tätige Kontakt (z.B. die klinische Untersuchung in mehreren Schweinebeständen pro Tag) zu lebenden Schweinen im Gegensatz zu Schlachtkörpern und diagnostischem Material vom Schwein offensichtlich die stärkste Exposition darstellt. Es ist also zu empfehlen, neben der erst vor Kurzem vom RKI neu definierten MRSA-Risikopatientengruppe der Landwirte mit Schweinehaltung „, generell solche Personengruppen aufzunehmen, bei denen eine berufliche Exposition zum Nutztier vorhanden ist.

### **"Netzwerk Nagetier-übertragene Pathogene" in Deutschland: Plattform für eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zu Nagetieren und Zoonoseerregern**

Ulrich, R.; (Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger) Jacob, J.; (Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Wirbeltierforschung, Münster); Heckel, G. , (Computational and Molecular Population Genetics (CMPG), Institut für Ökologie und Evolution, Universität Bern); Essbauer, S. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München)

Mit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes und der damit verbundenen Meldepflicht für ausgewählte humane Infektionskrankheiten ist die Kenntnis der Häufigkeit und geografischen Verbreitung von Infektionen mit Nagetier-assoziierten Zoonoseerregern deutlich verbessert worden. Im Gegensatz dazu ist der aktuelle Wissensstand über eine Variation der geografischen Verbreitung und Häufigkeit von Infektionen in Nagetier- und anderen Kleinsäuger-Reservoirs und der zugrunde liegenden molekularen und Populations-basierten Mechanismen sehr begrenzt. Aus diesem Grund wurde in Deutschland das Netzwerk Nagetier-übertragene Pathogene etabliert, das eine intensive interdisziplinäre Zusammenarbeit von Zoologen, Ökologen, Virologen, Mikrobiologen, Parasitologen, Genetikern, Epidemiologen, Forstwissenschaftlern und Klimaforschern mit Klinikern der Human- und Veterinärmedizin ermöglicht. Die Aktivitäten der Partner des Netzwerkes umfassen gegenwärtig vier Schwerpunkte: (i) Untersuchungen zu unterschiedlichen Aspekten der Nagetierbiologie und deren Zusammenhang mit der Verbreitung von Zoonoseerregern betreffen gegenwärtig vor allem Fragen zur Ökologie, Paläozoologie und Nagetierphylogenie, Populationsdynamik und Bekämpfung (Resistenzentwicklung). Zukünftig sollen diese Studien ergänzt werden durch Untersuchungen zur Immun- und Populationsgenetik und Verhaltensbiologie der Nagetiere. (ii) Molekular- und seroepidemiologische Studien zu Nagetier-assoziierten Zoonoseerregern beinhalten vor allem Untersuchungen zu den möglichen Ursachen des gehäuften Auftretens humaner Infektionen und Monitoringstudien in ausgewählten geografischen Regionen. Diese Arbeiten dienen letztendlich auch der Identifizierung und molekularen Charakterisierung der verschiedenen Erreger (Viren, Bakterien und Parasiten). Es werden hierbei Erreger einbezogen, die einen ähnlichen Übertragungsweg über Aerosole wie Hantaviren, Arenaviren und Leptospiren haben. Zudem werden solche mit Übertragungswegen, bei denen Haus- und Nutztiere eine Rolle spielen

(Kuhpockenviren) aber auch Arthropoden-übertragene Erreger (Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus, Rickettsien und Borrelien) analysiert. Daneben werden Erreger betrachtet, die über Lebensmittel oder einen bisher nicht genauer bekannten Übertragungsweg, bei dem Nagetiere aber möglicherweise als Reservoir dienen, verbreitet werden (Hepatitis E-Virus und verschiedene bakterielle Durchfallerreger). Darüber hinaus dient das Netzwerk der Suche nach neuen Erregern, die als Modellobjekte für verwandte human- und tiermedizinisch relevante Erreger dienen könnten. Bisher wurden in Zusammenarbeit mit einer Vielzahl von Kooperationspartnern ca. 7.500 Nagetiere und andere Kleinsäuger in 14 Bundesländern gesammelt. Ein Standardprotokoll für die zentralisierte Sektion der Tiere und die nachfolgende Dokumentation von biometrischen Daten und Ergebnissen der serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen ermöglicht dabei eine umfassende Beurteilung der Durchseuchung von Reserviertieren mit den verschiedenen Zoonoseerregern. Neben den eigenen Untersuchungen zu Hantaviren wurden Gewebeproben von Nagetieren und anderen Kleinsäugetern an die Forschungsverbände FBI-Zoo, Q-Fieber, Toxonet und Arboviren weitergegeben. (iii) Einen dritten Schwerpunkt bilden Prävalenzstudien in Risikogruppen. So wird beispielsweise gegenwärtig eine Waldarbeiterstudie im Land Brandenburg durchgeführt, an der 10 wissenschaftliche Einrichtungen beteiligt sind und die Seroprävalenz für 15 verschiedene Erreger ermittelt wird. Zu diesem Zweck wurden im Jahr 2008 von insgesamt 563 Beschäftigten aller 10 Forstämter des Landes Brandenburg Serumproben gewonnen. (iv) Einen weiteren Schwerpunkt der Netzwerkaktivitäten stellt die Öffentlichkeitsarbeit dar. Diese beinhaltet unter anderem Veröffentlichungen zur Aufklärung von Berufsgruppen, wie Waldarbeiter, Jäger und Schädlingsbekämpfer, die durch bestimmte Zoonoseerreger, wie Hantaviren, besonders gefährdet sind. Kürzlich wurde auch in einer gemeinsamen Aktivität von Robert Koch-Institut, Julius Kühn-Institut, dem Konsiliarlaboratorium für Hantaviren und dem Friedrich-Loeffler-Institut das Merkblatt „Wie vermeide ich Hantavirusinfektionen“ aktualisiert und dort auch Ansprechpartner für Fragen zu Hantavirusinfektionen bei Mensch und Nagetier sowie zur Nagetierbekämpfung benannt (siehe Homepage des FLI: <http://www.fli.bund.de/1235.html>).

### **Nagetier-übertragene Zoonosen entlang eines Klimagradienten im Nationalpark Bayerischer Wald**

Essbauer, S.; Schex, S., (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München),  
Müller, J.; Bässler, C.; (Nationalparkverwaltung Bayrischer Wald, Grafenau) Dobler,  
G. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München)

Nagetiere spielen eine wichtige Rolle als Reservoirtiere und Überträger einer Vielzahl von zoonotischen Erregern. Ihre epidemiologische Bedeutung als Erregerreservoir ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung, während die Kenntnis über den Einfluss von Faktoren wie Klima, Mikroklima oder Wetterphänomene auf die Populationsdynamik dieser Tiere und ihren assoziierten Pathogenen (in Deutschland) bislang äußerst begrenzt ist. Ein Hantavirus-Ausbruch in Niederbayern (2004) , verursacht durch einen neuen Puumalavirus Genotyp, führte zur Durchführung einer Langzeitstudie mit dem Ziel, das Vorkommen und die Prävalenz des Erregers in Wildmäusen in dieser Region zu untersuchen. Seit 2008 wird diese Studie durch ein dreijähriges Projekt ergänzt, das das Vorkommen und die Prävalenz von Hantaviren sowie anderen Zoonoseerregern in Wildmäusen entlang eines Temperatur-Klima-Höhengradienten untersucht. Für den Mäusefang wurden, in Zusammenarbeit mit dem Nationalpark Bayerischer Wald, 22 Standorte aus etwa 330 Probeflächen ausgewählt, die einen Höhengradienten von etwa 300 bis 1450 m über N.N. abdecken. Bislang wurden dort etwa 130 Wildmäuse mittels Lebendfallen eingefangen und exemplarisch auf Hantaviren und Rickettsien untersucht. Die Ergebnisse werden mit vom Nationalpark erfassten Parametern wie Temperatur, Wasserversorgung, Bodennährstoffen, Einstrahlung, Erhebung von Gefäßpflanzen, Moose, Flechten und Holzpilzen und Tieren (Nagetiere, Vögel, Insekten, Spinnen, Schnecken) korreliert und statistisch ausgewertet. Ziel der Studie ist es somit, die mittels molekular-biologischer und sero-epidemiologischer Methoden ermittelten Prävalenzen und das Spektrum (Spezies, genetische Varianten) von Nagetier-assoziierten Erregern entlang des beschriebenen Transekten-Klimagradienten im Nationalpark Bayerischer Wald zu bestimmen. Diese Daten werden zusammen mit den umfangreich vorhandenen Klima-Biotop-Parametern ermöglichen, eine Risikoanalyse für das Vorkommen der Erreger zu ermitteln, um somit in Zukunft beispielsweise für Hantavirus-Ausbrüche prospektiver agieren zu können. Das hier vorgestellte Projekt wird im VICCI-Verbund (Vector-borne infectious diseases in climate change investigation) durch das bayerische Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit gefördert.

## **Numerical response of ticks in relation to small rodent densities , F, Numerical response of ticks in relation to small rodent densities**

Kiffner, Ch; Vor, T. (Wildlife Biology and Game Management Team, Dept. of Forest Zoology, BÜSNGEN-Institute, Georg-August-University Göttingen); Hufert, F. T. (Institute of Virology, Medical School, Georg-August-University Göttingen); Dobler, G. (Institute of Microbiology, German Federal Armed Forces, Munich); RÜHE, F. (Wildlife Biology and Game Management Team, Dept. of Forest Zoology, BÜSNGEN-Institute, Georg-August-University Göttingen)

The risk of humans to be bitten by a tick is mainly a function of nymphal density and activity. We hypothesized that high rodent densities in year  $t$  translate in high nymph densities in the following year  $t+1$ , because rodents are crucial hosts for the early life stages of the vector ticks. To test this hypothesized numerical response of ticks, we established 18 permanent plots in forests of southern Hesse, Germany. We monitored population fluctuations of 4 rodent species (*Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus*, *Myodes glareolus*, and *Microtus agrestis*) in September 2007 and in May, July, and September 2008 using a standardised capture protocol. We also estimated densities of all tick (*Ixodes* spp.) life stages in March, May, July, and September 2008 by dragging a 1-m<sup>2</sup> blanket along 4 transects, each 50 m in length. Ticks on the blanket were counted and removed after completing each transect. All 4 rodent species showed considerable seasonal and annual fluctuations in density (as measured by captures per 100 corrected trap nights). Adult tick densities were highest in May 2008, and larval and nymphal densities were highest in July 2008. We found a moderately strong relationship (Kendall's  $\tau=0.404$ ,  $P=0.023$ ,  $n=18$ ) between the density index of all rodent species combined in September 2007 and *Ixodes* nymph density in July 2008. On a species level, only the density of *A. flavicollis* was significantly associated with the next year's nymphal density (Kendall's  $\tau=0.393$ ,  $P=0.036$ ,  $n=18$ ). Associations between other small rodent species and the next year's nymphal or adult tick densities were insignificant but combined rodent density of the previous year was correlated with the next year's larvae density (Kendall's  $\tau=0.353$ ,  $P=0.046$ ,  $n=18$ ). These results suggest that the hypothesis is supported in regard to *A. flavicollis*. Yet, for developing a predictive model, more time series and additional data (especially weather) are required.

Ferdinand, RÜHE, Wildlife Biology and Game Management Team, Dept. of Forest Zoology, BÜSNGEN-Institute, Georg-August-University Göttingen, Christian, Kiffner, Wildlife Biology and Game Management Team, Dept. of

## Workshop Diagnostik und Epidemiologie II

---

Forest Zoology, Büsgen-Institute, Georg-August-University Göttingen, Torsten, Vor, Wildlife Biology and Game Management Team, Dept. of Forest Zoology, Büsgen-Institute, Georg-August-University Göttingen, Frank T., Hufert, Institute of Virology, Medical School, Georg-August-University Göttingen, Gerhard, Dobler, Institute of Microbiology, German Federal Armed Forces, Munich, Ferdinand, Rühle, Wildlife Biology and Game Management Team, Dept. of Forest Zoology, Büsgen-Institute, Georg-August-University Göttingen

### **Rickettsioses: emerging zoonoses in Germany**

Dobler, G.; Speck, S.; Wölfel, R.; Essbauer, S. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr)

Rickettsiae are a group of gram negative, obligate intracellular bacteria. They are transmitted by arthropods, particularly by lice, fleas, mites, and ticks. Several of the rickettsial diseases are classified as emerging „infectious diseases. In Germany only limited information on the occurrence of rickettsiae in ticks are available. We tested several thousands of ticks (particularly *Ixodes ricinus*) sampled in different parts of Southern Germany by polymerase chain reaction (PCR) for rickettsiae. Furthermore we diagnose rickettsioses imported to Germany from travellers all over the world by serology, PCR and cultivation. The most prevalent rickettsial species in Germany was found to be *Rickettsia helvetica*. About 5 to 8% of all *Ixodes ricinus* tested were infected with this species. Furthermore we found *Rickettsia monacensis* (0.7%) in some of the examined areas. Single detections of *Rickettsia felis* and *Rickettsia massiliae* show that also these two species are endemic in German ticks of particular areas. All four tick species detected are known to be pathogenic for humans in other regions of Europe. Other scientific groups detected two more species in ticks of the species *Dermacentor reticulatus*. These are *Rickettsia RpA4* and *Rickettsia raoultii*. These two species so far have not been incriminated as humans pathogens. One further *Rickettsia* species, *Rickettsia slovaca*, which is the etiologic agent of TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy) was found already many years ago in Germany. Furthermore we diagnosed imported rickettsioses in travellers in increasing numbers, among them African tick bite fever (*Rickettsia africae*), Mediterranean spotted fever (*Rickettsia conorii*), and murine typhus (*Rickettsia typhi*). At least seven different species of rickettsiae are prevalent in Germany. Therefore, infections seem to occur much more frequently than known, however no data on their medical importance in the German population are available so far. Furthermore, our data show that rickettsioses account for a non-negligible part of febrile illnesses after travels to tropical and subtropical countries. Therefore, rickettsiae and rickettsial diseases should be included into the programs on zoonotic pathogens and zoonotic diseases which are implemented at the moment in Germany.

**Poster: Immunität**

**Poster I 1****Interferons as emergency antiviral agents against highly pathogenic influenza A viruses: efficacy evaluation in animal transmission models**

Stäheli P.; Haller O. (Virologie, Universität Freiburg)

About 20 years ago, the prophylactic use of interferon (IFN)-alpha for respiratory viral infections was evaluated in several clinical trials. The studies showed that rhinovirus and influenza virus infections were significantly milder in treated individuals. However, since prolonged intranasal administration of IFN-alpha caused a clinical picture which is not distinguishable from common cold, this treatment was never licensed for clinical use. We argued that these relatively mild side effects might be acceptable if IFN-alpha was used as emergency drug in the case of an influenza pandemic.

In this project, we used animal models to determine if IFN-alpha is active against highly pathogenic H5N1 influenza virus. The mouse model was used in a first study which showed that IFN-alpha was highly active if applied by the intranasal route. IFN-alpha was only active if applied before or shortly after infection; systemic application was far less effective than intranasal application; and the protective effect of IFN-alpha was most evident if the animals carried functional alleles of the Mx1 resistance gene. In a second study we used the guinea pig model to evaluate the ability of intranasal IFN-alpha to reduce lung and nasal wash titers in animals challenged with the reconstructed 1918 pandemic H1N1 virus or a contemporary H5N1 virus. IFN-alpha significantly reduced or prevented infection of guinea pigs by both viruses, as measured by virus titer determination and seroconversion. Ferrets were used in a third study. Intranasal treatment with IFN-alpha before infection with a seasonal H1N1 strain reduced viral titers in nasal washes at least 100-fold compared to mock-treated controls. IFN-treated animals developed only mild and transient respiratory symptoms, and the characteristic fever peak seen in mock-treated ferrets two days after infection was not observed. However, IFN-alpha did not increase survival after infection with a contemporary H5N1 virus, although viral titers in nasal washes were significantly reduced at days one and three post infection. Thus, intranasal application of IFN-alpha seems to protect well against viruses which replicate mainly in the upper respiratory tract, but not so well against highly pathogenic influenza viruses which disseminate to the lung.

## **Poster I 2**

### **Beitrag der C-terminalen PDZ Ligandendomäne des NS1 Proteins zur Pathogenität von Influenza A-Viren des Subtyps H5N1**

Zielecki, F. (Robert Koch-Institut), Semmler, I. (Robert Koch-Institut / Nationale Forschungsplattform für Zoonosen c/o TMF e.V.); Kalthoff, D.; Beer, M., Friedrich-Löffler-Institut, Wolff, T. (Robert Koch-Institut)

Die NS1 Proteine der meisten hoch-pathogenen aviären Influenza A Viren tragen am C-Terminus das PDZ-Liganden Motiv (PL) ESEV, während die NS1 Proteine von saisonalen Influenzaviren auf RSKV enden. PL Motive binden an PDZ Domänen innerhalb von Proteinen mit Funktionen in zellulären Signalwegen und können diese modulatorisch beeinflussen. Entsprechend erkennt das aviäre „ESEV-Motiv des NS1 Proteins zahlreiche humane PDZ Domänen-Proteine. Zudem erhöhte eine Substitution des NS1 C-Terminus von RSEV mit ESEV die Pathogenität in dem Stamm A/WSN/33, einem Maus-adaptierten H1N1 Influenzavirus. Für das RSKV-Motiv konnte dagegen fast keine Bindung an humane PDZ Domänen *in vitro*, noch ein modulierender Effekt auf die Pathogenität des A/WSN/33 Virus festgestellt werden. Das Influenza A/Vietnam/1203/04 Virus (VN/1203) vom Subtyp H5N1 exprimiert ein trunkiertes NS1 Protein, dem die 10 C-terminalen Aminosäuren fehlen und das daher kein PL Motiv trägt. Interessanterweise ist dieses Virus dennoch hoch-pathogen für Menschen, Hühner, Frettchen und Mäuse. Unser Ziel ist es die ungeklärte Rolle des C-terminalen NS1 Motivs in der Virusreplikation *in vitro* und *in vivo* zu beschreiben und mögliche Veränderungen der Pathogenität im Tiermodell zu bestimmen. Methodik: Zur Generierung von rekombinanten Virusmutanten wurde ein revers-genetisches System für das VN/1203 Virus etabliert. Mit dessen Hilfe wurde die ursprüngliche Länge des NS1 Proteins in zwei hergestellten Virusvarianten mit den Endmotiven ESEV oder RSKV rekonstituiert. Die Replikationseigenschaften der Virusmutanten wurden auf verschiedenen Zelllinien humanen (A549), murinen (NIH 3T3) und aviären Ursprungs (CEF) mit dem WT verglichen und die Pathogenität in der Maus (BALB/c) und dem Huhn (*Gallus gallus domesticus*) analysiert.

Ergebnisse: Die Analyse der Replikation zeigte, dass sich die ESEV-Variante sowohl auf humanen A549 Alveolarzellen als auch auf Mausfibroblasten deutlich schlechter als WT und RSKV-Virusmutante vermehrte. Auf embryonierten Hühnerfibroblasten waren dagegen keine Unterschiede zu erkennen. Nach Infektion von BALB/c Mäusen mit der

letalen Dosis von 5 PFU zeigte sich, für die beiden Virusmutanten ESEV und RSKV einen leicht verzögerter Krankheitsverlauf bezüglich Gewichtsverlusts und Letalität im Vergleich zum WT-Virus. Die Virustiter in verschiedenen Organen (Lunge, Gehirn, Herz, Niere, Milz, Leber und Thymus) waren dagegen sechs Tage nach Infektion sehr ähnlich. Eine erste Studie in Hühnern deutete an, dass beide Virusvarianten nur geringe Abweichungen vom hoch-pathogenen Phänotyp des WT aufweisen.

Diskussion: Es ist allgemein akzeptiert, dass die Pathogenität von Influenza A Viren nicht nur durch ein Gen bestimmt wird, sondern durch das Zusammenspiel mehrerer Gene wie z.B. NS1, HA, PB1-F2 und PB2 definiert wird. Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, dass das C-terminale ESEV-Motiv des NS1 Proteins keinen signifikanten Einfluss auf die hohe Pathogenität des H5N1 Virus in der Maus und im Huhn hat, jedoch die Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen einschränkt. Es ist möglich, dass PL-Motive im NS1 Protein die virale Virulenz variabel in Abhängigkeit vom Virusstamm und der Wirtsspezies modulieren.

### ***Poster I 3***

## **Primary and immortalized cells from European and African bats**

Müller, M. A. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn); Gloza-Rausch, F.; Seebens, A. (Noctalis, Centre for Bat Protection and Information); Drexler, J. F.; Corman, V. M. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn); Habetha, M. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn); Pfefferle, S. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn, Germany / Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine); Muth, D. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn, Germany);(2) Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg, Germany; Herzog, P. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn); Hofmann, A. (Institute for Pharmacology and Toxicology, University of Bonn), Vallo, P. (Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic); Kalko, K. (Department of Experimental Ecology, University of Ulm); Samuel Oppong (Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana); Kruppa, T.(Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg / Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR), Kumasi, Ghana); Drosten, C. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn)

Bats have been identified as likely reservoirs for a variety of emerging viruses, including severe acute respiratory syndrome (SARS)-Coronavirus, Henipaviruses, Lyssaviruses, and Ebola- and Marburg virus. Following initial description of these viral agents, further analysis of replication and virus-host interaction requires cell culture models from a variety of species. Up to now, only two bat cell lines from one single species are commercially available. In this study primary bat cell cultures from 4 different megachiroptera and 10 microchiroptera species from Germany and Ghana were generated. Of these 14 species, a total of 52 primary cell cultures were obtained from different organs (liver, kidney, intestine, lung and brain). Of those, a collection of 22 different cell cultures from 11 species were transduced by lentiviruses containing the SV40 large T-antigen for immortalization. Immortalized cell cultures were subcloned in order to produce three clonal cell lines of each culture. DNA from cells was used for genotyping in order to confirm the bat species. First infection studies showed that Marburgvirus strain Popp (Filoviridae) replicated efficiently on cells of its hypothesized host, *Rousettus aegyptiacus*. Replication of both Sindbis- (Togaviridae) and Newcastle Disease Virus (Paramyxoviridae) was seen in cells from insectivorous bats. Observed replication patterns were similar to those on reference cell lines for propagation of these viruses. Interestingly, human coronaviruses like NL63-and SARS-CoV were not able to replicate in these cells. This was

probably due to receptor incompatibility. Therefore, transgenic *R. aegyptiacus* cells expressing the SARS-CoV receptor (angiotensin converting enzyme 2, ACE2), were produced. On these cells, SARS-CoV replicated to high titers. These cell lines may contribute to future studies focusing on virus isolation, as well as analysis of replication patterns and zoonotic potential of emerging viruses.

***Poster I 4***

**Role of the coronaviral ADP-Ribose-1-Monophosphatase in escape from the innate immune system**

Kuri, T. (Department of Virology, University of Freiburg); Züst, R.; Thiel, V.; (Kantonal Hospital St. Gallen, Research Department); Ziebuhr, J. (Centre for Cancer Research and Cell Biology, School of Biomedical Sciences, The Queen's University of Belfast, UK); Weber, F. (Department of Virology, IMM, University of Freiburg)

"Coronaviruses are able to infect a wide spectrum of vertebrates and have long been recognized as important pathogens of livestock and companion animals. In man, infections are mainly associated with mild respiratory and enteric symptoms, but with the advent of severe acute respiratory syndrome (SARS) it became clear that coronavirus infections can also lead to severe disease in humans. Human coronavirus 229E (HCoV-229E), which causes a common cold, is a representative of the less virulent group of human coronaviruses, whereas SARS-CoV is currently the only highly pathogenic representative. It is known that coronaviruses possess a domain in the non-structural protein (nsp) 3 with macroH2A-like fold and ADP-ribose-1 „-monophosphatase (ADRP) activity, which is called a viral macrodomain. However, the biological significance of viral macrodomains has not been resolved so far. Previously, a mutant of HCoV-229E deficient in ADRP activity of the nsp3 protein was shown to have no apparent phenotype in cell culture. Here, we report that ADRP-deficient mutants of both HCoV-229E and the SARS-CoV show a strikingly higher sensitivity to the antiviral effect of type I interferon as their wild-type counterparts. In particular, the SARS CoV ADRP mutant was unable to grow in IFN-treated cells if a low multiplicity of infection was used. These data indicate that the ADRP activity of viral macrodomains has evolved to modulate the innate immune response of the host."

**Poster I 5****Untersuchungen zur Interaktion von West-Nil-Virus mit seinem zellulären Rezeptor**

Keller, M.; Schmidt, K.; Ziegler, U. (Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Greifswald - Insel Riems); Weber, F. (Uniklinik Freiburg, Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie); Hufert, F. (Georg-August-Universität Göttingen, Universitätsmedizin, Institut für Virologie); Groschup, M. (Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger, Greifswald - Insel Riems)

Das zu der Familie der Flaviviren gehörende West-Nil-Virus rückte mit der Einschleppung in die USA im Jahre 1999 und einem verheerenden Vogelsterben (v.a. Sperlings- und Rabenvögel), Tausender verendeter Pferde und mehr als Tausend humanen Opfern in den Blickpunkt der Öffentlichkeit. WNV besitzt einen produktiven Vermehrungszyklus in Vögeln und wird zwischen diesen wie auch auf Säugetiere und Reptilien durch Stechmücken übertragen. Um zu untersuchen, welche Mechanismen bei der Infektion dieser Wirte und den darauffolgenden immunologischen Reaktionen beteiligt sind, wurde am FLI damit begonnen, *in vitro* Systeme zu etablieren, die es erlauben, i) die Interaktion von Virus und Wirtszelle und ii) die Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionswegen, die zu einer Abwehr des Virus führen, zu untersuchen. Hierzu wurden Zellkulturmodelle basierend auf embryonalen Fibroblasten etabliert, die den beschriebenen zellulären Rezeptor für WNV (1), das Integrin  $\alpha v\beta 3$  nicht besitzen.

Des Weiteren wurde das Hauptimmunogen des Virus, das E-Protein, ein Glykoprotein der Virushülle, rekombinant hergestellt. Dieses dient der Anhaftung des Virus an die Wirtszelle; ein Vorgang, der durch die Domäne III des Proteins vermittelt wird. Diese Domäne III wurde ebenfalls rekombinant hergestellt und aufgereinigt und kann für die Untersuchungen verwendet werden.

Erste Experimente zeigten, dass Zellen, die die  $\beta 3$ -Integrinuntereinheit nicht besitzen und damit das Integrin  $\alpha v\beta 3$  nicht mehr auf ihrer Oberfläche tragen, dennoch mit den WNV-Stämmen NY1999 (Abstammungslinie 1) und Uganda (Abstammungslinie 2) infizierbar sind. In diesen Zellen findet eine Virusvermehrung statt, ohne dass jedoch ein zytopathischer Effekt beobachtet werden kann. Um auszuschließen, dass der Ausfall der  $\beta 3$ -Untereinheit durch andere Integrine der  $\alpha v$ -Superfamilie ( $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 6$  und  $\alpha v\beta 8$ ) kompensiert wird, wurden ferner  $\alpha v$ -defiziente Zellen hergestellt und mit WNV infiziert. Auch solche Zellen waren empfänglich. Diese Ergebnisse zeigen, dass  $\alpha v\beta 3$ -Integrin

(anders als bisher postuliert) bei den verwendeten Zellen und WNV-Stämmen, zumindest nicht als der alleinige zelluläre Rezeptor fungiert. Deshalb sollen die Untersuchungen nun auf a) andere Integrin-Untereinheiten und in Frage kommende Oberflächenmoleküle und b) weitere WNV-Stämme ausgedehnt werden.

Weiterhin sollen Tiermodelle Aufschluß über die Pathogenese der WNV-Infektion und der nachfolgenden Immunabwehr geben. Hierbei werden genetisch veränderte Mauslinien wie zum Beispiel eine Mauslinie, die defizient für den Interferon  $\alpha/\beta$  Rezeptor ist. Diese Tiere besitzen keine  $\alpha$ -Interferon vermittelte Immunantwort mehr und sind daher für virale Infektionen wie die WNV-Infektion besonders anfällig.

Literatur: Chu JJ, Ng ML. Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *Journal of Biological Chemistry* 279(52):54533-41, 2004.

**Poster I 6****Interaction of Tick-borne encephalitis virus with human plasmacytoid and myeloid dendritic cells**

Spiegel, M.; Dörrbecker, B. (Institut für Virologie, Universitätsmedizin Göttingen); Dobler, G. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München); Pfeffer, M. (Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig); Hufert, F. (Institut für Virologie, Universitätsmedizin Göttingen)

Introduction: Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is the most prevalent arbovirus in Europe and in Germany. Clinical symptoms range from mild fever to severe neurological disorders. The pathogenesis of TBEV is still not completely understood and mechanisms of virus host response interaction remains to be discovered. Since dendritic cells (DCs) play an important role in both antigen presentation and in bridging innate and adaptive immunity, we analyzed the interaction of TBEV with human primary plasmacytoid (pDCs) and myeloid DCs (mDCs). Methods: Human primary pDCs and mDCs were isolated from buffy coats of healthy donors using either a combination of negative and positive selection (pDCs) or negative selection only (mDCs). Purity of the isolated DCs was confirmed by FACS and subsequently the cells were infected with TBEV. Infected DCs were harvested at 12 h, 24 h, 48 h and 72 h post infection and analyzed for surface molecule expression by FACS. In parallel, interferon-alpha (IFN-alpha) and cytokine production of infected DCs were examined by IFN-ELISA and cytometric bead array. The amount of infectious progeny virus released by infected DCs was determined by TCID50 tests. Results: While pDCs exhibited only a transient activation after contact with TBEV in terms of upregulation of maturation markers, co-stimulatory markers and antigen-presenting molecules MHCI and MHCII, mDCs were clearly activated even at late time points after infection. On the other hand, cytometric bead arrays revealed that TBEV induced a strong proinflammatory cytokine response in both pDCs and mDCs, however pDCs produced much more antiviral active IFN-alpha compared to mDCs. In line with this observation pDCs did not support productive TBEV replication while TBEV-infected mDCs (according to our preliminary data) produced progeny virus which could also explain the observed differences in surface molecule expression. Interestingly, more virulent strains (e.g. Hypr71) induced a stronger cytokine and interferon response in pDCs compared to attenuated strains (e.g. Absettarov). Discussion: Our data suggest that both pDCs and mDCs mount an adequate response after contact with TBEV but only pDCs do restrict TBEV replication at the same time. mDCs however seem to be

productively infected and might therefore play a crucial role in the dissemination of the virus in infected individuals. Further experiments will be carried out to investigate whether TBEV-infected mDCs are (i) a significant source of progeny virus and (ii) might be involved in the spread of TBEV across the blood-brain-barrier.

## ***Poster I 7***

### **Das Aktin-ADP-ribosylierende Clostridium botulinum C2-Toxin induziert Mikrotubuli-Protrusionen**

Schwan, C.; Lang, A.; Aktories, K. (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg)

Neben den Botulinum-Neurotoxinen (BoNT) C1 und D produzieren Clostridium botulinum Stämme vom Typ C und D das Aktin-ADP-ribosylierende C2-Toxin. C2-Toxin ist binär aufgebaut und besteht aus der Enzymkomponente C2I und der Bindekomponente C2II. C2II (~100 kDa) wird tryptisch aktiviert, oligomerisiert zu Heptameren und bindet an Zielzellen über Kohlenhydrat-tragende Membranrezeptoren. Nach Interaktion mit C2I wird der Toxinkomplex endozytiert und gelangt in Endosomen. Das saure endosomale Kompartiment fördert die Umfaltung und Insertion des C2II-Heptamers in die Vesikelmembran. Es entsteht eine Pore durch die die Enzymkomponente C2I ins Zytosol gelangt. Hier wird durch C2I G-Aktin ADP-ribosyliert, wodurch die Aktinpolymerization blockiert und das Aktin-Zytoskelett zerstört wird. Die Rolle von C2-Toxin als Virulenzfaktor ist bisher wenig verstanden. Wir konnten zeigen, dass C2-Toxin und andere clostridiale binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine zu einer Veränderung des Mikrotubuli-Zytoskeletts führen und die Bildung von langen Mikrotubuli-Protrusionen auf der Oberfläche von intestinalen Epithelzellen induzieren. Die Toxine verstärken einerseits die Bindung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen an dem wachsenden Plusende der Mikrotubuli und andererseits wird die Funktion von Mikrotubuli-Capture „-Proteinen, die normalerweise das Auswachsen der Mikrotubuli am Zellcortex blockieren, verhindert. Die Toxin-induzierten Protrusionen an der Oberfläche von intestinalen Epithelzellen bilden ein dichtes Netzwerk, in dem Bakterien verstärkt adhärieren. Unsere Befunde sind für die Kolonisation von Clostridien von grundlegender Bedeutung. Es wird geprüft, welchen Einfluss die Bildung von Mikrotubuli-Protrusionen auf die Transzytose von Neurotoxinen bei der Toxinaufnahme im Intestinaltrakt hat.

### ***Poster I 8***

## **Interaction of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with intestinal epithelial cells**

Pott, J. (Institute for Medical Microbiology and Hospital Epidemiology, Hanover Medical School); Basler, T. (Institute for Microbiology, Department of Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine, Hannover); Duerr, C. (Institute for Medical Microbiology and Hospital Epidemiology, Hanover Medical School); Goethe, R. (Institute for Microbiology, Department of Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine, Hannover); Hornef, M. (Institute for Medical Microbiology and Hospital Epidemiology, Hanover Medical School)

*Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) is the causative agent of Johne's disease, a highly prevalent chronic intestinal infection in domestic and wildlife ruminants. The microbial pathogenesis of MAP infection has attracted additional attention due to an association with the human enteric inflammatory Crohn's disease. MAP is acquired by the fecal-oral route, encountering first contact with the host at the intestinal epithelial cell barrier. Therefore, we focussed on the cellular and molecular mechanisms of MAP internalization and epithelial activation using a well established model of differentiated and polarized intestinal epithelial cells, the m-ICcl2 cells. The mode and rate of internalization was assessed by immunofluorescent labelling of the bacteria, FACS-Analysis and confocal microscopy. The receptors involved in MAP recognition were studied by a siRNA approach. Furthermore, the activated signalling cascades and the link between uptake of MAP and activation of the cell were investigated. MAP was rapidly internalized and accumulated in a late endosomal compartment. In contrast to other opportunistic mycobacteria or *M. bovis*, MAP induced significant epithelial activation as indicated by NF- $\kappa$ B-independent but Erk-dependent chemokine secretion. Surprisingly, MAP induced chemokine production was completely internalization-dependent since inhibition of Rac-dependent bacterial uptake abolished epithelial activation. In accordance, innate immune recognition of MAP by differentiated intestinal epithelial cells occurred through the intracellularly localized pattern recognition receptors Toll-like receptor (TLR) 9 and NOD1 with signal transduction via the adaptor molecules MyD88 and RIP2. The internalization-dependent innate immune activation of intestinal epithelial cells is different to the stimulation of professional phagocytes by extracellular bacterial constituents and might significantly contribute to the histopathological changes observed during enteric MAP infection.

**Poster I 9****Dose-Dependent Cellular Immune Reaction of Chlamydomphila psittaci-infected Calves**

Liebler-Tenorio, E.; Vogel, A.; Reinhold, P.; Ostermann, C.; Schuber, E.; Sachse, K.; Berndt, A. (Friedrich-Loeffler-Institut)

**Dose-Dependent Cellular Immune Reaction of Chlamydomphila psittaci-infected Calves**  
Introduction: Chlamydomphila (C.) psittaci is an intracellular pathogen that infects animals and humans via mucosal epithelia of the respiratory tract. Methods: To study immunological features of C. psittaci infection of the lung, six-week-old calves were infected with different amounts of the bovine C. psittaci strain DC15 (10e6, 10e7, 10e8, 10e9 inclusion-forming units (IFU)/calf; 2 calves per infection dose) by means of a bronchoscope. The absolute number of blood leukocytes (granulocytes, monocytes, lymphocytes) as well as of BAL cell subsets (four subsets differentiated by their scatter characteristics) were determined by microscopy and flow cytometry up to 3 days post infection (dpi). Additionally, changes of immune cell composition in peripheral blood and BAL subsets were compared using monoclonal antibodies (CD2, CD4, CD8b, CD8a, CD11b, CD25, WC1, CD49d, CD14, MHC II) at 3 dpi. Results: Three days after challenge, an infection dose-dependent increase of the absolute number of BAL cells was evident. At the same time, the quantity of large, highly granular cells (presumably large macrophages) tended to decline, while the BAL subset of small, lowly granular cells (presumably lymphocytes) and larger, lowly granular cells (presumably lymphoblasts) increased. In peripheral blood, an increase in the number of granulocytes was more frequently observed after infection in all calves, but with different times of maximum (10e9: 1 dpi; 10e8 and 10e7: 2 dpi; 10e6: 3 dpi). Detailed immune cell analysis showed significant dose-dependent changes in BAL. Generally, the C. psittaci infection of calves was associated with a rise of CD14+, CD49d+ and IgA+ cells in the presumed group of lymphocytes and CD25+ cells in the presumed subset of lymphoblasts. Additionally, significantly more CD14+ and MHC class II+ cells were detectable in the BAL cell subset of large macrophages. Discussion and conclusion: Infection of calves with the bovine C. psittaci strain DC15 revealed changes in the lung and hardly any in peripheral blood. At 3 dpi, the elicited immune reaction was characterized by a dose-dependent increase of the absolute number of IgA+ lymphocytes, activated T cells, as well as monocytes/macrophages in the BAL. The

## Poster: Immunität

---

alveolar macrophages seem to be the major cell population of bovine lung that is dealing with the pathogenic chlamydial organisms.

**Poster I 10****Type III-secreted protein IncA of *Chlamydomphila psittaci* interacts with the host cell protein G3BP1 to promote an enhanced c-Myc protein concentration at the end of chlamydial infection cycle**

Borth, N.; Litsche, K.; Franke, C., (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology (Hans Knoell Institute)); Liebler-Tenorio, E.; Sachse, K. (Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich Loeffler Institute); Saluz, H. P.; Hänel, F. (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology [Hans Knoell Institute])

The obligatory intracellular bacterium *Chlamydomphila psittaci* is the causative agent of psittacosis in birds and humans. Relatively little is known about the molecular mechanisms by which Chlamydiae manipulate the mammalian host. Chlamydiae occupy a parasitophorous vacuole and employ a type III secretion mechanism to translocate host-interactive proteins. We chose to examine potential contributions of several type III-secreted proteins of *Cp. psittaci* to chlamydial pathogenesis by assaying for specific interactions with target eukaryotic proteins in a yeast two-hybrid system. Among other interactions we found an interaction between the IncA protein of *Cp. psittaci* and the human Ras-GTPase activating protein-SH3-domain-binding protein 1 (G3BP1). G3BP1 is a scaffolding „ protein linking signal transduction to RNA metabolism and additionally exhibits the function as a phosphorylation dependend endoribonuclease. IncA protein is localized in the chlamydial inclusion membrane and contains a cytoplasmatically exposed carboxy-terminal domain. The in vitro and in vivo interaction between full-length IncA and G3BP1 could be shown by performing GST-pull down experiments and immunoprecipitation experiments. Regardless of the low homology among the IncA proteins IncA of *C. trachomatis* also interacts with G3BP1 in yeast and in vitro. Localization of G3BP1 within infected cells was investigated by microscopic methods. An enhanced c-Myc protein concentration detected at the end of infection cycle of *Cp. psittaci* and *C. trachomatis* will be discussed regarding to the interaction of IncA and G3BP1 which might cause a stabilization either of the c-Myc mRNA or the protein.

***Poster I 11***

**Neuron- and astrocyte-specific function of IKK-2 and NEMO in *Toxoplasma* encephalitis**

Händel, U. (Universität Magdeburg, Inst. f. Med. Mikrobiologie); Deckert, M. (Universität Köln, Neuropathologie); Schlüter, D. (Universität Magdeburg, Inst. f. Med. Mikrobiologie)

The obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* induces a chronic persisting encephalitis and is controlled by T and B cells. Although *T. gondii* infects brain resident cells including astrocytes, neurons and microglia, the function of these cells in *Toxoplasma* encephalitis (TE) is much less well defined compared to T and B cells. Since the transcription factor NF- $\kappa$ B is a major regulator of immune responses and intracellular survival of *T. gondii* may be dependent on a manipulation of the NF- $\kappa$ B pathway, we studied the role of neuronal and astrocytic IKK-2 and NEMO, two members of the NF- $\kappa$ B signalling cascade, in TE. After infection of mice deficient in neuronal or astrocytic expression of IKK-2 and NEMO, respectively, with *T. gondii*, all mouse strains developed a TE with only slight differences in survival and parasite control as compared to control mice. However, neuronal loss was more pronounced in inflammatory lesions of mice with neuronal deletion of IKK2. In addition, cultured primary IKK2-deficient neurons exhibited an increased cell death after infection with *T. gondii* as compared to neurons from control mice. These findings suggest that IKK-2 is important for an optimal survival of neurons in TE but that a topographically restricted loss of neurons close to inflammatory infiltrates does not result in an increased mortality.

**Poster I 12****Toxoplasma gondii and Neospora caninum:  
Similarities in immunological responses and protein  
composition**

Spekker, K. (Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, University of Düsseldorf)

Apicomplexa constitute an ancient group of parasites which share apical specialization features and infect a wide range of vertebrates such as humans (*Toxoplasma gondii*) and cattle (*Neospora caninum*). The present study deals with the molecular comparison of *T. gondii* and *N. caninum* and analyzes the immunological defense mechanisms directed against both apicomplexa. *T. gondii* is an obligate intracellular parasite that can invade and replicate in essentially all nucleated mammalian cells. The parasite develops within a parasitophorous vacuole (PV), characterized by a network of elongated nanotubules. Major components of this parasitophorous vacuole (PV) are dense granule proteins (GRA proteins). *N. caninum* is a parasite closely related to *T. gondii*. In nature this parasite is found especially in dogs and cattle, but may also infect other livestock.

As obligate intracellular parasites, *T. gondii* and *N. caninum* growth is mainly controlled by the cell-mediated immune response. During infection, the cytokine interferon-gamma (IFN-gamma) plays a major role in regulating the growth in natural and also experimental diseases. The present study indicates that the IFN-gamma dependent induction of the tryptophan-degrading enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is responsible for the inhibition of *T. gondii* as well as *N. caninum* growth, mediated by IFN-gamma activated human fibroblasts. IDO is a tryptophan-degrading enzyme, which mediates antimicrobial as well as immunoregulatory functions. Furthermore it could be shown that IDO is also involved in the antiparasitic effects mediated by bovine fibroblasts and endothelial cells. In both cases, the antiparasitic effect could be abrogated by the supplementation of tryptophan as well as by the IDO-specific inhibitor 1-L-methyltryptophan, which indicates that human and bovine cells use the identical effector mechanism to control the growth of the parasites *T. gondii* and *N. caninum*.

Immune responses against *T. gondii* are often directed against GRA-proteins which initially were described as immunologically important excreted secreted antigens. Thus, we performed BLAST-analysis of all GRA-proteins described in *N. caninum* and *T. gondii*. We found a

homologue with an identity of 53 % for *T. gondii* GRA1 (23 kDa). For GRA9, an immunodominant antigen of *T. gondii* described by us, we could identify a *N. caninum*-homologue, with 59 % identity based on the *T. gondii* GRA9 amino acid sequence. The isolated gene sequence predicted a significant level of protein sequence homology of the gene product to the GRA9 antigen of *T. gondii*. In immunofluorescence analysis, using antibodies against TgGRA9 or TgGRA1 respectively we are able to localize a NcGRA9 antigen as well as a NcGRA1 antigen within *N. caninum* which confirm the close affinity between *T. gondii* and *N. caninum*.

**Poster: Diagnostik**

### ***Poster D 1***

## **Henipavirus RNA in African Bats**

Drexler, J.-F. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre); Corman, V. M. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre); Gloza-Rausch, F. (Noctalis, Centre for Bat Protection and Information); Seebens, A. (Noctalis, Centre for Bat Protection and Information); Annan, A. (Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR), Kumasi, Ghana); Ipsen, A. (Noctalis, Centre for Bat Protection and Information); Kruppa, T. (Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine (KCCR), Kumasi, Ghana / Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine); Müller, M. A. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre); Kalko, E. K. V. (Institute of Experimental Ecology, University of Ulm / Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panama); Adu-Sarkodie, Y.; Oppong, S. (Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana); Drosten, C. (Institute of Virology, University of Bonn Medical Centre, Bonn)

**Background:** Henipaviruses (Hendra and Nipah virus) are highly pathogenic members of the family Paramyxoviridae. Fruit-eating bats of the Pteropus genus have been suggested as their natural reservoir. Human Henipavirus infections have been reported in a region extending from Australia via Malaysia into Bangladesh, compatible with the geographic range of Pteropus. These bats do not occur in continental Africa, but a whole range of other fruit bats is encountered. One of the most abundant is *Eidolon helvum*, the African Straw-coloured fruit bat.

**Methodology/Principal findings:** Feces from *E. helvum* roosting in an urban setting in Kumasi/Ghana were tested for Henipavirus RNA. Sequences of three novel viruses in phylogenetic relationship to known Henipaviruses were detected. Virus RNA concentrations in feces were low.

**Conclusions/Significance:** The finding of novel putative Henipaviruses outside Australia and Asia contributes a significant extension of the region of potential endemicity of one of the most pathogenic virus genera known in humans.

**Poster D 2**

**Evaluation of two new sensitive quantitative real-time RT-PCR assays on West Nile virus lineages 1 and 2**

Groschup, M.; Eiden, M.; Vina Rodriguez, A. (Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases at the Friedrich-Loeffler-Institut); Hoffmann, B. (Institute for Diagnostic Virology at the Friedrich-Loeffler-Institut) Ziegler, U. (Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases at the Friedrich-Loeffler-Institut); Weidmann, M., (Institute for Virology, Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität); Groschup, M. (Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases at the Friedrich-Loeffler-Institut)

Introduction: West Nile virus (WNV) is an arbovirus, and belongs to the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*, which is transmitted by birds and *Culex* spp. WNV was isolated for the first time in Uganda in 1937 and was only found in the Old World until recently. However, in 1999 WNV emerged in the New World, when it was detected during an outbreak of encephalitis in New York City. Since the year 2000 WNV has spread across North America and into Central America. In Europe only spatially (and in most instances also timely) limited WNV outbreaks happened in southern and eastern European regions up to now. The WNV infection in humans is characterised in a mild form by fever, but also in more severe cases by encephalitis accompanied with a meningitis and myelitis. WNV has two genetic lineages: lineage 1 has been isolated in North America, Europe, Africa, Asia and Australia. Lineage 2 comprises WNV strains from sub-Saharan regions of Africa and from Madagascar and more recently in Austria.

Methods: In this study two new real-time reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) assays for the sensitive detection of WNV strains from lineages 1 and 2 were developed and compared to previously published real-time RT-PCR assays (assays 3-5). Primers and probes were designed using multiple alignments of previous and recent WNV sequences. The real-time PCR was performed with the Mx3000P QPCR system (Agilent/Stratagene) using the Quantitect Probe RT-PCR Kit (Qiagen). Viral RNA was isolated from cell culture by using Qiamp viral RNA kit.

Results: The sensitivity and amplification efficiency of the real-time RT-PCR assays, using 5 different real-time RT-PCR assays, were evaluated by testing 10-fold dilutions of WNV strain NY99 (lineage 1) and WNV strain Uganda (lineage 2). Three assays could detect 10<sup>-7</sup> dilution of virus (assays 1, 2, 3), one assay 10<sup>-6</sup> (assay 5) and one assay 10<sup>-5</sup> dilution (assay 4). Same analysis was carried out with WNV strain Uganda

evaluating 10 fold dilutions, again. Two assays (assay 1 and assay 2) could detect virus in 10<sup>-7</sup> dilutions, two assays only in 10<sup>-4</sup> dilutions (assays 4 and 5) and one assay (assay 3), that was reported to be specific for NY99 strain, displayed an unspecific signal for Uganda strain.

Discussion In summary, we have established two new real-time RT-PCR assays (assay 1 and 2) with comparable and excellent analytical sensitivity that performed well for WNV viral RNA. We used two different primer and probe sets, which anneal at different regions of the WNV genome at the highly conserved 5'NTR segment (assay 1) and at the NS3 region (assay 2) to avoid unspecific signals. A validated and field-tested assay could therefore have great utility to prevent transmission and disease. This new assay will now be used for monitoring the WNV situation in Germany and the detection of the virus in various samples including animal tissues, mosquitoes, blood and serum.

***Poster D3***

**Development of Flow-Trough Microarray based Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay for the Detection of European Arboviruses**

Hasib, L. K.; Dilcher, M.; Hufert, F.; König-Meyer, U.; Weidman, M. (Institute of Virology, University Medicine Göttingen)

**Introduction:** Recent outbreaks of infectious viruses or pathogens have the necessity to improve existing tests and to develop new methods in order to detect spread or new outbreaks more quickly which is vital for the early and successful surveillance strategies. Currently, the microarray technology is developing rapidly and has been applied to diagnosis of infectious diseases. Therefore we have developed a three dimensional (3D) universal microarray based on multiplex ligation-dependent probe amplification assay for the detection of nine European Arboviruses, particularly, Toscana virus (TOSV), Sandfly virus (SFSV), Tahyna virus (TAHV), Batai virus (BATV), Inkoo virus (INKV), and Uukuniemi virus (UUKV), West Nile virus (WNV), Tick born encephalitis virus (TBEV), and Tribec virus (TRBEV).

**Methods:** The method is based on the principle of the PamChip microarray technology, which uses a porous 3D aluminium-oxide substrate and flow-through incubation coupled with multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). It consists of upstream and downstream probe that contain a PCR primer. Additionally, the upstream probe has a unique Pam-sequence (synthetic DNA sequence) which is complementary to a Pam-sequence spotted on PamChip(r) 4U. Firstly, the probes hybridize to the target sequences, and then they are ligated. Afterwards MLPA or RT-MLPA amplification is performed using fluorescent labeled primers. Subsequently, the amplicons are hybridized on the array by active pumping. The assays are performed on the PamStation(r)12 which processes 12 samples simultaneously including incubation, washing and fluorescent CCD-imaging.

**Results:** We have established 3D flow through microarray of PamGene, thereby we have developed a microarray based MLPA assays for the detection of the following viruses: TRBV, TOSV, SFSV, TAHV, INKV, BATV, UUKV, WNV and TBEV on DNA and RNA level. 46 corresponding MLPA probes were designed and used. The MLPA sensitivity was increased using 20 % Formamide, particularly for TAHV, INKV and UUKV. The assays were

validated using viral RNA from cell culture. The sensitivity of these assays was comparable to real time RT-PCR assays of the tested viruses

Conclusion: Our results suggest that this assay is useful for a rapid, sensitive, specific and accurate detection of multiple viruses.

**Poster D 4****Genetische Unterschiede zwischen Botulinum-Neurotoxin produzierenden Clostridien**

Beykirch, S. (Georg-August-Universität Göttingen, AG Botulinom)

*Clostridium botulinum* zählt zu den anaerob wachsenden, sporenbildenden stäbchenförmigen Bakterien. Ihr wichtigstes Habitat ist der Boden, sie kommen aber auch in marinen Sedimenten und im Verdauungstrakt von Säugetieren, Vögeln und Fischen vor. Sie sind in der Lage, unter bestimmten Bedingungen charakteristische hochpotente Botulinum-Neurotoxine (BoNTs) zu bilden, die Muskellähmung und Atemstillstand hervorrufen und schließlich zum Tod führen können. Anhand ihrer Toxinbildung kann man *C. botulinum* in bislang sieben verschiedene Gruppen (A- G) einteilen. Während die Toxintypen A, B, E und F humantoxisch sind, entfalten die Serotypen C und D ihr toxisches Potential besonders in Rindern und Geflügel. Typ E wird häufig in kontaminiertem Meeresfisch nachgewiesen, während Typ G bisher mit keiner Erkrankung bei Mensch und Tier in Zusammenhang gebracht werden konnte. Der genetische Ursprung der Toxine differenziert auch innerhalb der sieben Toxintypen sehr stark, so dass für jeden Toxintyp inzwischen verschiedene Subtypen klassifiziert werden konnten (Hill et al. 2007). So existieren für den Toxintyp A vier Untergruppen, für den Typ B fünf Untergruppen und für Typ E sechs verschiedene Subtypen. Daneben existieren bivalente Stämme, die mehrere der Toxine bilden können, wie z.B. Ab, Ba, Af und Bf. Bei Stämmen vom Typ F spiegelt sich ihr unterschiedlicher Metabolismus und die daraus resultierende Einteilung in proteolytische und nichtproteolytische Stämme zusätzlich im Toxingen wider und erlaubt anhand dessen eine Zuordnung. Auch für BoNT C und BoNT D ist eine zusätzliche Differenzierung möglich. Allerdings kommt es hier zwischen den beiden Toxintypen zu Überschneidungen im genetischen Material. So existiert jeweils ein einfacher Typ C1 und D und zusätzlich die Mosaik- Subtypen C1/D und D/C1. Dort befinden sich in der Region, die für das HC-Fragment der schweren Kette des Toxins kodieren, statt der typhomologen Sequenzen jeweils Fragmente des anderen Typs. Diese Sequenzvariabilität und die Möglichkeit der Kreuzreaktionen müssen bei der Entwicklung von Detektions- und Identifizierungssystemen bedacht werden, auch im Hinblick auf die Verwendung des Maus-Bioassay als Goldstandard mit anschließender Identifizierung des Toxintyps durch Neutralisation. Es wurde ein PCR-Methode mit sechs Primerpaaren zur Sequenzierung aller Subtypen von A bis G entwickelt. Während die

Primerpaare für A, B und E eine Differenzierung in die Subtypen durch anschließende Sequenzierung der PCR-Fragmente erlauben, ist eine Unterscheidung in die Subtypen C, D, C1/D, D/C1 und die proteolytischen bzw. nichtproteolytischen Stämme vom Typ F schon durch die Auswertung der Gelelektrophorese möglich. Dadurch gelang es, *C. botulinum*- Isolate aus Huhn und Rind bis hin zum Subtyp eindeutig zu identifizieren. Außerdem war es möglich, die *C. botulinum*- (Referenz)stämmen aus der Göttinger Stammsammlung mithilfe der Sequenzierung eindeutig in ihre Subtypen einzuordnen. Die gewonnenen Sequenzen werden veröffentlicht.

**Poster D 5****Sequenzierung des Genoms von Clostridium botulinum 2300 (Typ C) und funktionale Charakterisierung des C2-Toxins**

Sterthoff, Ch. (Institut für Genomforschung und Systembiologie, CeBiTec, Universität Bielefeld)

Einleitung: Um detaillierte Einblicke in die Zusammenhänge zwischen der genetischen Information verschiedener Clostridium botulinum-Stämme und der Zoonose Botulismus zu erlangen, wurde der Stamm 2300 (Botulinum-Neurotoxin Typ C) sequenziert. Besonderes Augenmerk sollte hierbei nicht nur auf die für die Synthese von Botulinum-Neurotoxin wichtigen Gene gelegt werden, sondern auch auf das in verschiedenen Clostridien-Stämmen des Typs C und D zusätzlich vorkommende binäre C2-Toxin, das ein G-Aktin-ADP-ribosylierendes Toxin darstellt. Das C2-Toxin besteht aus einer enzymatischen Komponente (C2I) und einer Bindungs- und Translokationskomponente (C2II). Frühere Untersuchungen zeigten, dass die enzymatische Komponente eine Größe von ~50 kDa aufweist und die Bindungs- und Translokationskomponente in ihrer inaktiven Form eine Größe von ~80 kDa hat. C2II wird durch das proteolytische Abspalten eines 20 kDa großen aminoterminalen Fragmentes aktiviert. Die enzymatische Komponente C2I bindet an das gebildete C2II-Heptamer und die Endozytose des Toxin-Rezeptor-Komplexes in das Zytosol kann stattfinden (Ohishi, Iwasaki et al., 1980; Barth, Aktories et al., 2004).

Methodik: Die genomische DNA des Stammes Clostridium botulinum 2300 (Typ C) wurde isoliert und mittels 454-Pyrosequenzierung analysiert. Die vom Newbler Assembler aus den Rohdaten generierten Contigs wurden in das bioinformatische Tool GenDB geladen und nachfolgend automatisch annotiert (Meyer, Goesmann et al., 2003). Vergleiche der Nukleotidsequenzen der Toxingene mit Daten aus GenBank sollten Besonderheiten des sequenzierten Stammes aufdecken. Außerdem wurden zwei Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt: Hierbei handelte es sich zum einen um TER (transepithelial electrical resistance)-Assays und zum anderen um 86Rubidium-Release-Untersuchungen, wobei jeweils zwei unterschiedlich lange C2II-Proteine miteinander verglichen wurden.

Ergebnisse: Durch die 454-Sequenzierung des Stammes Clostridium botulinum 2300 (Typ C) und die anschließende Filterung und Assemblierung der Rohdaten konnten insgesamt 154 große Contigs (>500 nt) generiert werden. Diese Contigs wurden als Pseudogenom in die

Datenbank GenDB geladen und vollautomatisch annotiert. Der durchschnittliche G+C-Gehalt der DNA von *Clostridium botulinum* 2300 wurde mit 27,96 % bestimmt und es wurden bioinformatisch 2746 proteinkodierende Regionen vorhergesagt. Im Genom von *Clostridium botulinum* 2300 konnten auch die Strukturgene für die beiden Komponenten von C2-Toxin (c2I und c2II) nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Gene und ihrer abgeleiteten Proteine mit publizierten Daten war auffällig, dass die Toxinkomponente C2II von *Clostridium botulinum* 2300 offensichtlich in verlängerter Form vorliegt. Dieser Längenunterschied von 129 Aminosäuren am Carboxyterminus des Proteins hat interessanterweise einen Einfluss auf die Toxizität des C2-Toxins. So konnte durch Rubidium-Release-Untersuchungen und TER-Assays nachgewiesen werden, dass nach der Zugabe des verlängerten C2II eine signifikant schnellere Vergiftung der Zelle eintritt als bei der Zugabe des verkürzten Proteins.

Diskussion: Durch die Sequenzierung des Genoms von *Clostridium botulinum* 2300 (Typ C) wurde eine verlängerte Variante der Toxinkomponente C2II identifiziert. Die zusätzliche Aminosäuresequenz am Carboxyterminus des Proteins ist wahrscheinlich für eine gesteigerte Toxizität des C2-Toxins verantwortlich. Zu klären bleibt allerdings noch, ob der verlängerte C-Terminus zu einer gesteigerten Aktivität, einer stärkeren Bindung des Toxins an seinen Rezeptor, einer verstärkten Porenbildung und/oder einer Änderung des Porendurchmessers führt.

Barth, H., K. Aktories, et al. (2004). Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(3): 373-402, table of contents.

Meyer, F., A. Goesmann, et al. (2003). GenDB-an open source genome annotation system for prokaryote genomes. „ *Nucleic Acids Res* 31(8): 2187-95.

Ohishi, I., M. Iwasaki, et al. (1980). Purification and characterization of two components of botulinum C2 toxin. *Infect Immun* 30(3): 668-73.

**Poster D 6****CELL ENTRY OF BOTULINUM NEUROTOXIN TYPE C IS DEPENDENT UPON TWO CARBOHYDRAT BINDING SITES**

Strotmeier, J. (Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover); Jutzi, S.; Mahrhold, S. (Institut für Biochemie Medizinische Hochschule Hannover); Holt, M. (Department of Neurobiology Max-Planck Institute for Biophysical Chemistry); Urlaub, H. (Laboratory of Bioanalytical Mass Spectrometry, Max-Planck Institute for Biophysical Chemistry); Bigalke, H. (Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover); Jahn, R. (Department of Neurobiology); Rummel, A. (Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover); Binz, T. (Institut für Biochemie Medizinische Hochschule Hannover)

The seven botulinum neurotoxin (BoNT) serotypes cause muscle paralysis by selectively cleaving core components of the vesicular fusion machinery inside motoneurons. Their extraordinary activity relies on the highly specific uptake by neuronal cells. Initially they bind to complex gangliosides via a conserved binding pocket which has so far been characterized in detail only for BoNT/A, B, E, F and G. An additional interaction with a protein receptor is required for neurotoxin uptake as shown for BoNT/A, B, E, F and G. The BoNT/B and G protein receptor binding site is located in the neighborhood of the ganglioside binding pocket at the tip of their cell binding domain. Information about corresponding sites is lacking for the remaining BoNTs. Here, we report the identification and characterization of the canonical ganglioside binding pocket and of a second receptor binding site for BoNT/C. Substitution of W1258 and Y1259 as well as of Y1179, A1200, and L1203, the latter three residues being predicted to be located at a surface region that corresponds to the protein receptor binding sites of BoNT/B and G, drastically decreased toxicity at mice phrenic nerve preparations. Results of CD-spectroscopic analyses evidenced that these effects were not due to mutation evoked structural alterations. Interaction studies employing immobilized gangliosides revealed that not only mutation of the canonical ganglioside binding pocket but also of the second interaction site considerably impaired ganglioside binding. Furthermore, the activity of BoNT/C-W1258L, a mutant exhibiting a largely deactivated canonical ganglioside binding pocket, at phrenic nerves from mice deficient in ganglioside biosynthesis was about 400-fold lower compared to its activity at phrenic nerves from wildtype mice. Only the existence of a second physiologically relevant ganglioside interaction site in BoNT/C explains this

observation. Thus, this study delineates a variant double receptor scenario without a direct neurotoxin protein - protein receptor interaction.

**Poster D 7****Mikroarray-basierte Detektion und Charakterisierung von Clostridium botulinum**

Seyboldt, C. (Friedrich-Loeffler-Institut FLI, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen)

Die Labordiagnostik des Botulismus stellt hohe Anforderungen. Clostridium botulinum Neurotoxin (BoNT) produzierende Clostridien repräsentieren trotz der einheitlichen Bezeichnung als C. botulinum mehr als eine Spezies. Heute werden 7 Serotypen mit insgesamt 25 Subtypen des Neurotoxins und 4 verschiedene physiologische/ phylogenetische Gruppen von C. botulinum unterschieden, hinzu kommen noch BoNT produzierende Stämme von C. barati und C. butyricum. Die gängige Botulismus-Diagnostik, etwa durch den Maus-Bioassay oder PCR, beschränkt sich bis heute meist auf die Identifikation des Toxin-Serotyps. Für die weitere Charakterisierung und epidemiologische Fragestellungen ist jedoch auch der Toxin-Subtyp sowie die physiologische/ phylogenetische Gruppe des jeweiligen C. botulinum Stammes von Interesse. Da die Zuordnung eines Isolates zu einem der 7 Serotypen wenig über die Zugehörigkeit zu einer der vier physiologischen Gruppen aussagt, erfordert diese Zuordnung sowie die Identifikation des Subtyps weitere, aufwändige Untersuchungen. Eine mögliche, einfache Lösung zu diesem Problem kann ein Mikroarray sein, der neben sämtlichen bekannten Toxin-Subtypen auch Gene detektiert, die spezifisch für die genannten vier Gruppen der C. botulinum Spezies sind. Die Auswahl der Zielgene für den Microarray umfasst drei Gruppen von Genen:

- 1) Die einzelnen Toxingene sowie ihrer bekannten Subtypen sowie ein „Signalgen“ für die Toxinproduktion
- 2) Ein ubiquitäres Gen, das in den physiologischen Gruppen ausreichend große Sequenzunterschiede aufweist
- 3) Für die physiologischen Gruppen spezifische Gene

Auf dem ersten Layout eines Mikroarrays zur Typisierung von C. botulinum finden sich 67 Sonden. 51 Sonden detektieren dabei 20 Subtypen der 7 Toxin-Serotypen, 7 weitere Sonden sind spezifisch für das Gen der nicht-toxischen, nicht-hämagglutinin Komponente des Toxin-Komplexes. Auch spezielle Sonden für die Detektion der Neurotoxingene von C. baratii und C. butyricum sind auf dem Array vorhanden. Das ausgewählte ubiquitäre Gen ist das rnpB-Gen. Es handelt sich hierbei um die RNA-Komponente der Ribonuklease P, einem Enzymkomplex, der an der Prozessierung von tRNA beteiligt ist. Die RNA-

Komponente besitzt mehrere konservierte Bereiche, die variablen Bereiche sind auf einige Sequenzbereiche konzentriert und erlauben die Differenzierung von Bakterien bis zur Spezies-Ebene. Auch andere Studien haben bereits das Differenzierungspotential dieses Gens und die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen aus 16S-Sequenzen gezeigt. Für die dritte Gruppe der Zielgene ist bislang nur ein für die physiologische Gruppe I spezifisches Gen bekannt und berücksichtigt. Das Genprodukt des *fldB*-Gens ist im Protein-Metabolismus proteolytischer *C. botulinum* (Gruppe I) beteiligt, der in der Physiologie der anderen *C. botulinum*-Arten nicht vorkommt. Es ist zu erwarten, dass in nächster Zukunft weitere gruppenspezifische Gene identifiziert werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird das erste Layout des Arrays experimentell überprüft. Erste Versuche zeigen weitgehende Übereinstimmung der erzielten Resultate mit Ergebnissen aus der umfangreichen Charakterisierung der Stämme.

## **Poster D 8**

### **Prävalenz von Clostridium botulinum bei Rindern**

Gessler, F. (Institut für angewandte Biotechnologie der Tropen); Beykirch, S. (Universität Göttingen, Department für Nutztierwissenschaften); Böhnelt, H. (Universität Göttingen, Department für Nutztierwissenschaften)

Clostridium botulinum, ein anaerobes, sporenbildendes Bakterium, bildet hochpotente Neurotoxine, die bei Tier und Mensch zum Botulismus, einer schlaffen Muskellähmung führen können. Dieses Bodenbakterium ist weltweit verbreitet, häufig sind aber nur ein oder zwei der sieben bekannten Toxintypen (A-G) lokal anzutreffen. Da eine Beziehung zwischen dem Vorkommen des Bakteriums in der Umwelt und der Erkrankung in vielen Fällen nachgewiesen werden konnte, kommt der Prävalenz des Bakteriums eine besondere Bedeutung zu. Ziel der hier vorgestellten Studie ist deshalb, die Prävalenz am Beispiel Rind in Deutschland zu schätzen. Als Probenmatrix für die Untersuchungen kommen Serum- und Kotproben von Rindern in Betracht. Im Serum sollen toxinspezifische Antikörper detektiert, im Kot Clostridium botulinum nachgewiesen und typisiert werden. Für beide Probenmatrices musste die Methodik zunächst entwickelt und validiert werden. Zum Antikörper-Nachweis im Serum wurden unterschiedliche Systeme entwickelt und geprüft. Eine Vorauswahl wurde mit unserer Serumbank gescreent und die Protokolle optimiert. Die abschließende Validierung erfolgt jetzt mit einer externen Serumbank. Clostridium botulinum soll mittels einer qPCR nachgewiesen und typisiert werden. Für den Zellaufschluss und die daraus resultierende Gewinnung von DNA wurden zahlreiche Protokolle, aber auch kommerzielle Testkits auf ihre Eignung überprüft. Getestet wurde die Isolierung sowohl aus Kulturmaterial als auch aus gespickten Rinderkot- und Bodenproben. Ein Protokoll wurde definiert. Für jeden Toxintyp wurde ein entsprechendes Primerset entwickelt und Kreuzreaktionen mit den jeweils anderen Toxintypen und weiteren Clostridienarten ausgeschlossen. Die Protokolle sind optimiert für Boden- bzw. Rinderkotproben. Die Botulinum-Neurotoxine sollen über einen multiplexfähigen Biochip nachgewiesen werden. Die erste Generation wurde mit verschiedenen Detektionsantikörpern auf Toxine und Komplexe getestet. Antikörperkombinationen wurden ausgewählt und die Multiplexfähigkeit damit nachgewiesen.

## **Poster D 9**

### **Mikrobiologischer und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) bei Kälbern**

Fischer, M.; Akineden, Ö.; Abdulmawjood, A.; Fernandez-Silva, J.; Wagner, H.; Bülte, M. (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen)

Die Paratuberkulose (Johne's Disease) ist eine chronische, nicht therapierbare Darmentzündung der Wiederkäuer, die in Milchviehbetrieben mit hohen wirtschaftlichen Einbußen einhergeht. Der Erreger *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* steht seit Jahren überdies im Verdacht, an der Entstehung und/oder Unterhaltung des als Morbus Crohn bezeichneten Krankheitsgeschehens des Menschen beteiligt zu sein. Die Ausscheidung von MAP kann schon vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome erfolgen. Die Identifizierung von infizierten Kälbern ist daher von besonderem Interesse. Im Rahmen des Innovationsprojektes Frühdiagnostik von Infektionen mit MAP bei Rindern „ wurden daher in zwei zeitlich voneinander getrennten Versuchsserien jeweils sechs Kälber mit einem MAP-Referenzstamm (ATCC; BAA-968) artifiziell infiziert. Zuvor war eine Kontrollgruppe von sechs Kälbern, die ebenfalls aus Paratuberkulose-unverdächtigen Betrieben stammten, aufgestallt worden. Von allen Kälbern wurden Kotproben sowie Biopate der Jejunal- und Ileozäkallymphknoten, welche minimal-invasiv am 14., 30., 90. und 170. Tag nach der Infektion entnommen wurden, für die Diagnostik berücksichtigt (AG der Projektpartner aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der JLU Gießen). Diese Proben wurden sowohl kulturell als auch molekularbiologisch untersucht. Die Kälberkotproben wurden nach den Vorgaben des „Arbeitskreises für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik „ (AVID) aufgearbeitet; parallel wurden die NADC-(National Animal Disease Center)-Methode nach Stabel et al. (1997) und die Verfahrenskaskade in Anlehnung an Beard et al. (2001) berücksichtigt. Die molekularbiologische Untersuchung erfolgte mit dem TaqMan-Real time PCR-Verfahren nach Schönenbrücher et al. (2008), basierend auf den MAP-Markern f57 und ISMav2 bei Mitführen einer internen Amplifikationskontrolle sowie parallel mit einem nested-PCR-Verfahren nach Bull et al. (2003).

Die bisher vorliegenden Ergebnisse der mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen zeigen, dass ein MAP-Nachweis in Lymphknotenbiopaten vereinzelt bereits am 14. und 30. Tag, sicher jedoch bei allen Kälbern ab dem 90. Tag post infectionem möglich war. In

den Kotproben konnte der MAP-Infektionsstamm über einen Zeitraum von zwei Wochen nach der Infektion regelmäßig nachgewiesen werden. In den nachfolgenden Wochen gelangen nur intermittierende Nachweise. Dabei erwies sich, insbesondere hinsichtlich des Dekontaminationserfolges zur Ausschaltung der unerwünschten Begleitmikroflora, das modifizierte Verfahren nach Beard et al. (2001) den anderen beiden Methoden als deutlich überlegen. Die bisherigen Ergebnisse lassen eine frühzeitige molekularbiologische Diagnostik einer MAP-Infektion bei Kälbern erwarten. Die Biopotentnahme des Lymphknotens (s. Poster T. Seeger et al.) sollte dazu im Alter von drei Monaten erfolgen. Zwar gelingt auch die kulturelle Anzucht des Erregers; aufgrund des langsamen Wachstums (mindestens drei bis vier Wochen) ist dem molekularbiologischen Verfahren (Ergebnisse innerhalb von zwei Tagen verfügbar) der Vorzug zu geben.

Die Arbeiten werden durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz sowie durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (Förderkennzeichen: 28-1-32.006-06) gefördert.

### **Poster D 10**

## **Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern mit Hilfe der Durchflusszytometrie**

Menge, Ch. (Institut für Molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena); Schillinger, S.; Bridger, P. S. (Institut für Hygiene & Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig Universität Gießen), Seeger, T. (Klinik für Wiederkäuer & Schweine, Justus-Liebig-Universität Gießen); Akineden, Ö. (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen); Bauerfeind, R. (Institut für Hygiene & Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig Universität Gießen)

Einleitung: Bei den in der Routinediagnostik angewendeten serologischen Verfahren zum Nachweis einer Infektion des Rindes mit *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) handelt es sich fast ausschließlich um den Nachweis erregerspezifischer Immunglobuline mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISAs). Diese zeichnen sich entweder durch eine niedrige Sensitivität oder eine niedrige Spezifität aus und sind erst bei Rindern über 24 Monaten ausreichend aussagekräftig. Eine mögliche Alternative zu den ELISA-Systemen könnte ein von Eda et al. (2005) entwickeltes, auf der Durchflusszytometrie (DFZM) basierendes Verfahren sein. Als korpuskuläre Testantigene (= Messpartikel) dienen in diesem Verfahren intakte MAP-Bakterien. In tierexperimentellen Versuchen konnten MAP-spezifische Immunglobuline (IgG) mit dieser Methode schon ab dem 170. Tag p. inf. nachgewiesen werden. In einer Feldstudie waren MAP-spezifische Antikörper in Blutproben 6 bis 44 Monate früher zu detektieren als MAP-Keime in Kotproben mit der kulturell-bakteriologischen Untersuchung. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, die von Eda et al. entwickelte Methode zu etablieren und zu verbessern.

Methodik: Zur Evaluierung der DFZM-Methode wurden Serumproben von weiblichen Rindern im Alter von mindestens 2 Jahren verwendet. Die Rinder waren zuvor aufgrund klinischer und labordiagnostischer Untersuchungen als MAP-negativ (n = 22) und MAP-positiv (n = 18) eingestuft worden. MAP-negative Rinder stammten aus Betrieben, in denen es keine Fälle von Paratuberkulose gab und alle Rinder >24 Monate serologisch (Svanovir(r)- und/oder Pourquier(r)-ELISA) und bakteriologisch (PCR, Kultur) negativ reagiert hatten. MAP-positive Tiere stammten aus Paratuberkulose-Problembetrieben und schieden MAP mit dem Kot aus. Von diesen MAP-positiven Tieren hatten im Pourquier(r)-ELISA (Pq) einige Rinder ein positives (MAP-positiv/Pq+"; n = 11) und einige ein negatives Resultat ("MAP-positiv/Pq-"; n = 7) erzielt. Zur Analyse mittels DFZM wurden Serumproben mit intakten Bakterien von M.

phlei oder *M. avium* subsp. *avium* (MAA) präadsorbiert und danach in Parallelansätzen mit intakten MAP- bzw. MAA-Bakterien (Messpartikel) inkubiert. Antikörper, die an die Messpartikel gebunden hatten, wurden mit Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern (anti-Rind-IgG, -IgG1 oder -IgG2) dekoriert und durch die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) eines Messpartikels im Durchflusszytometer quantifiziert. Unterschiedliche Methoden der Titerberechnung wurden untereinander sowie mit den Ergebnissen des Pourquier(r)-ELISAs mittels einer ROC-Kurven Analyse verglichen, wobei Cut-Off Werte definiert wurden, bei denen eine 100 %ige Spezifität erreicht wurde.

Ergebnisse: Die besten Resultate wurden mit der DFZM-Methode erzielt, wenn die Serumproben mit *M. phlei* präadsorbiert, IgG1 gemessen und die Messwerte über die Messdaten der MAA-Ansätze normalisiert wurden. Bei dieser Testversion reagierten die Serumproben von allen MAP-positiven/Pq+ Rindern positiv und diejenigen von negativen Rindern in 21 von 22 Fällen negativ. Die DFZM-Methode erkannte außerdem auch 5 der 7 MAP-positiven/Pq- Rinder als positiv. Betrachtet man die Kotuntersuchung als Goldstandard, so weist die DFZM-Methode nach ROC- Analyse bei einer Spezifität von 100 % eine Sensitivität von 83 % auf, während der Pourquier(r)-ELISA bei einer Spezifität von 100 % eine geringere Sensitivität von 61 % aufweist.

Diskussion: Aufgrund der hohen Sensitivität bei gleichbleibend hoher Spezifität könnte die neue DFZM-Methode geeignet sein, die serologische MAP-Diagnostik entscheidend zu verbessern.

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung gefördert.

### **Poster D 11**

## **Assessment of different strategies to determine MAP-specific cellular immune responses in cattle**

Menge, Ch. (Institute for Molecular Pathogenesis, Friedrich Loeffler Institute, Jena) , Bridger, P. S.; Bulun, H. (Institute for Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus Liebig University, Gießen); Akineden, Ö. (Institute for Food Science, Justus Liebig University, Gießen); Seeger, T. (Clinic for Ruminants and Swine, Justus Liebig University, Gießen); Bannantine, J. P. (National Animal Disease Center, Ames, IA, USA W.R. Waters, National Animal Disease Center, Ames, IA, USA); Davis, W. C. (Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, WA, USA); Bauerfeind, R. (Institute for Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus Liebig University, Gießen)

**Introduction:** Assessment of cellular immunity in cattle against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) by established methods remains unsatisfactory for diagnostic purposes. Recent studies conclude that analysis of T-cell subset responsiveness may improve diagnostic outcome. Aim of this study was to identify T-cell subsets which respond most specifically to MAP antigens.

**Methods:** Peripheral mononuclear cells (PBMC) from 7 MAP-positive and 5 MAP-negative cows (defined by herd status, serology, fecal culture, PCR) aged 2 - 5 years were incubated in medium supplemented with whole cell sonicates (WCS) or purified protein derivatives (PPD) of MAP, *M. avium* ssp. *avium*, and *M. phlei* for up to 6 days. Flow cytometry was used to quantify IFN- $\gamma$  production in CD4+ and CD8+ T-cells and to quantify CD25 and CD26 expression on CD4+ and CD8+ memory T-cells (CD45RO+),  $\gamma\delta$ -T-cells (TcR1-N24+/CD2+/-), and NK-cells (CD335+/CD2+). Different gating strategies were applied to analyze lymphocyte and lymphoblast populations as well as IFN- $\gamma$  and CD markers individually or in combination.

**Results:** WCS preparations induced more specific responses compared to PPD throughout. Compared to MAP-negative animals, CD4+ lymphoblasts from MAP-positive cows responded with a significantly higher IFN- $\gamma$  content after incubation with WCS-MAP. IFN- $\gamma$  production by CD8+ PBMC hardly differed between the groups. CD4+/CD45RO+ PBMC from MAP-positive cows responded to WCS-MAP with a significantly higher expression of CD25 and CD26.  $\gamma\delta$ -T-cells (CD2+/-) from MAP-positive cows reacted similarly with a higher CD25 expression. CD8+ and NK-cells from MAP-positive but not of MAP-negative cows responded with an enhanced CD25 expression independent of the origin of mycobacterial antigen.

Discussion: In conclusion, CD4+ T-cells from MAP-positive cows responded most sensitively and specifically to WCS-MAP with regard to both, IFN- $\gamma$  production and CD25/CD26 expression. Because early stages of MAP-infection are dominated by cellular immunity, quantifying the responsiveness of CD4+ T-cells ex vivo may be a useful approach to improve early MAP-diagnosis in cattle.

This work was supported by funds from the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV) according to the promotion program for innovation.

## **Poster D 12**

### **Paratuberkulose-Frühdagnostik bei Kälbern anhand von Darmlymphknoten-Biopsaten**

Seeger, T.; Petrit, B. (Klinik für Wiederkäuer, Justus-Liebig-Universität Giessen); Fischer, M., Akineden, Ö.; Bülte, M. (Institut für tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Giessen); Doll K. (Klinik für Wiederkäuer, Justus-Liebig-Universität Giessen)

Einleitung: Goldstandard in der Diagnostik von Infektionen mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) bei Rindern ist nach wie vor die kulturelle Untersuchung des Ileocaecallymphknotens. Aus Infektionsversuchen ist bekannt, dass sich MAP hier auch schon bei Kälbern nachweisen lässt, selbst wenn diese den Erreger zu diesem Zeitpunkt noch nicht über den Kot ausscheiden. Ziel der eigenen Studie war daher die Entwicklung eines minimal-invasiven Verfahrens zur Biopsie dieser Lymphknoten beim Kalb. Diese Kälber stammten aus Paratuberkulose-Problembetrieben und deshalb wurden die gewonnenen Biopate zusätzlich molekularbiologisch auf MAP untersucht.

Methodik: Die 15 Versuchskälber der Rasse Deutsche Holsteins waren bei Aufnahme in die Studie 2 Wochen alt. Während der dreiwöchigen Versuchsdauer wurden sie zweimal täglich klinisch untersucht, und es wurden regelmäßig Blutproben entnommen, um die Auswirkungen des Eingriffs auf bestimmte labordiagnostische Parameter beurteilen zu können. Der laparoskopische Eingriff erfolgte am 7. Tag der Studie unter Injektionsnarkose (0,05 mg / kg Detomi-din i. m., 5 Minuten später 6 mg / kg Ketamin i. v.). Nach Ablegen auf die rechte Seite, Vorbereitung des Operationsfeldes und Anlegen eines Pneumoperitoneums wurden durch die drei Inzisionsstellen im Bereich der linken Bauchwand Magnetventiltrokare für das Laparoskop und für die zwei Fasszangen in die Bauchhöhle eingeführt. Zunächst wurde der Blinddarm laparoskopisch identifiziert und so gelagert, dass zunächst der Ileocaecallymphknoten und nachfolgend ein Jejunallymphknoten fixiert und aus beiden ein Biopat entnommen werden konnte. Diese wurden mittels Taqman Real-time-Triplex PCR auf die MAP-spezifischen Genabschnitte ISMav2 und f57 untersucht. Nach Verschluss der Inzisionsstellen mit resorbierbarem Nahtmaterial (Serafit(r)) erhielten die Kälber einmalig ein Antiphlogistikum (Metamizol 20 mg / kg i.v.). Am 14. Tag dem Eingriff wurden die Kälber euthanasiert (T61(r) i.v.). Bei der Sektion wurde auf mögliche Veränderungen im Bereich der Operationswunden und in der Bauchhöhle geachtet. Dieses Versuchsvorhaben wurde durch das

Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Gz: V 54-19 c 20-15 (1) GI 18/15 - Nr. 21/2006).

Ergebnisse: Die Operationsdauer betrug zwischen 18 und 37 Minuten ( $\bar{x}$  = 26 Minuten). Abgesehen von einem Tier, bei dem der Blinddarmlymphknoten laparoskopisch nicht zu identifizieren war, konnte stets ein Biopat aus beiden Lymphknoten gewonnen werden. Bei keinem Kalb kam es Komplikationen, welche eine Therapie erfordert hätten. Bei der Sektion fanden sich in keinem Fall Hinweise auf eine Peritonitis oder auf eine Wundinfektion. Anhand der molekularbiologischen Untersuchungen konnte in den Biopaten von 10 der 15 Kälber (67 %) MAP-Genom nachgewiesen werden. Bei 3 Tieren (20 %) waren beide Lymphknoten positiv, bei 6 Tieren (40 %) nur der Ileocaecallymphknoten und bei 1 Kalb (7 %) nur der Jejunallymphknoten.

Diskussion: Mittels des geschilderten laparoskopischen Verfahrens lassen sich bei jungen Kälbern Darmlymphknoten-Biopate schnell und sicher entnehmen. Obwohl in dieser Pilotstudie alle Kälber aus Paratuberkulose-Problembetrieben stammten, überrascht die hohe MAP-Nachweisrate bei diesen ansonsten klinisch unauffälligen Probanden. Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung finanziell unterstützt.

### ***Poster D 13***

## **Validierung von DNA-Extraktionsverfahren zum molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP) in Milch und Milcherzeugnissen**

Akineden, Ö.; Molitor, A.; Abdulmawjood, A.; Bülte, M.; (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen)

Seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wird in der Fachliteratur immer wieder ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP), dem Erreger der Johne'schen Krankheit oder Paratuberkulose bei Wiederkäuern, und der Ätiologie des beim Menschen vorkommenden Morbus Crohn diskutiert. Insbesondere Milch und Milchprodukte gelten als zentrale Expositionsquelle für den Menschen. Durch ihre Fähigkeit zur Aggregation können MAP-Zellen die für Milch erforderlichen Pasteurisierungsverfahren überleben. In den eigenen Untersuchungen wurden zwei DNA-Extraktionsverfahren (DNeasy Blood & Tissue Mini Kit der Firma Qiagen und High pure PCR temp. Kit der Fa. Roche) sowie ein halbautomatisiertes Verfahren (Maxwell(r) 16 System der Fa. Promega) zur Isolierung von MAP-DNA aus artifiziell kontaminierter Rohmilch vergleichend untersucht. Für die artifizielle Kontamination der Rohmilchproben wurden zwei unterschiedliche MAP-Referenzstämme (ATCC-Nr.BAA-968TM und DSM-Nr.44135) sowie ein MAP-Feldstamm (MAP-423) herangezogen. Der Nachweis und die Bestätigung von MAP-DNA erfolgte unter Verwendung eines TaqMan(r) Real Time-PCR-Assays. Die Ergebnisse der Einmischversuche zeigen, dass die Nachweiswahrscheinlichkeit bei einer Erregerkonzentration von ca. 101 Koloniebildende Einheiten (KbE)/10 ml Rohmilch bei 77,7% und bei ca. 102 KbE/10 ml Rohmilch bei 100% liegt. Damit sind die Voraussetzungen für Untersuchungen zur Prävalenz von MAP in Milch und Milcherzeugnissen gegeben. Die Untersuchungen werden im Rahmen des Zoonose-Forschungsprojekts *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*-von der Johne'schen Krankheit zum Morbus Crohn „ (Förderkennzeichen 01KI 0750; Projektkoordinator: Prof. Dr. R. Goethe, Hannover) vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.

**Poster D 14****Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis metabolome and antigen expression in vivo.**

Weigoldt, M. (Institute for Microbiology, Department of Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine Hannover); Doll, K. (Clinic for Ruminants and Pigs (Internal Medicine and Surgery), Justus-Liebig-University, Giessen); Goethe, R. (Institute for Microbiology, Department of Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine Hannover); Gerlach, G.-F. (Institute for Microbiology, Department of Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine Hannover)

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of Johne's disease in ruminants. There are clinical similarities between Johne's disease (JD) in ruminants and inflammatory bowel disease in humans. The isolation of MAP and the detection of MAP-DNA in intestine from several patients with Crohn's disease (CD) raised the until yet unsolved question about a relevance of MAP in CD. Research in diagnostics and pathology of JD is hampered by lack of MAP specific tools such as antibodies. In the present study, MAP was isolated from the mucosa of four cows with clinical Johne's disease (JD), fractionated into cytoplasm- and membrane fractions and compared to the respective isolates cultured on Middlebrook Medium 7H9 supplemented with OADC and mycobactin. The yield of MAP isolated from mucosa was calculated in relation to the mucosa mass and varied from 1.4 % to 4.4 % in three different cows; in one cow the yield was below 0.5 % and, therefore, not sufficient to study the proteome expressed in vivo. The MAP fractions were subjected to a Tube-Gel trypsin digestion and subsequently investigated by UPLC-ESI Q-TOF-MS/MS (Waters). Additionally, two dimensional gel electrophoresis with differential CyDye labelling was performed for quantification of the in vivo expressed proteins. For the membrane fraction a total of 112 proteins have been detected in in vivo grown MAP, 29 proteins were confirmed as expressed in vivo only. Vice versa a total of 199 proteins were detected in vitro grown MAP from which 116 proteins could not be detected in in vivo grown MAP. Interestingly, the heparin binding hemagglutinin adhesin like protein MAP3968 (HBHA) has been reported as in vivo expressed in *M. tuberculosis* and *M. leprae* was detected as in vivo expressed in MAP by a two peptide hit in two of the three cows by MS/MS and 2D DIGE. HBHA has been shown to be highly antigenic and has been implicated in bacterial adherence to epithelial cells and systemic dissemination. Furthermore, the hypothetical protein MAP1775 was detected only in vivo in two cows. The gene MAP1775 is located between separate operons and encodes a putative

member of the DoxX subfamily with a predicted hydrophobic membrane spanning region. In conclusion our data indicate that our method is suitable to determine in vivo expressed MAP-proteins. Further studies are necessary to analyse their diagnostic potential in JD and CD.

**Poster D 15****Evaluation of Matrix-Assisted Laser - Desorption/Ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry for rapid identification of Salmonella isolates**

Dieckmann, R.; Helmuth, R.; Malorny, B. (Federal Institute for Risk Assessment (BfR))

"Whole-Cell"- MALDI-TOF mass spectrometry allows rapid and cost-effective identification of bacterial species. By using small amounts of a bacterial colony a characteristic protein "fingerprint-" pattern is generated and compared to a database of reference spectra. The method is characterized by short sample preparation and analysis times and automation capabilities. While the method is largely established for identification on species level, few studies deal with MALDI-TOF MS-based typing below the species level. Traditional methods based on biochemical methods or phenotypic characterization of Salmonella strains such as serotyping are often time-consuming, cost-intensive and only available in small number of specialized laboratories. We therefore aimed to develop a rapid MALDI-TOF MS - based typing method for Salmonella identification. In a comprehensive study over 600 Salmonella - strains representing Salmonella enterica subsp. enterica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) and indica (VI) and Salmonella bongori and belonging to 71 most important serotypes were analyzed for phylogenetic classification based on whole-cell MALDI-TOF mass-spectrometric bacterial typing. Genus-, species-, subspecies- and serovar-identifying biomarker ions were identified and assigned to multiple housekeeping-proteins on the basis of available genome sequence data. A detailed comparative analysis of the biomarker profiles of Salmonella strains revealed sequence variations corresponding to single or multiple amino acid changes in highly abundant and highly basic, mainly ribosomal or nucleic acid binding proteins. The study demonstrates that the established protocol can be a rapid means for the pre-screening of S. enterica isolates to identify Salmonella species, subspecies and several prevalent serovars thereby reducing sample numbers that have to be subsequently analysed using conventional techniques.

### **Poster D 16**

## **Intrapulmonale Inokulation von Kälbern mit *Chlamydophila psittaci* (Cp. psittaci): Einfluss der Infektionsdosis auf die Lungenveränderungen**

Lambertz, J.; Sattler, S.; Reinhold, P.; Ostermann, Berndt, A.; C.; Sachse, K.; Schubert, E.; Liebler-Tenorio, E. M. (Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut, Standort Jena)

Das obligat intrazelluläre Bakterium *Chlamydophila* (Cp.) *psittaci* führt bei Psittaciden und anderen Vögeln zu schweren Erkrankungen und ist zugleich ein wichtiger Zoonoseerreger für den Menschen, bei dem unspezifische, grippeähnliche Symptome, aber auch Pneumonien, Endokarditiden oder Enzephalitiden auftreten können. Häufig wird in Rinderbeständen neben wirtsadaptierten Chlamydienspezies, wie *C. pecorum*, auch *Cp. psittaci* nachgewiesen. Hierbei ist nicht bekannt, ob eine Übertragung auf den Menschen stattfinden und zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen kann. Zur Etablierung eines respiratorischen Infektionsmodell beim Kalb mit *Cp. psittaci* wurde zunächst untersucht, ob sich durch experimentelle Inokulation Lungenläsionen induzieren lassen, und welche Auswirkungen unterschiedliche Infektionsdosen auf die Lungenveränderungen haben. Hierzu wurden jeweils zwei Kälber (sechs Wochen alte, männliche Holstein Friesian-Kälber) intrabronchial mit 106, 107, 108 oder 109 inclusion-forming-units (ifu) eines bovinen Stammes von *Cp. psittaci* (Stamm DC15) in 6ml SPGA-Medium inokuliert. Das Inokulum wurde unter Vollnarkose mittels Bronchoskop an acht definierten Lungenlokalisationen verabreicht. Vier Kälber dienten als Negativkontrollen und erhielten SPGA-Medium versetzt mit Tinte. Drei Tage nach der Inokulation wurden die Tiere euthanasiert und sezziert. Die Lungen wurden entnommen und Verteilung, Ausdehnung und Art der Läsionen dokumentiert. Für histologische und immunhistologische Untersuchungen wurden 1 bis 2 Proben pro Lungenlappen unter besonderer Berücksichtigung veränderter Bereiche entnommen. Die Veränderungen wurden in H&E gefärbten Paraffinschnitten beurteilt. Die Lokalisation der Erreger im Gewebe wurde mit einem anti-ChlamydienLPS-Antikörper (AC1, Progen) dargestellt. Lungenveränderungen waren bei allen Kälbern, die *Cp. psittaci* erhalten hatten, nicht jedoch bei den Kontrolltieren zu finden. Die Verteilung der Lungenläsionen entsprach den Applikationsstellen des Inokulums. Es war eine dosisabhängige Zunahme des betroffenen Lungengewebes zu beobachten. Bei Kälbern, die 106 und 107 ifu erhalten hatten, waren 2,4 - 7,6%, bei Kälbern, die 108 ifu

erhalten hatten, waren 15-17% und bei Kälbern, die 109 ifu erhalten hatten, waren 35-38% des Lungengewebes entzündlich verändert. Histologisch war teils eine purulente, teils eine fibrinöse Bronchopneumonie mit Nekrosen zu finden. Mit steigender Dosis war eine Verschiebung von purulenten hin zu fibrinös-nekrotisierenden Veränderungen zu beobachten. Immunhistologisch ließen sich Chlamydien bei allen infizierten Kälbern in den Lungenbereichen mit Pneumonie vorwiegend in Alveolarmakrophagen nachweisen. Ihre Zahl war in nekrotisch verändertem Lungewebe besonders hoch. Der Erregernachweis wurde in ausgewählten Lokalisationen mittels PCR bestätigt. Diese Befunde zeigen, dass sich durch intrapulmonale Inokulation von Kälbern mit *Cp. psittaci* Lungenläsionen induzieren lassen. Ausdehnung und Entzündungsform sind abhängig von der Infektionsdosis.

## ***Poster D 17***

### **Persistent chlamydiae: approaches to antibiotic treatment**

Wolf, K.; Rödel, J.; Straube, E. (Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Universitätsklinikum Jena)

Introduction: *Chlamydomphila abortus* and *Cp. psittaci* can cause severe diseases in their respective hosts. *Cp. abortus* infection can lead to abortion in ruminants and in pregnant women due to zoonotic transmission. *Cp. psittaci* is known as a pathogen of birds and mammals that can also be transmitted to humans and causes ornithosis, an atypical pneumonia. Chlamydiae cause acute but also chronic diseases. An acute infection is normally treated with doxycycline, macrolides, and quinolones. However subinhibitory concentrations of these antimicrobials can lead to a persistent state of the chlamydiae within the host cell. Intracellular persistence of chlamydial organisms is often related to chronic infection in that antibiotic therapy may fail. The aim of this project is to establish an *in vitro* persistence model of *Cp. psittaci* and *Cp. abortus* and to examine the effects of different antimicrobials on persistent chlamydiae by using real-time PCR assays.

Methods: The determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal chlamydicidal concentration (MCC) for several antimicrobials against *Cp. abortus* and *Cp. psittaci* was carried out in the human epithelial cell line A549. Real-time RT-PCR assays were used that target differentially regulated chlamydial genes to monitor transcriptional changes in replicative and persistent chlamydiae.

Results: The MICs and MCCs for macrolides and doxycycline were in the range between 0,016 and 0,08 µg/ ml for both chlamydial species. Establishment of persistent infection in A549 cells was done by using IFN-γ treatment. For *Cp. psittaci* a 24 h pre-incubation of the cells with 200 units of IFN-γ/ ml was necessary. An almost 95% reduced production of new infectious chlamydiae could be observed. To establish real-time RT-PCR protocols that can be used to monitor the efficacy of antibiotic treatment on persistent infections, several chlamydial genes that are known to be differentially regulated during the replication cycle (e. g. *pyk*, *ompA*, *rpoN*, *ftsW*, *groEL-1*, and a homologue of *cpaf*) were chosen. Plasmid standard solutions were generated for each gene and the sensitivity of the PCRs was validated. In the model of replicative infection chlamydial gene expression was found to be downregulated under antibiotic treatment in correlation to the results of MCC assays. It could

also be shown that antibiotics decrease chlamydial gene expression in the model of persistent infection when the antimicrobials were added within 6 h after infection of the cells. However, when the antibiotics were applied at later time points, the expression of some genes remained unchanged and groEL-1 (hsp60 gene) was upregulated.

Conclusions: During the persistent state chlamydiae produce only few infectious elementary bodies but maintain their viability for a prolonged time. Therefore, classical MCC assays cannot be used to evaluate the efficacy of antibiotics against persistent chlamydial forms. In this study real-time PCR assays were established to monitor the effects of several antibiotics against persistent *Cp. abortus* and *Cp. psittaci* infection. Our findings indicate that the response of persistent chlamydiae to an antibiotic monotherapy is limited. In next experiments combination of antichlamydial substances will be evaluated.

***Poster D 18***

**A new Real-Time PCR-based system for the detection of cattle brucellosis and differentiation of vaccinal strains**

Kaiser, M. (Universität Leipzig); Mancilla, M. (Universidad Austral de Chile)

Brucellosis is one of the major zoonosis worldwide. In Chile, cattle brucellosis is found affecting up to 5 % of cattle herds and it is spread out in several geographic regions. Despite of the vaccination with RB51 strain that has allowed the decreasing of the disease prevalence, brucellosis outbreaks are sporadically reported. Moreover, because it does not exist a safe vaccinal product against brucellosis, sometimes such outbreaks may occur by inadequate use of the currently vaccine. Diagnostic with conventional techniques (biochemical and serological typing) claims for skilled technicians and biosafety rooms into diagnostics labs. In addition, differentiation at species level or between field and vaccine strains is a laborious task and takes several days to accomplish. Alternatively, molecular methods have shown to be faster and more accurate to carry out the detection and typing of *Brucella* microorganisms. Nevertheless, a PCR method capable to identify and differentiate between field and vaccine strains from biological samples has not been reported. Here, we describe a simple PCR method based on the detection of a new locus, BruAb\_D1. We demonstrate by conventional PCR and sequence analysis that the locus presents a deletion in vaccinal strains. In addition, using a Real-Time PCR format, we have been able to detect the pathogen DNA directly from biological samples. We think that the method might be an alternative to the traditional techniques and can be used as a complement of the diagnostic repertoire in countries where eradication campaigns are taking place.

**Poster D 19**

**Recombinant antigens of *Toxoplasma gondii* as diagnostic markers for human infection and potential means for risk assessment of slaughter animals**

Hruzik, A.; Bohne, W. (University Medical Center Göttingen); Spekker, K.; Däubener, W. (Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Medical Microbiology, Düsseldorf); Koethe, M. (University of Leipzig, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Food Hygiene, Leipzig); Straubinger, R. (Ludwig-Maximilians-Universität München, Faculty of Veterinary Medicine, Section for Bacteriology and Mykology); Pleyer, U. (Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, Dept. Ophthalmology); Groß, U. (University Medical Center Göttingen, Medical Microbiology, Göttingen)

**Introduction:** One of the worldwide most successfully parasite is *Toxoplasma gondii*, the agent of toxoplasmosis. This protozoan infects cats as primary hosts but can also infect other mammals and birds. In these alternate hosts, rapidly replicating tachyzoites are predominately found during the acute stage while cysts containing bradyzoites prevail during the latent stage of infection. Both, tachyzoites and bradyzoites, are known to express stage-specific antigens.

**Methods:** Some of these together with non-stage-specific parasite antigens were recombinantly expressed in *E. coli*. Altogether, we evaluated eight different antigens separately in an immunoblot assay using defined serum pools of patients with acute or latent infection or without infection regarding their diagnostic performance by detection of *T. gondii*-specific IgA, IgM and IgG antibodies. For simultaneous testing of all antigens, we established a lineblot assay. This technique is a useful tool for diagnostic purposes and may also supply relevant information on different clinical manifestations of *T. gondii* infection. Therefore, we analyzed human serum samples with known ocular toxoplasmosis, one serious clinical complication of either prenatal or postnatal infection. In addition, the recombinant antigens were also tested on turkeys that were experimentally infected either with oocysts or tachyzoites of *T. gondii*.

**Results:** Preliminary results indicate that the recombinant antigens BAG1, GRA6, GRA7, GRA9 and MIC5 seem to be qualified markers for diagnosis of acute and latent toxoplasmosis. The recombinant antigens demonstrated an antigen-specific reactivity with serum samples of patients who suffered from ocular toxoplasmosis. In addition to diagnosis of human toxoplasmosis, the recombinant antigens may also be useful as markers for surveillance of slaughter animals. Using sequentially drawn serum samples of oocysts-infected versus tachyzoites-infected turkeys,

the titer kinetics of the respective animals showed antigen-specific differences that may allow drawing a conclusion of the way of infection.

Discussion: Recombinant antigens of *T. gondii* seem to be a valuable tool for improving diagnosis of human toxoplasmosis. In addition, they might serve to evaluate the parasite stage of infection in slaughter animals. Whether or not such an approach might be useful for risk assessment of animal meat production awaits further investigations.

(This project is part of ToxoNet01, which is being supported by a grant from the BMBF)

**Poster D 20****Entwicklung und Optimierung eines Tests für die Serotypisierung von *Toxoplasma gondii*-Infektionen bei Hühner und Puten mittels Peptid-Mikroarray**

Maksimov, P.; Basso, W. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie); Zerweck, J.; Schutkowski, M. (JPT Peptide Technologies GmbH), Beckert, A. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie); Bangoura, B. (Institut für Parasitologie, Tierärztliche Fakultät, Universität Leipzig); Conraths, F. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie); Schares, G. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit)

Einleitung: *Toxoplasma gondii* ist ein Protozoon, das schwerwiegende Erkrankungen bei pränatal infizierten Kindern und immunsupprimierten Patienten verursachen kann. Die *T. gondii*-Populationen in Europa und Nord-Amerika bestehen überwiegend aus 3 klonalen Linien, den Typen I, II, und III. Die Mehrzahl der *T. gondii*-Stämme, die in Europa und Nord-Amerika im Zusammenhang mit einer Toxoplasmose beim Menschen isoliert wurden, ist dem klonalen Typ II zuzuordnen. Allerdings sind Typ-I-Stämme, die in der Natur nur selten beobachtet werden, beim Menschen relativ häufig an Toxoplasmosen beteiligt. In Deutschland gibt es kaum Informationen über die Verbreitung bestimmter klonaler Typen. Ziel unserer Studie war es, einen serologischen Test zu entwickeln, über den auf den klonalen *T. gondii*-Typen geschlossen werden kann, mit dem ein Tier oder ein Mensch infiziert ist. Da im Freiland gehaltene Hühner und Puten gute Indikatoren für die Verbreitung von *T. gondii* in der Umwelt sind, haben wir in einem ersten Schritt einen Peptid-Mikroarray-Test für die Serotypisierung von *T. gondii*-Infektionen in diesen Tierarten entwickelt und optimiert.

Methodik: Die serologische Ermittlung des klonalen Typs, mit dem ein Tier oder Mensch infiziert ist, basiert auf dem Nachweis von Antikörperreaktionen gegen Epitope, die für die klonalen Typen I, II oder III spezifisch sind. Dazu werden Epitop-tragende Peptide synthetisiert, auf Mikroarray-Slides aufgetragen und diese anschließend in einem ELISA-ähnlichen System eingesetzt. Die Peptid-Mikroarrays ermöglichten es, im Mikrotiterformat, d.h. mit wenigen Mikrolitern Serum bis zu 50 Peptide gleichzeitig auf ihre Eignung zur Typisierung zu untersuchen. Insgesamt wurden 107 Peptide untersucht. Die Sequenzen von 60 dieser Peptide waren der Literatur entnommen (Kong et al., 2003, Journal of Infectious Diseases, 187, 1484-95); 47 weitere Peptide, die auf den

Aminosäuresequenzen der *T. gondii*-Proteine GRA5, GRA6, GRA7, SAG2A basierten, wurden von uns neu entwickelt. Für die Herstellung Genotyp-spezifischer Referenzseren wurden experimentelle Infektionen von Puten und Hühnern mit *T. gondii*-Tachyzoiten verschiedener Typ-I-, -II- oder -III-Stämme (Typ I: RH, Typ II: Me49, Typ III: NED) durchgeführt. Seren dieser Tiere, die vor der Infektion sowie 2, 5 und 9 Wochen nach der Infektion gewonnen worden waren, wurden zur Entwicklung und Optimierung der Mikroarray-Tests eingesetzt.

Ergebnis: Die Seren experimentell infizierter Tiere reagierten im Mikroarray mit Gruppen von Peptiden, die für bestimmte klonale Typen spezifisch sind. Für Hühner und Puten konnten 25 Peptide identifiziert werden, die eine Unterscheidung der Infektion mit dem klonalen Typen II von Infektionen anderer klonaler Typen ermöglichten. Einzelne Peptide wurden durch Seren von Hühnern und Puten erkannt, unabhängig davon, mit welchem klonalen Typ die Tiere infiziert waren. Wir beobachteten, dass nur Seren mit einem *T. gondii*-Immunfluoreszenztiter von über 200 positive Signale mit Typ-spezifischen Peptiden zeigten.

Diskussion: Peptid-Mikroarrays können eingesetzt werden, um *T. gondii*-Infektionen mit Typ II von Infektionen mit Typ I oder Typ III zu unterscheiden. Peptid-Mikroarrays werden nun verwendet, um *T. gondii*-positive Feldseren von Hühnern und Puten aus epidemiologischen Studien zu typisieren. Peptid-Mikroarrays bilden eine gute Grundlage, um weitere spezifische Peptide zu identifizieren und in zukünftigen Tests einzugliedern. Diese Studie wurde im Rahmen eines Zoonoseverbundprojekts vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert (Toxonet 01, Teilprojekt 6, 01KI0765).

## **Poster D 21**

### **Potentielle Verbrauchergefährdung durch Toxoplasma gondii-Zysten in infizierten Puten**

Bangoura, B.; Zöller, B. (Institut für Parasitologie Universität Leipzig); Koethe, M. (Institut für Immunologie, Universität Leipzig); Pott, S.; Ludewig, M. (Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig); Fehlhaber, K. (Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig); Straubinger, R. K. (Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, Ludwig-Maximilians-Universität München); Dauschies, A. (Institut für Parasitologie, Universität Leipzig)

Einleitung: *Toxoplasma gondii* ist ein häufiger zoonotischer protozoärer Erreger. *T. gondii*-zystenhaltiges Fleisch ist eine häufige Infektionsquelle für den Menschen, wobei in verschiedenen europäischen Ländern nicht oder nicht ausreichend thermisch behandeltes Fleisch als Ursache von durchschnittlich 30-63% der Infektionen ermittelt wurde (Cook et al. 2000). Zur Bedeutung der Pute als Wirtstier und damit potentielle Infektionsquelle für den Menschen ist bisher wenig bekannt. Methodik: Es wurden bis dato 50 Puten (Rasse Big-6) mit verschiedenen Infektionsdosen, Stämmen und über unterschiedliche Infektionswege infiziert. Die Typ II-Stämme ME49, DX und ein Feldstamm (VUW, Prof. Joachim, Wien) wurden verwendet, wobei alle im Oozystenstadium (orale Infektion) und ME49 zusätzlich im Tachyzoitenstadium (parenterale Infektion: intravenös, intramuskulär oder beides kombiniert) eingesetzt wurden. Die Infektionsdosen variierten zwischen 50.000 und 500.000 Oozysten bzw. zwischen 1 Mio. und 30 Mio. Tachyzoiten. Die Puten wurden zudem entweder zu einem früheren Zeitpunkt nach der Infektion (ca. 6 - 8 Wochen p.i.) oder zu einem späteren (ca. 10 - 12 Wochen p.i.) getötet. Diese Variation diverser Parameter sollte ihren Einfluss auf die Erregerhaltigkeit der verschiedenen Organe infizierter Puten klären. Von jedem Tier wurden 14 verschiedene Organe getrennt entnommen und homogenisiert. Gewebeprobe, darunter die essbaren Gewebe (Brust-, Oberschenkel- und Unterschenkelmuskulatur, Herz und Leber), wurden mittels nested PCR auf Erregerpräsenz untersucht. Anfänglich wurden parallel zur Probenentnahme für die PCR-Untersuchung Quetschpräparate angefertigt, um lichtmikroskopisch ggf. die Anwesenheit von Zysten verifizieren zu können.

Ergebnisse: Mittels der nested PCR wurde ein *T. gondii*-Befall in Organen künstlich infizierter Puten nachgewiesen. In den untersuchten Quetschpräparaten konnten bei drei Brustmuskel- bzw. Leberproben, welche sich mittels PCR als *T. gondii*-positiv erwiesen, lichtmikroskopisch Zysten dargestellt werden (proof of principle). Die mittlere Nachweisrate

von *T. gondii* über alle untersuchten Organproben aller infizierten Puten lag bei 12,9 %. Die essbaren Gewebe wiesen mit 19,1 % eine höhere mittlere Befallsrate auf. Herz, Muskulatur und Leber waren in vergleichbarer Häufigkeit betroffen. Der *T. gondii*-Befall essbarer Gewebe war in den früh nach der Infektion untersuchten Versuchstieren mit 27,0% im Durchschnitt höher als in den später untersuchten Tieren mit 12,4%. Nach Infektion mit Tachyzoiten wiesen die untersuchten Puten mit 20,0% einen höheren Anteil positiver essbarer Organproben auf als nach einer Infektion mit Oozysten (6,7%).

Diskussion: Puten sind empfängliche Wirte für *T. gondii*. Darüber hinaus wird aufgrund der vorliegenden Untersuchungen angenommen, dass der Infektionsmodus und der Zeitpunkt nach der Infektion Einfluss auf die Befallsrate haben. Insbesondere angesichts der in dieser Studie beobachteten scheinbaren Affinität der Toxoplasmen zu essbaren Organen ist eine Verbrauchergefährdung durch *T. gondii*-haltiges Putenfleisch und nicht ausreichend thermisch behandelte Putenfleischprodukte (z. B. Rohwürste, Putenschinken) nicht auszuschließen. Der beobachtete höhere Anteil an *T. gondii*-positiv befundenen Organen zu einem früheren Zeitpunkt nach der Infektion könnte auf einen Abbau der Erregerstadien der Pute hindeuten, was aber aus den bisher vorliegenden Daten nicht abschließend gefolgert werden kann. Die Untersuchungen zur Putentoxoplasmose sind Teil des Zoonosenverbundprojektes Toxonet01.

Literatur: 1. Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Fuolon W, Semprini, AE, Dunn DT (2000): Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ* 321: 142-7.

**Poster D 22**

**Validierung und Standardisierung diagnostischer Methoden für Untersuchungen zur relativen Bedeutung von *Toxoplasma gondii* bei Hühnern**

Tenter, A. M.; Buschtöns, S. (Institut für Parasitologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover); Rautenschlein, S. (Klinik für Geflügel, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover); Spekker, K.; Däubener, W. (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Einleitung: Zur Erhebung repräsentativer epidemiologischer Daten über Infektionen mit *Toxoplasma gondii* bei Nutztieren werden validierte und standardisierte diagnostische Methoden benötigt, die für den Einsatz in Monitoring- und Surveillanceprogrammen geeignet sind. Für den Nachweis von Antikörpern gegen *T. gondii* beim Huhn wird zurzeit fast ausschließlich ein modifizierter Agglutinationstest (MAT) verwendet. Allerdings wurde dieser Test noch nicht mit definierten Seren von Hühnern validiert. Darüber hinaus ist der MAT zwar einfach in der Handhabung, eignet sich jedoch nicht für die Untersuchung großer Probenmengen oder den Einsatz in automatisierten Systemen, da die Auswertung als subjektive Ablesung erfolgt und keine objektiven Messwerte als Ergebnis erhalten werden. Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung, Validierung und Standardisierung eines automatisierbaren sensitiven und spezifischen diagnostischen Tests für *T. gondii*, der für ein Massenscreening bei Hühnern geeignet ist.

Methodik: Da über den Verlauf einer *T.-gondii*-Infektion beim Huhn wenig bekannt ist, wurden in einem Vorversuch jeweils vier Hühnern im Alter von 7 Wochen 103, 104, 105 oder 106 sporulierte Oozysten (DX-Stamm) oral inokuliert. Dabei erfolgte bei allen Tieren eine Serokonversion im MAT. Bei keinem Tier zeigten sich klinische Symptome einer Toxoplasmose. Daher wurden im anschließenden Hauptversuch jeweils vier Hühnern 101, 102, 103, 104, 106 oder 107 sowie zur Gewinnung einer größeren Menge Serum 21 Tieren 105 sporulierte Oozysten pro Tier oral inokuliert. Von allen Hühnern wurden Serumproben bis zum 35. Tag p. i. zweimal wöchentlich, danach wöchentlich bis zur Schlachtung (85 Tage p. i.) gewonnen. Insgesamt wurden so 1064 Serumproben erhalten, die jedoch teilweise nur in geringen Volumina ( $\geq 150 \mu\text{l}$ ) vorliegen. Daher werden für die Validierung der verschiedenen Antigene zunächst gruppenspezifische Mischseren verwendet. Erst danach erfolgt die Testentwicklung, Optimierung und Standardisierung mit Hilfe eines Panels ausgewählter Einzeleren.

Ergebnisse: Bei der Untersuchung der Serumproben experimentell infizierter Hühner im MAT mit kommerziell verfügbarem Antigen erhielten wir zunächst gute Ergebnisse. Zwar kam es nur bei zwei von vier Hühnern, denen 101 oder 102 Oozysten inokuliert wurden, zu einer Serokonversion, ab einer Infektionsdosis von 103 Oozysten pro Tier serokonvertierten jedoch alle Tiere zwischen dem 7. und 14. Tag p. i. Schwierigkeiten ergaben sich bei der Untersuchung von Feldseren, die teilweise stark hämolytisch und bakteriell kontaminiert waren. So konnte das Testergebnis bei vielen Seren nicht abgelesen werden. Der Schwerpunkt dieses Projektes liegt daher zurzeit auf der Entwicklung und Standardisierung eines automatisierbaren Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), der für die Untersuchung von Hühnerseren auf Antikörper gegen *T. gondii* geeignet ist. Dabei werden verschiedene ELISA-Formate unter Verwendung traditioneller und rekombinanter Antigene von *T. gondii* (GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA7, GRA9, MIC3, MIC5, ROP4, SAG1) validiert. Nach den bisherigen Ergebnissen zeigt ein auf laboreigenem Tachyzoitenlysat des *T.-gondii*-RH-Stamms basierender indirekter ELISA eine gute Differenzierung zwischen positiven und negativen Referenzseren. Dieser Test ist automatisierbar und wird zurzeit in dieser Hinsicht optimiert.

Diskussion: Der hier entwickelte automatisierbare diagnostische Test hat eine große Bedeutung für die Erhebung epidemiologischer Daten über *T.-gondii*-Infektionen bei Hühnern in Monitoring- und Surveillanceprogrammen sowie für Bestandsuntersuchungen bei der in Deutschland gehaltenen Hühnerpopulation.

Diese Studie wird im Rahmen des Zoonosenverbundprojektes TOXONET01 durchgeführt und wird vom BMBF gefördert (Kennzeichen 01KI0763).

**Poster D 23**

**Validierung und Standardisierung diagnostischer Methoden für Untersuchungen zur relativen Bedeutung von *Toxoplasma gondii* bei Schweinen**

Tenter, A. M.; Görlich, K. (Institut für Parasitologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover); Nagel-Kohl, U. (Veterinärinstitut Hannover, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit); Spekker, K.; Däubener, W. (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Einleitung: In der Zoonosenüberwachungsrichtlinie 2003/99/EG ist die Toxoplasmose als eine Zoonose eingestuft, die in den Mitgliedsländern der EU je nach der epidemiologischen Situation überwacht werden sollte. Eine Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit eines standardisierten diagnostischen Testsystems zur Erhebung repräsentativer und vergleichbarer Daten über Infektionen mit *Toxoplasma gondii* bei Lebensmittel liefernden Tieren. Ein Expertengremium der European Food Safety Authority kam jedoch zu der Schlussfolgerung, dass derzeit in vielen Bereichen keine Referenzproben verfügbar sind, mit denen diagnostische Methoden für *T. gondii* validiert und standardisiert werden können (EFSA 2007). Dies gilt besonders für den veterinärmedizinischen Bereich. Ziele dieses Projektes sind die Gewinnung definierter Proben von Schweinen und die Entwicklung eines standardisierten und automatisierten Testsystems für *T. gondii*, das für serologische Monitoring- und Surveillance-Programme geeignet ist.

Methodik: Zur Gewinnung homologer Referenzproben (Serum oder Plasma) wurden 16 Schweinen im Alter von 7-9 Wochen sporulierte Oozysten des DX-Stamms von *T. gondii* oral inokuliert. Um Informationen über die messbare Antikörperdynamik in verschiedenen Testsystemen zu erhalten, wurden die Infektionsdosen im Bereich 103-106 variiert und Verlaufsblutproben wie folgt gewonnen: zweimal wöchentlich bis zur 6. Woche p. i.; einmal wöchentlich im Zeitraum 7-9 Wochen p. i.; danach alle 2 Wochen bis zur Schlachtung (14 oder 16 Wochen p. i.). Insgesamt wurden so 300 Serumproben gewonnen, die für die Validierung und Standardisierung der diagnostischen Tests zur Verfügung stehen. Da in der im Rahmen des Zoonosenverbundprojektes TOXONET01 durchgeführten Feldstudie bei Schweinen in Niedersachsen Plasmaproben gesammelt wurden, wurden außerdem von acht der experimentell infizierten Schweine 156 gepaarte Serum- und Plasmaproben gewonnen, mit denen eine potenzielle Variation zwischen den im Serum oder Plasma

messbaren Antikörperspiegeln untersucht werden kann. Um eine Nachhaltigkeit und breite Verfügbarkeit des optimierten Testsystems zu ermöglichen, werden zunächst Antigene validiert, die kommerziell verfügbar sind. Darüber hinaus erfolgt eine Validierung der im Rahmen des Zoonosenverbundprojektes TOXONET01 verfügbaren rekombinanten Antigene (MIC5, GRA1, GRA2, GRA4, GRA6, GRA7, GRA9) hinsichtlich ihres diagnostischen Potenzials.

Ergebnisse: Eine hohe Sensitivität und Spezifität hat ein indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), der auf kommerziell verfügbarem, nativem SAG1-Antigen von *T. gondii* basiert. Bei der Untersuchung der Serum- und Plasmaproben experimentell infizierter Schweine erfolgte die Serokonversion in Abhängigkeit von der Infektionsdosis zwischen dem 7. und 14. Tag p. i. (103 bzw. 106 Oozysten per os). Mit heterologen Seren (*Isospora suis*, *Trichinella spiralis*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp.) traten keine Kreuzreaktionen auf. Dieser Test wurde für den Einsatz in einem automatisierten System adaptiert und optimiert, wobei eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht wurde.

Diskussion: Mit dem auf kommerziell verfügbarem, nativem SAG1-Antigen von *T. gondii* basierenden, mit definierten Seren validierten indirekten ELISA steht erstmals ein automatisierter Test für ein Massenscreening von Schweinen auf Antikörper gegen *T. gondii* zur Verfügung. Zurzeit werden mit diesem Test ca. 15000 Plasmaproben aus der niedersächsischen Schweinepopulation untersucht, wobei zusätzliche Testparameter erhoben werden.

Diese Studie wird im Rahmen des Zoonosenverbundprojektes TOXONET01 durchgeführt und wird vom BMBF gefördert (Kennzeichen 01KI0763).

EFSA (2007): Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals. The EFSA Journal 583, 1-64.

**Poster: Epidemiologie und Surveillance**

***Poster E 1***

**Assessment of the protection potential of barrier systems in poultry free-range husbandry**

Fischer, J. (Institut für Biologische Sicherheit GmbH); Kekulé, A. (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

The appearance of highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses in Europe is an immense problem for poultry farms with free-range husbandry. Since it is known that some wild bird populations are infected and serve as vectors for virus transmission, research is focused on elucidation of potential infection pathways and vaccination of livestock. If vaccination really offers useful protection, however, is still to be determined. A possible alternative to vaccination is a barrier system preventing poultry against avian influenza infections via indirect (feed, water) and direct contact with wild bird. The aim of this project is the development of a barrier system for free-range husbandry. The new mechanic barrier system should avert infections by direct contact of wild birds and their excretions. The protection effect of the barrier system is assessed by laboratory experiments, challenge tests and examinations under free-range conditions. Sentinel flocks with specific pathogen-free (SPF) chicken are kept at five locations in enclosures with or without a barrier system. Special hygiene and security measures are in place to prevent contamination by feed, water and staff. In regular intervals, serum and swab probes from pharynx and cloacae are taken. The specimens are serologically examined (ELISA, AGP) and detection of viral nucleic acid (real time PCR) is performed. As markers for direct contact with infected wild animals, a number of commonly occurring viruses with relative low pathogenicity is investigated, e.g. LPAI, avian paramyxovirus, Marek's Disease virus and infectious bronchitis virus. Additionally, the animals are regularly inspected by veterinarians for signs of infectious diseases.

## Poster E 2

### **Different susceptibility of tracheal organ cultures from Pekin duck, turkey and homing pigeon to H9N2 avian influenza virus may shed light on the role of these bird species in virus transmission and evolution**

Rautenschlein, S.; Petersen, H. (Clinic for Poultry, University of Veterinary Medicine Hannover); Matrosovich, M. N. (Institute of Virology, Philipps University, Marburg); Pleschka, S. (Institute of Medical Virology, Justus-Liebig-University Giessen)

The ability of avian influenza viruses (AIV) to cross species barriers between birds and from birds to mammals and increase their virulence for a new host is of great concern. However, little is known about the potential of low pathogenic AIV (LPAIV) to transmit and adapt to various avian species. This is of great importance as highly pathogenic AIV (HPAIV) can evolve by mutation from LPAIV. Turkeys are known to be highly susceptible to LPAIV-induced clinical disease. Although several AIV-infection studies had been conducted with pigeons, their epidemiological role is still unclear. Surveillance studies revealed that pigeons may sporadically carry LPAIV of different subtypes. Nevertheless, it is highly important to understand the role of pigeons in the distribution of AIV. Our objectives were to compare the AIV-susceptibility, the potential adaptation, and virus replication in different bird species. These results were expected to help estimating the potential risk of these species in virus distribution and evolution during field outbreaks. Tracheal organ cultures (TOC) were prepared from the highly susceptible turkey, and from the less susceptible Pekin duck and homing pigeon. A LPAIV H9N2 field isolate (A/chicken/Saudi Arabia/CP7/1998) was used to conduct three to four consecutive TOC passages. The virus replication rate, cilia activity and adaptive mutations in AIV proteins were investigated. A significant increase in AIV replication and in the induction of ciliostasis was observed in TOC of turkey and Pekin duck origin after three passages. The adaptation of the virus to turkey TOC was faster than to TOC of Pekin ducks and homing pigeons. Interestingly, the virus did infect TOC of homing pigeon. While the replication rate was very low in the first passage in TOC of homing pigeons, it increased in the second and third passage up to levels comparable to TOC of ducks but not of turkeys. In contrast to TOC of turkey and duck, the H9N2 LPAIV did not induce ciliostasis in TOC of homing pigeon. In comparison to the original isolate, several mutations were found in the viral genome after consecutive

passages in TOC of the tested bird species. Amino acid substitutions were detected in the HA near the receptor binding site after adaptation of the LPAIV to TOC of turkey and Pekin duck, and in the region of the cleavage site after adaptation to TOC of homing pigeon. Mutations were detected in the PB2 after adaptation to TOC of all tested species, and in the NS1 protein after consecutive passages in TOC of homing pigeon. These data indicate that the H9N2 LPAIV tested in this study can readily adapt to replicate in the cells of the upper respiratory tract of birds and that patterns of adaptation varied significantly between turkeys, Peking ducks and homing pigeons. Mutations in the HA appear to play a major role in the adaptation. Interestingly, mutations in the HA receptor-binding site, which were detected after three passages in turkey TOC, seem to switch the viral receptor-binding specificity towards recognition of human-type receptors. This finding suggests an important epidemiological role of turkey in AIV outbreaks.

**Poster E 3**

**Avian influenza viruses use different receptors for infection of the respiratory epithelium in different avian host species**

Herrler, G.; Bohm, M.; Winter, Ch., Diederichs, M.; Schwegmann-Weßels, Ch.  
(Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover)

The influenza viral hemagglutinin binding to cell surface receptors containing sialic acid as a crucial determinant initiates virus entry into the host cell. The distribution of  $\alpha$ -2,3 and  $\alpha$ -2,6-linked sialic acids on different cell types and the viral preference for these receptors is believed to determine both the cell and species specificity of the virus. We have characterized the infection by avian influenza virus strains of the H5, H7, and H9 subtypes in tracheal organ cultures (TOCs) from chicken and turkey. TOCs preserve the natural arrangement of the epithelial cells. Monitoring the ciliary activity easily detects infection by ciliostatic viruses, like influenza viruses. To analyze the role of sialic acids in the onset of infection, TOCs were pretreated with neuraminidase to protect the cells from virus infection. As expected, the enzymatic pretreatment prevented or retarded the ciliostatic effect of the infection of viruses containing H5 or H7. By contrast, there was no protective effect on the ciliostasis induced in chicken TOCs by an H9N2 strain. Whereas the infection of turkey TOCs by the H9N2 virus was neuraminidase-sensitive. Fluorescent staining using specific lectins to visualize  $\alpha$ -2,3 and  $\alpha$ -2,6-linked sialic acids on the cell surface revealed that both chicken and turkey respiratory epithelial cells contain  $\alpha$ -2,3-linked sialic acids; however,  $\alpha$ -2,6-linked sialic acids were found only on the surface of the turkey but not chicken respiratory epithelium. These findings indicate that avian influenza viruses use different receptors on their host cells depending on both the subtype of the hemagglutinin and the host species.

**Poster E 4**

**Bedeutung von TMPRSS2 für die Ausbreitung von Influenza und anderen respiratorischen Viren**

Pöhlmann, S.; Glowacka, I.; Steffen, I.; Tsegaye, T. S. (Medizinische Hochschule Hannover); Pfefferle, S. (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin); Drosten, C. (Universität Bonn); Bertram, S. (Medizinische Hochschule Hannover)

Einleitung: Das Influenza-Virus Hämagglutinin (HA) vermittelt die Bindung und den infektiösen Eintritt des Virus in die Zielzelle. Für die Funktion von HA ist die Aktivierung durch Wirtszellproteasen essentiell. Die Sequenz der Spaltstelle in HA bestimmt wesentlich den Tropismus und die Pathogenität aviärer Influenza-Viren. Eine vergleichbare Korrelation besteht jedoch nicht für humane Influenza-Viren, und es ist weitgehend unklar, welche Proteasen die Aktivierung humaner Viren vermitteln. Unsere Arbeiten sowie die Ergebnisse anderer Gruppen zeigten, dass Typ II-Transmembran-Serin-Proteasen (TTSPs) die HA-Proteine humaner Influenza-Viren durch Spaltung aktivieren. Ziel unserer laufenden Untersuchungen ist es die Rolle von TTSPs in der Influenza-Virus-Ausbreitung und Pathogenese zu bestimmen. Darüber hinaus wird untersucht, ob andere respiratorische Viren durch TTSPs aktiviert werden. Methodik: Die Expression von TTSPs in Zelllinien und humanem Lungengewebe wird durch Western Blot, FACS und Immunfärbung untersucht. Die TTSP-Expression in Zelllinien wird durch shRNA gezielt reduziert. Der HA-vermittelte Eintritt in Zielzellen wird mit Hilfe von pseudotypisierten lentiviralen Vektoren bestimmt, und die Ausbreitung von Influenza-Viren in Zellkulturen wird mit Hilfe eines Plaque-Tests quantifiziert.

Ergebnisse: Wir konnten zeigen, dass die TTSPs TMPRSS2, TMPRSS4 und Hepsin das Influenza-HA in transfizierten Zellen spalten. Die transiente Expression von TMPRSS2 und TMPRSS4 war ausreichend, um die Trypsin-unabhängige Influenza-Virus-Vermehrung in Zielzellen zu erlauben. Im Gegensatz dazu wurde in Hepsin-exprimierenden Zellen keine effiziente virale Vermehrung beobachtet. Expressionsanalysen lieferten erste Hinweise darauf, dass die endogene Expression von TMPRSS2 jedoch nicht von TMPRSS4 und Hepsin mit der Trypsin-unabhängigen viralen Vermehrung korreliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TMPRSS2 auf rezeptor-positiven Zellen in der humanen Lunge exprimiert wird. Diese Ergebnisse deuten an, dass TMPRSS2 die Influenza-Aktivierung in bestimmten humanen Zelllinien, und möglicherweise auch in menschlichem Lungengewebe, vermitteln könnte, und laufende shRNA

knock-down Analysen sollen diese Ergebnisse absichern. Schließlich konnten Hinweise erbracht werden, dass TMPRSS2-Expression auch die Ausbreitung anderer respiratorischer Viren moduliert, und die entsprechenden Ergebnisse werden vorgestellt.

Diskussion: Unsere Daten weisen auf eine Rolle der Wirtszellprotease TMPRSS2 in der Ausbreitung von Influenza-Virus und anderen humanen respiratorischen Viren hin. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob TMPRSS2 für die Influenza-Virus-Vermehrung und Pathogenese im infizierten Wirt wichtig ist, und möglicherweise ein neues Ziel für die therapeutische Intervention darstellt.

***Poster E 5***

**Role of two PB2 mutations on polymerase activity, host range and pathogenicity of influenza A virus (H5N1)**

Czudai-Matwich, V.; Klenk, H. D. (Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg)

Adaptation of the highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) SC35 (H7N7) to mice involves two important mutations, D701N and S714R, of the polymerase subunit PB2 that both increase the activity of the enzyme in mammalian cells (Gabriel et al., PNAS 102, 18590-18595, 2005). While mutation D701N has also been observed after adaptation of other influenza viruses to mammalian hosts, S714R was not found in any natural isolate. Instead, a cluster of viruses phylogenetically related to HPAIV A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) have a similar mutation in PB2, S714I, paralleled by an increased host range. PB2 mutation D701N was not observed with the Gs/Gd-like viruses. The human isolate A/Thailand/1(Kan-1)/2004 (H5N1) from a fatal case in Thailand is genetically still resembling avian viruses, since all described host-markers are avian-like, except for the above mentioned adaptive mutation of D701N. Thus, the following single- and double-mutants of Kan-1 PB2 were generated and polymerase activity was tested by a mini-genome based assay: PB2701N-714I, PB2701N-714R, PB2701D-714S, PB2701D-714I and PB2701D-714R. Either mutation 714I and 714R are able to increase the polymerase activity, independently of residue 701N or 701D, both in mammalian and avian cells, although in avian cells the increase of activity by 714R is less pronounced. After the generation of recombinant Kan-1 virus (PB2 mutants and wildtype Kan-1), growth kinetics are performed to compare the influence of polymerase activity on virulence.

**Poster E 6**

**Comparative characterization of H7-type HPAIV reassortants carrying H5 type HPAIV NS segments in avian Tracheal Organ Cultures and different cell culture systems**

Petersen, H. (Clinic for Poultry, University of Veterinary Medicine Hanover); Wang, Z.; Lenz, E.; Stein, M.; (Institute of Medical Virology, Justus-Liebig-University Giessen); Rautenschlein, S. (Clinic for Poultry, University of Veterinary Medicine Hanover); Pleschka, S. (Institute of Medical Virology, Justus-Liebig-University Giessen)

**Introduction:** New H5N1-type highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) have spread from Asia to Europe and have caused great fatalities in avian live stock. Human infections show case fatalities of up to 60%. Although devastating for birds, H7-type HPAIV have until now only caused mild infections in humans (with exception of one fatal case), but reassortment with H5-type HPAIV could change their pathogenic and pandemic potential. The fact that both types are co-circulating among birds has lead us to analyze what a effect possible reassortment between H7- and H5-type HPAIV would have for H7-type pathogenicity and transmission.

**Methods:** H7-type reassortant HPAIV carrying H5-type NS segments were successfully generated. FPV: wild-type (wt) A/FPV/Rostock/34 (H7N1) and the reassortants FPV NS GD: carrying the NS segment of A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1), FPV NS Ma: carrying the NS segment of A/Mallard/Netherlands/12/00 (H7N3), FPV NS VN: carrying the NS segment of A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).

We investigated the ability of these HPAIV to infect and propagate in different permanent cell lines of mammalian and avian origin (MDCK, Vero, A549, 293T and QT6, LMH) in comparison to primary Tracheal Organ Cultures (TOC) of turkey and chicken origin prepared from turkey and chicken embryos. Foci size, replication efficiency, host tropism, nuclear RNP export, apoptosis- and IFN-beta-induction was analyzed with permanent cells as well as replication, pathogenicity, host tropism and apoptosis induction was investigated on TOCs.

**Results:** We show that the NS segment of H5-type HPAIV can significantly alter the characteristics of the H7-prototype HPAIV reassortant, including replication efficiency, host tropism, increased pathogenicity and potential to induce apoptosis as well affecting nuclear RNP export. On turkey and chicken TOCs the growth curves as well as the induction of ciliostasis

differ. TOCs of turkey seem to be more susceptible to infection with wtFPV and their reassortants hence higher viral titres and significantly earlier induction of ciliostasis compared to TOCs of chicken. Interestingly, these species-related differences in virus-susceptibility seem to be independent of the virulence of the H7-virus or the NS-segment in the reassortant viruses. Also, the induction of apoptosis in chicken and turkey TOCs differs between the tested HPAIV as well as between the tested species. Compared to wtFPV and the other reassortants, infection with FPV NS VN most strongly induced apoptosis in chicken TOCs (8h. p.i.). In turkey TOCs the same effect can be seen later (24h p.i.). In permanent mammalian and avian cells, the four recombinant viruses show different foci phenotype and growth kinetics that also differ between mammalian and avian cells. Nevertheless, FPV NS VN replicates to the lowest titres, whereas FPV NS GD to the highest. Adversely FPV NS VN most strongly induces apoptosis and IFN-beta, whereas FPV NS GD shows the lowest induction. Also, nuclear RNP export efficiency is inversely related to the virus infectious titre. Discussion: These results demonstrate that reassortment between strictly avian H7-type HPAIV and naturally occurring H5-type HPAIV can indeed result in new viruses that show new characteristics and might pose a severe threat to animals and humans.

**Poster E 7**

**Re-dating of Coronavirus phylogenetic history and identification of close relatives to human coronaviruses in African Bats**

Pfefferle, S. (Bernhard-Nocht-Institute); Opong, S. (Kwame Nkrumah University of Science and Technology); Drexler, J.-F. (University of Bonn Medical Centre); Gloza-Rausch, F. (Noctalis, Centre for Bat Protection and Information); Müller, M. A. (University of Bonn Medical Centre); Augustina A. (Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, Ghana); Vallo P. (Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic); Adu-Sarkodie, Y. (Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Ghana); Kruppa, T. (Kumasi Centre for Collaborative Research in Tropical Medicine, Ghana) Drosten, C. (University of Bonn Medical Centre, Germany)

In the present study we tested 12 different bat species in Ghana for Coronavirus RNA. The virus prevalence in insectivorous bats (n= 123) was 9.76%. No CoV was detected in 212 fecal samples from Eidolon helvum fruit bats. Leaf-nosed bats pertaining to Hipposideros ruber by morphology had both group 1 and group 2 CoV. Virus concentrations were only up to 45,000 copies/100 mg of bat feces. The diversified group 1 CoV shared a common ancestor with the human common cold virus hCoV-229E but not with hCoV-NL63, disrupting hypotheses of common human descent. The most recent common ancestor of hCoV-229E and GhanaBt-CoVGrp1 existed ca. 1686-1800 AD. The GhanaBt-CoVGrp2 shared an old ancestor (ca. 2400 years) with the SARS-like group of CoV.

***Poster E 8***

**Dengue in travellers: molecular epidemiology of an imported mosquito-borne zoonoses**

Dobler, G.; Essbauer, S. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr); Hufert, F. (Institut für Virologie, Universität Göttingen); Löscher, T. (Abt. für Infektions- und Tropenmedizin, Universität München)

Dengue fever is the medically most important Arbovirus infection in the world. An estimated more 50 to 80 million infections occur annually. Areas of endemic occurrence all year around can be distinguished from areas with epidemic occurrence. Diagnosis in epidemic outbreaks is often delayed due to unspecific flu-like „ symptoms of dengue fever which are very common and of various causes in tropical and sub-tropical countries. However, early detection of virus circulation in a population is essential for rapid or increased effort of reducing mosquito populations. We report two instances, one in a traveller returning from the Maldives Islands, and another traveller returning from New Caledonia who to our knowledge were the first reported cases of dengue fever outbreaks in the respective countries with hundreds of cases following weeks to months after our detection. Both patients were diagnosed by real time-PCR and dengue virus was isolated. PCR amplicons could be sequenced and typing of the causative was done within few days. The sequences allowed the determination of the geographical origins of the respective dengue virus strains thus providing further data on possible ways of geographical spread. The results show that diagnosis of dengue fever in travellers returning from tropical and subtropical countries is important for several reasons. Beside the personal diagnosis of illness and possible diagnostic and therapeutic impact on individual medical care, the diagnosis and rapid communication of detection of dengue viruses in a starting epidemic situation can provide important information for public health systems and provide valuable data on possible ways of spread for combating the epidemic. In these instances returning travellers may prove to be sensitive sentinels for detection of dengue fever.

### ***Poster E 9***

## **Eine Untersuchung zur Verbreitung des West-Nil-Virus in der Vogelpopulation Deutschlands**

Müller, H.; Prell, J., (Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Institut für Virologie)

Das West-Nil-Virus (WNV) ist als Krankheitserreger beim Menschen und bei vielen Tierarten, vor allem Pferden und verschiedenen Vogelarten, bekannt. Klinisch apparent werdende Infektionen verursachen zumeist Grippe-ähnliche Symptome, in einigen wenigen Fällen kann es aber auch zu Enzephalitiden und Myelitiden mit Todesfolge kommen. Bis jetzt konnte WNV in Deutschland nicht nachgewiesen werden, obwohl in vielen angrenzenden Ländern - vor allem im Süden und Osten Europas - Infektionen beobachtet wurden oder das Virus dort sogar endemisch ist. Durch das vermehrte Auftreten neuer beziehungsweise bis vor kurzem in Deutschland oder Europa nicht vorkommender Virusarten wird auch der Epidemiologie des WNV immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt. In kürzlich vom Robert-Koch-Institut (RKI) veröffentlichten Studien wurde das Vorkommen WNV-spezifischer Antikörper in Weisstörchen nachgewiesen. Das Virus selbst wurde allerdings nicht detektiert.

In unserer Studie wurde ein vom RKI entwickeltes, für alle Linien des WNV spezifisches und sehr sensitives real-time RT-PCR-Protokoll weiter entwickelt und zur Untersuchung von Tupferproben angewandt, die im Rahmen des Aviäre Influenza (AI)-Wildvogelmonitorings von tot aufgefundenen Vögeln gewonnen worden waren. Eine vom Feldvirus unterscheidbare Positiv-Kontrolle wurde generiert. Das Protokoll wurde in Athens (Georgia, USA) mit Oropharyngeal- und Kloakaltupfer-Proben von tot aufgefundenen, WNV-positiven Vögeln validiert. Bisher haben wir ca. 2000 Proben von 63 Vogelarten aus verschiedenen Regionen Deutschlands untersucht. Alle Ergebnisse waren negativ.

Wir danken D.G. Mead und E. Mundt (Athens, Georgia, USA) für ihre Unterstützung. Diese Studie wird durch das BMELV gefördert.

**Poster E 10**

**Phylogenetic analyses of TBE viruses from ticks and rodents reveal geographic pattern of five genetic cluster in the Czech Republic**

Dobler, G.; Zöller, G. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr); Krivanec, K. (Central Military Institute of Health, Ceske Budejovice, Czech Republic); Essbauer, S. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr); Pfeffer, M. (Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig); Weidmann, M. (Institut für Virologie, Universität Göttingen)

The Czech Republic is in the heart of the distribution area of the Central-European subtype of Tick-Borne Encephalitis (TBE) virus. With up to a thousand clinical cases per year and a poor vaccination rate of only 16%, TBE is an important public health issue in this country. We were interested to see whether different TBE viruses occur in different parts of the country and thus investigated the genetic plasticity of TBE viruses detected in *Ixodes ricinus* (n=19), and *Ixodes hexagonus* (n=1) ticks, *Myodes glareolus voles* (n=2), and *Apodemus sylvaticus* mice (n=2) collected at ten different locations in South Bohemia, North Bohemia, South Moravia and North Moravia between 1986 and 1999. The entire E protein-coding region was amplified with a novel one-step RT-PCR and subsequently sequenced. Over the stretch of 1488 nucleotides (nt) representing the E gene, variable positions were found at 104 positions when compared to TBE virus reference strain Neudörfl. The corresponding deduced amino acid (aa) sequence varied in a maximum of ten positions while most of these aa-changes occurred only in a single isolate. Three mutations N52S, L265R, T331S, however, were found in 15, and the latter both each in 4 isolates. Phylogenetic analyses placed all isolates from North Bohemia (n=7, collected between 1996 and 1999) together in a distinct cluster. Likewise each single isolate from both South and North Moravia formed a single branch. Interestingly, the isolates from South Moravia formed two distinct clusters one contained three isolates from *Ixodes ricinus* which was placed between the two branches with the Moravian isolates. The second cluster consisted of twelve isolates, including all four rodent isolates and the TBE virus from *Ixodes hexagonus*, and was more distantly related to all other isolates. Our results provide evidence of distinct genetic TBE viruses being prevalent in distinct geographical regions of the Czech Republic. However, the resolution of our analyses and the amount of TBE viruses investigated is not sufficient to define phylogeographical patterns. Nevertheless there are obvious spatial distributions of TBE

viruses in the Czech Republic as well as co-circulation of at least two different TBE viruses in *Ixodes ricinus* ticks in South Bohemia.

**Poster E 11**

**Comparison of full genome sequences of tick-borne encephalitis viruses isolated from ticks and rodents in Slovakia**

Dobler, G.; Zöller, G.; Essbauer, S. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr); Hufert, F. (Institut für Virologie, Universität Göttingen); Pfeffer, M. (Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig)

Circulation of tick-borne encephalitis (TBE) virus in nature depends on the feeding habits of its transmitting tick vector which mainly involves rodents, but although other wildlife, and more rarely livestock and companion animals. Full genome sequence data of the Central-European subtype of TBE virus are available from *Ixodes ricinus* and diseased humans, but not from small mammals usually responsible to maintain the transmission cycle of TBE virus. Here we investigated the genetic structure of four TBE viruses isolated from ticks (#114 and #285), one bank vole (Cgl223) and one yellow-necked mouse (A104) collected in Slovakia between 1985 and 1992, and kindly provided by the late Milan Labuda. All viruses had a low passage history exclusively in baby mice. When compared to TBE virus reference strain Neudörfl (11,141 nucleotides, nts), nucleotide identities ranged between 96.6 % (#285) and 97.6 % (#114). The genomic lengths were found to be 11,134 nts (#114), 11,090 and 11,095 nts (Cgl223 and A104), and 10,985 (#285). While #114 had an identical poly-A-stretch as strain Neudörfl in its 3'-NCR, the two rodent isolates lacked this internal poly-A sequence, and #285 finally had a 149 nts deletion covering the entire poly-A part. Based on the similar nucleotide identities, the deduced amino acid (aa) sequences revealed unexpected differences between the four isolates. All four isolates had 16 aa-differences in common when compared with strain Neudörfl. The A104 isolate had additional unique 15 aa-differences, while the remaining three viruses shared another 13 unique aa-differences, thus clearly splitting the Slovakian TBE viruses into two distinct groups. Positions with aa-changes were not equally scattered along the viral genome, but clustered in the non-structural proteins NS2A (10), NS3 (10), and NS5 (11) proteins. Capsid and envelope protein each had only 3 positions altered in comparison with strain Neudörfl. Putative functions of the aa-changes found have to be investigated in upcoming studies, but our data nicely fill the gap of a more detailed knowledge of TBE virus in its natural hosts and provide evidence for a separate mouse-associated TBE

virus lineage in Slovakia. Acknowledgement: This work is dedicated in memorian to our friend, and great and honorable scientist Milan Labuda.

**Poster E 12**

**Surrogate marker for tick-borne encephalitis virus in Germany**

Niedrig, M.; Donoso Mantke, O. (Robert Koch Institut); Ulrich, R. (Friedrich-Loeffler-Institut); Růžek, D.; Grubhoffer, L. (Institute of Parasitology, Laboratory of molecular biology of vector and pathogens); P. Patel; R. Paliwala (Robert Koch-Institute)

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) causes the most important human flaviviral infection of the central nervous system in Europe and Asia. In the field, the virus circulates between vector ticks and some of their hosts, mostly rodents and other small mammals. In Germany, most of the human TBE cases occur in the southern federal states. Therefore Bavaria, Baden-Württemberg, and Hessen have rated certain parts as risk areas for TBE. In Germany, risk areas are officially defined only by the incidence of human cases. For two reasons this kind of rating might be unfavourable: 1) vaccination of people against TBEV living in risk areas leads to a decrease of TBE cases. 2) In other areas, e.g. Brandenburg, where only few human cases are observed, it is not clear if this is only due to the low population density or if few TBE foci are of minor importance for TBE infections in humans. To obtain a more distinct view about the distribution of TBE in Germany, we are looking for another surrogate marker that reports TBE foci earlier and more reliable. Therefore, we examined different organs from wild rodents caught all over Germany with a new quantitative real-time PCR for TBEV. We analysed different organs from rodents captured in different areas in Germany. In this study it turned out that some rodents show clear positive results in brain (10 positive /140) and spleen (8 positive /149) even when they were not from high endemic areas. These results were confirmed by experimental infections from rodents performed by colleagues from Czech Republic. Even in brain, spleen, liver and heart of these rodents we were able to detect TBEV genome 100 days post infection. These promising results will be further investigated by experimental infections of rodents and analysis of captured wild rodents. Rodents are good candidates for monitoring TBE because they are considered as main reservoir hosts, widespread in most ecological systems, easy to catch and to monitor. Furthermore, once infected with TBEV, they develop an unapparent infection and might be representative for a small area.

**Poster E 13**

**Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus* L.)**

Rühe, F.; Vor, T.; Kiffner, Ch. (Wildlife Biology and Game Management Team, Dept. of Forest Zoology, Büsgen-Institute, Georg-August-University Göttingen); Niedrig, M. (Robert Koch-Institute, Centre for Biological Safety); Hufert, F. T. (Institute of Virology, Medical School, Georg-August-University Göttingen)

Deer abundance is known to affect tick densities, as several deer species are important hosts for ticks (Jensen et al. 2000, Skarphéðinsson et al. 2005). Roe deer (*Capreolus capreolus*) for instance is frequently parasitized by *Ixodes ricinus*. Therefore, roe deer have been used in addition to small rodents as sentinel animals to monitor tick-borne infections. In our study we assessed the tick burden on roe deer as affected by age, physical condition, sex, deer abundance and seasonal as well as habitat characteristics. Main objective was to find other (apart from rodent abundance, see Kiffner et al., this volume) predictive parameters for tick risks. In September 2007 and in May, July and September 2008 we collected ticks on 110 roe deer from nine forest departments (three forest districts) in Southern Hesse, Germany. Deer was killed during regular hunting activities by local hunters and stored in central cold storages. We controlled the storages once a day. After assessing the deer parameters we intensively screened the head and the neck of each deer carcass for tick infestation. Ticks were removed and counted separately by host individual, tick development stage and sex of adult ticks. We differentiated between *Ixodes* spec. and *Dermacentor* spec., which also occurred occasionally. To correlate tick abundance and deer abundance we counted deer in March 2008 (by distance sampling, Buckland et al. 2001, Thomas et al. 2006) and computed deer abundance indices. We collected almost 5000 ticks from roe deer (only head and neck), 93.7% of which were *Ixodes* spec., 6.3% *Dermacentor* spec. Among *Ixodes*, 4.8% were larvae, 46.8% nymphs, 35.2% female and 13.2% male adults, with seasonal deviation. Correlations of tick burden with roe deer body indices (e.g. weight, age, hind foot length, sex) were weak, with non-significantly more ticks on bigger animals. Total tick infestation was high, with high individual variation (from 0 to 243 ticks/deer head and neck). The variation between the tick counts was not significant on the forest district level with 43 to 48 ticks/deer, on average. However, tick abundance on roe deer was different on the forest department level, partly reflecting habitat characteristics and deer

abundance. Amongst others habitat and microclimatic influences on tick numbers will be further evaluated during our ongoing study.

**Poster E 14**

**Ruminale Protozoen und die mikrobielle Flora bei Rindern aus Betrieben mit Botulismusproblematik**

Ständer, N. M.; Große-Herrenthey, A.; Schrödl, W.; Schwarz, S.; Krüger, M. (Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig)

Einleitung: Botulismus ist eine Zoonose, die durch die Neurotoxine der 7 verschiedenen Toxovaren des anaeroben Sporenbildners *C. botulinum* (A - G) hervorgerufen wird. Es existieren verschiedene Möglichkeiten, wie der Organismus mit diesen Toxinen in Kontakt treten kann: Durch Aufnahme des extrakorporal gebildeten Toxins, durch Infektion einer tiefen Wunde mit *C. botulinum* und anschließender Toxinbildung im geschädigten Gewebe, und schließlich wird als sogenannte Toxikoinfektion die orale Aufnahme von Clostridien bzw. ihrer Sporen mit Toxinbildung innerhalb des Intestinaltraktes beschrieben. Daneben existieren Misch- und Übergangsformen. Das Erkrankungsbild der Toxikoinfektion äußert sich als chronischer/viszeraler Botulismus beim Rind in einer recht unspezifischen Symptomatik (Leistungsabfall, Indigestionen, Apathie etc.). Für die Ausbildung des chronischen/viszeralen Botulismus sind die autochthone Flora und Fauna von größter Bedeutung, allerdings ist noch immer unklar, welche Parameter dabei den entscheidenden Einfluss ausüben. Um dieser Frage nachzugehen, untersuchten wir Pansensaft- und Kotproben von Rindern aus Beständen mit unterschiedlichem Botulismushintergrund auf verschiedene mikrobielle Parameter.

Methodik: Da der chronische Botulismus ein Bestandsproblem ist, erfolgte die Pansensaft- und Kotprobenentnahme *intra vitam* von insgesamt 278 zufällig ausgewählten Milchkühen im peripartalen Zeitraum aus 5 Betrieben mit Botulismushintergrund (218 Proben) und aus 2 unverdächtigen Betrieben (60 Proben). Eine weitere Unterteilung wurde entsprechend der Symptomatik wie folgt vorgenommen: Betriebe mit akut (2, insgesamt 118 Proben) und chronisch (3, insgesamt 100 Proben) erkrankten Tieren. Die ruminale Bakterienflora wurde bei insgesamt 85 Tieren aus 3 Betrieben (akut, chronisch erkrankt und unverdächtig) mittels FISH charakterisiert. Die fäkale mikrobielle Flora wurde wie die ruminale Protozoenfauna bei allen 278 Proben (Serienverdünnungs- und Plattenzählverfahren, bzw. Zählkammer und lichtmikroskopische Auswertung) untersucht. Sämtliche Pansensaft- und Kotproben gingen in den Test zum BoNT-Nachweis (A - D) mittels Anreicherung und folgendem ELISA (laborinterne Methoden) ein.

Ergebnisse: BoNTs konnten in folgenden Proben nachgewiesen werden: BoNT A im Kot (6 Tiere, 1 Betrieb), und im Pansensaft (13 Tiere, 2 Betriebe), BoNT B im Pansensaft (2 Tiere, 1 Betrieb), BoNT C im Kot (2 Tiere, 2 Betriebe) und im Pansensaft (7 Tiere, 2 Betriebe) und BoNT D im Pansensaft (1 Tier, 1 Betrieb). Alle Proben aus den unverdächtigen Betrieben hatten einen negativen Befund. Signifikante Unterschiede zwischen BoNT-positiven und BoNT-negativen Tieren wurden sowohl bei protozoären (*Dasytricha* spp., *Epidinium* spp., *Ophryoscolex* spp.) als auch bei den anderen mikrobiellen (Kot: *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., aerobe GKZ, gramneg. GKZ, *Lactobacillus* spp., *Candida* spp., Pansensaft: Eubacteria, Methanogene, *C. lituseburens*-Gruppe, Desulfobacterales, *Lactobacillus/Enterococcus*, Gammaproteobacteria) Parametern gefunden. Die übrigen untersuchten Parameter (Protozoen: Gesamtprotozoen, *Entodinium* spp., *Isotricha* spp., Diplodiniinae, Bakterien: Kot: anaerobe GKZ, *C. perfringens*, Pansensaft: Archaea, *Bacteroides/Prevotella*, *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, *Bacteroides fragilis*, *Cytophaga/Flavobacter/Bacteroides*, *Bacteroides distasonis*, *C. histolyticum*, *C. leptum*, *Eubacterium rectale/C. coccoides*, Alphaproteobacteria) unterschieden sich nicht signifikant voneinander in Bezug zum BoNT-Nachweis.

Diskussion: Zwischen BoNT-positiven und BoNT-negativen Tieren lassen sich zahlreiche und deutliche Unterschiede in der mikrobiellen Flora und Fauna nachweisen. Dies betrifft sowohl den Vormagenbereich als auch die hinteren Darmabschnitte. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um der Frage nachzugehen, ob diese Differenzen Ursache oder Folge, bzw. Begleiterscheinung einer Erkrankung durch *C. botulinum* sind. Die Probensammlung besonders aus erkrankten Beständen wird fortgesetzt, um die Zahl BoNT-positiver Tiere zu erhöhen.

## **Poster E 15**

### **Aktueller Stand der Rindertuberkulose in Deutschland**

Probst, C.; Geue, L.; Freuling, C.; Conraths, F. J. (Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Epidemiologie, Wusterhausen); Moser, I. (Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Molekulare Pathogenese, Jena)

Die Tuberkulose der Rinder, hervorgerufen durch *Mycobacterium bovis* und *M. caprae*, ist eine klassische Zoonose und kann bei Rindern, Schafen und dem Menschen schwere Erkrankungen hervorrufen. Sie zählt in Deutschland zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen und muss auch an die Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) gemeldet werden. Seit 1997 ist Deutschland gemeinschaftsrechtlich frei von Rindertuberkulose im Sinne der Entscheidung 97/76/EG der Kommission, das heißt, dass im Jahresschnitt höchstens 0,1 % aller Rinderbestände mit Tuberkulose infiziert sind. Seither wird in Deutschland keine routinemäßige Tuberkulinisierung bei Rindern mehr durchgeführt, sondern die Tuberkulose-Surveillance über die amtliche Fleischhygieneuntersuchung im Zusammenhang mit der Schlachtung durchgeführt. Werden bei einem Schlachtkörper in mehreren Organsystemen Veränderungen festgestellt, die durch Mykobakterien verursacht sein können, so wird der Schlachtkörper als untauglich beurteilt und im Herkunftsbetrieb werden alle über sechs Wochen alten Rinder tuberkulinisiert. Mittels klinischer und allergologischer Untersuchung und epidemiologischen Ermittlungen werden Kontaktbetriebe und gegebenenfalls weitere Fälle identifiziert. Im Jahr 2008 wurde in Deutschland die Tuberkulose der Rinder in 23 Beständen festgestellt. Legt man die Zahl von 187.317 Rinder haltenden Betrieben zugrunde, entspricht dies einer Herdenprävalenz von 0,012 %. Insgesamt wurden 700 Rinder im Rahmen der Bekämpfungsmaßnahmen getötet. Betroffen waren die Bundesländer mit den höchsten Rinderdichten Bayern, Niedersachsen, Schleswig-Holstein und Nordrhein-Westfalen. Im Süden Deutschlands wurden hauptsächlich Infektionen mit *M. caprae* und im Nordwesten Infektionen mit *M. bovis* festgestellt, was darauf hinweist, dass es sich um zwei epidemiologisch unabhängige Geschehen handelt. Durch epidemiologische Ermittlungen konnten allein 12 der 23 betroffenen Bestände einem von einem Betrieb ausgehenden Infektionsgeschehen in Norddeutschland zugeordnet werden. Bei den übrigen Ausbrüchen wurden keine direkten Zusammenhänge festgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass einige Rinder teilweise weit fortgeschrittene tuberkulöse Veränderungen aufwiesen, bei Tieren aus den Beständen

jedoch bei der amtlichen Fleischhygieneuntersuchung nie Hinweise auf das Vorliegen einer Tuberkulose dokumentiert wurden, ist zu prüfen, ob die Fleischhygieneuntersuchung in der gegenwärtigen Form als Surveillance-Methode für die Tuberkulose der Rinder ausreicht. Wir schlagen vor, durch gezielte Schulung von Schlachthoftierärzten und Fachpersonal die Erkennung von tuberkulösen Veränderungen bei der Fleischhygieneuntersuchung zu verbessern. Zudem sollte die Situation in Beständen, aus denen Rinder mit Veränderungen stammen, die durch Mykobakterien hervorgerufen sein können, konsequent abgeklärt werden. In Ergänzung dieser Maßnahmen halten wir eine flächendeckende oder zumindest stichprobenartige Tuberkulinisierung der deutschen Rinderbestände für notwendig, um die Verbreitung der Rindertuberkulose objektiver einschätzen zu können.

**Poster E 16**

**Molekulare Typisierung von Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Isolaten aus Deutschland mit Hilfe von SSR-, IS900-RFLP- und MIRU-VNTR-Analyse**

Fritsch, I.; Köhler, H.; Möbius, P. (Friedrich-Loeffler-Institut: Institut für Molekulare Pathogenese, NRL Paratuberkulose)

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Studie wurden im Rahmen des Zoonose-verbundes ZooMAP erarbeitet. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose, einer in Deutschland endemisch verbreiteten chronischen Darmentzündung des Rindes. Eine Beteiligung des Erregers an der Morbus Crohn Erkrankung des Menschen wird kontrovers diskutiert. MAP besitzt, verglichen mit anderen Bakterien, eine geringe genetische Heterogenität. Um Stämme unterscheiden und mögliche Übertragungswege untersuchen zu können, müssen bei diesem Erreger deshalb die Ergebnisse verschiedener Typisierungsmethoden kombiniert werden. Für andere Bakterien etablierte Methoden wie z. B. das Multilocus sequence typing (MLST) besitzen für MAP keine ausreichende Diskriminierungskraft. Das Ziel unseres Teilprojektes besteht in der Differenzierung von Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis - Isolaten aus Deutschland und der Etablierung eines neuen standardisierten Typisierungsprotokolls mit einer ausreichend hohen Diskriminierungskraft. Über 200 MAP-Rinder-Isolate verschiedener regionaler Herkunft wurden angezüchtet. Die Typisierung erfolgte mit Hilfe der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse, basierend auf dem IS900 (IS900 RFLP) und dem Einsatz von zwei Verdauungsenzymen (BstEII, PstI), der „Mycobacterial interspersed repetitive unit -Variable number tandem repeat „ - Analyse (MIRU-VNTR) basierend auf 8 Markern (MIRU 2, 3, 292; VNTR 25, 47, 3, 7, 32) und der „Multilocus short sequence repeat „ Analyse (MLSSR) an den Genomloci 1, 2, 8 und 9. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der BioNumerics-Software (Applied Maths, Belgien) ausgewertet. Bisher liegen Ergebnisse für 150 Feldisolate aus 47 epidemiologisch unabhängigen Rinderherden vor, wobei Isolate aus ein bis 36 Rindern je Herde untersucht wurden. Mit jeder Methode konnten Genotypen charakterisiert werden, die besonders häufig auftreten. Die Ergebnisse der verschiedenen Typisierungsmethoden korrelierten nicht miteinander und die Diskriminierungskraft war verschieden. Durch Kombination der Einzelergebnisse konnte die Diskriminierungskraft der Genotypisierung stark erhöht werden. Die

Heterogenität der MAP-Isolate aus Deutschland war größer als erwartet. Innerhalb der Herden gab es Unterschiede; in manchen Herden konnte vorwiegend ein MAP-Stamm, in anderen Herden eine Vielzahl von Genotypen detektiert werden. Die VNTR-Loci 3 und 32 besaßen eine Alleldiversität von nahezu Null. Bei der MLSSR-Typisierung wurde am Locus 1 ebenfalls eine sehr geringe Diversität festgestellt. Am Locus 2 trat bei Isolaten aus ein und derselben Herde mit identischen RFLP- und MIRU-VNTR-Profilen eine unterschiedliche Anzahl von repeats auf, möglicherweise hervorgerufen durch Homoplasie. Deshalb wird derzeit die Stabilität einzelner Marker untersucht. Je nach verwendeter Typisierungsmethode ergaben sich verschiedene epidemiologische Interpretationsmöglichkeiten. Ergebnisse einzelner Methoden können die einer kombinierten Typisierung nicht ersetzen. Die Schlussfolgerungen innerhalb publizierter Studien, in denen nur eine Typisierungsmethode verwendet wurde, gilt es zu überdenken. Durch eine Kombination von Fingerprint-, PCR- und Sequenz-basierten Methoden können MAP-Stämme differenziert und Übertragungswege zwischen Herden, einzelnen Tieren sowie Tier und Mensch detektiert werden. Die Signifikanz einzelner Methodenkombinationen bzw. individueller Typisierungsmarker bezüglich epidemiologischer Interpretationen kann bisher noch nicht abschließend beurteilt werden. Hierfür müssen die noch in Kultur befindlichen MAP-Isolate in die Auswertungen einbezogen werden.

**Poster E 17**

**Re-emerging of tularemia in Germany: Real increase in incidence or consequence of a raised awareness in public health and diagnostic microbiology?**

Spletstoesser, W.; Seibold, E. (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Konsiliarlaboratorium für Tularämie)

Background: Since 2004, there have been several lines of evidence indicating an increased tularemia activity in Germany represented by a significant increase in human cases and a simultaneous rise in *F. tularensis* infection in diverse animal species. For public health authorities, reliable epidemiological data on the spatial and temporal distribution of *F. tularensis* are needed to allow an appropriate risk assessment for this severe, sometimes fatal disease. For this reason, it is essential to ascertain if the observed re-emergence is really due to changes in endemic/enzootic activity of *F. tularensis* or is mainly related to increased application of traditional or novel and improved diagnostic tools.

Methods: Human tularemia is a reportable disease in Germany since 1949, and tularemia in hares has to be reported to the OIE for several decades. We obtained and analyzed all publicly available data on reported cases from 2009 back to 1949, including information from scientific publications. Additionally, the laboratory records of the Germany reference laboratory for tularemia, which had confirmed approximately 80 to 90 % of all human tularemia cases in the last decade and virtually all *F. tularensis* infections in animals since 2004, were dissected.

Results: A clear, significant increase in reported tularemia cases in humans as well as animals (hares) was observed starting in 2004/2005: (1) Between 2004 and 2009 the incidence was five times higher when compared to recent five-years intervals dating back to 1970. (2) In 2007 the highest annually incidence has occurred for about 50 years. (3) A first air-borne outbreak involving 11 cases was notified in 2005. (4) In 2007 and 2008, *F. tularensis* was firstly isolated from blood in five patients resulting in at least one additional laboratory infection. (5) Whereas tularemia in hares was not reported to OIE from 1992 to 2005, *F. tularensis* infections in hares are currently reported each year from at least three federal German states. Conclusions: Although diagnostic capacity was partially improved in veterinary as well as public health and clinical laboratories, this emendation can not solely explain the rise in reported tularemia cases in humans and animals. While first epidemiological as well a ecological studies revealed that tularemia is

certainly underestimated, large-scale longitudinal studies are necessary to explore the whole extent of this severe zoonosis in Germany.

**Poster E 18**

**Rodents as spreaders of atypical EPEC, which are possible predecessors of EHEC?**

Heidemanns, K. (Institut fuer Mikrobiologie und Tierseuchen FU Berlin); Nordhoff, M. (Bundeswehr, Central Institute for medical service); Semmler, T. (Institut fuer Mikrobiologie und Tierseuchen FU Berlin); Tietze, E.; Fruth, A. (Robert Koch Institute, Wernigerode Branch); Karch, H.; Bielaszweska, M.; Mellmann A. (Institute for Hygiene, Muenster); Ulrich, R. (Friedrich Loeffler Institut, Greifswald); Wieler, L. (Institut fuer Mikrobiologie und Tierseuchen FU Berlin)

Introduction: To define a possible reservoir function of rodents, the occurrence of diarrheagenic *Escherichia coli* in faecal specimens was studied. A total of 1.400 faecal specimens of wild living rodents was sampled by the Friedrich-Loeffler-Institute Federal Research Institute for Animal Health (FLI) and originating from representative location distributed all over Germany. The fecal specimens were tested for Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) associated genes *stx* (Shiga toxin), *eae* (*E. coli* attaching and effacing), *escV* (*E. coli* secreted) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) associated gene *bfpB* (bundle-forming pilus), EAF (EPEC adherence factor). Results: 180 *E. coli* were isolated, and none of the strains harboured Shiga toxin, while ten (5.6%) were positive for genes specific for the pathogenicity island Locus of Enterocyte Effacement. These strains were characterized as atypical EPEC (aEPEC; *eae+*, *bfpB-*, *stx-*). Serotyping revealed three strains being On.t:H6, four strains On.t.:NM and one strain each O179:H31, O167:H and Orough:H-, respectively. For detailed insights into the phylogenetic relatedness of the strains, Multilocus sequence typing (MLST) was performed and allowed assignment of four strains to ST28, four to ST 1094, one to ST 1092 and one two ST1104. In addition, their clonal relatedness was analyzed pulse-field gel electrophoresis, yielding to ten completely distinguishable PFGE-patterns. Furthermore we tested the strains for known insertion sites of the lambdoid phages by PCR. Since each of the ten atypical strains harbored intact insertion sites, all have the potential to be transduced by the *Stx*-encoding phages, assigning them as putative pre-EHEC.

Discussion: Our data raise the question whether rodents act as a possible reservoir for aEPEC. The fact that based on PCR-analyses all isolated rodent aEPEC have the potential to be transduced by *stx*-carrying phages, envisions rodents as carriers of pre-EHEC strains. Further studies are needed to functionally characterize phage transducing conditions for rodent aEPEC under natural conditions.

**Poster E 19**

**Etablierung und Evaluierung eines respiratorischen Chlamydophila psittaci Infektionsmodells im Kalb**

Reinhold, P.; Ostermann, C.; Schubert, E.; Liebler-Tenorio, E.; Berndt, A. Sachse, K.  
(Friedrich-Loeffler-Institut)

Einleitung: Das Ziel des Projekts bestand in der Erarbeitung eines Großtiermodells zur Chlamydophila (Cp.) psittaci Infektion der Lunge, um in einem natürlichen Erreger-Wirt-System Ausscheidungsverhalten und Transmissionsmechanismen der Chlamydien zu erkennen sowie die Pathogenese der Cp. psittaci Infektion im Kalb auf molekularer wie auch auf systemischer Ebene aufzuklären. Hierfür wurden im ersten Projektabschnitt die Applikationsart und die Infektionsdosis evaluiert.

Tiere und Methodik: Insgesamt wurden 18 männliche Kälber (Alter: 6-8 Wochen) aus einem Rinderbestand ohne Chlamydien-assoziierte Probleme einbezogen. Zur Erarbeitung des Applikationsschemas (n = 4 Tiere) wurden jedem Tier 5 ml einer Tusche-SPGA-Lösung (Verdünnung 1:5) via flexiblem Videoendoskop appliziert. Vierzehn weitere Tiere erhielten folgende Infektionsdosen eines Cp. psittaci Stammes boviner Herkunft (DC15):  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  EBE (einschlussbildende Einheiten) pro Kalb. Hierfür wurde die entsprechende Erregermenge in je 6 ml Nährmedium (SPGA) suspendiert und - entsprechend des zuvor definierten Applikationsschemas - in 8 definierte Bronchien appliziert. Die Folgen der intrabronchialen Applikationen wurden anhand klinischer Parameter und mittels Kenngrößen des pulmonalen Gasaustausches evaluiert. Ein Scoring-System fasste die Befunde der täglichen klinischen Beurteilung von Allgemeinzustand, Herz-Kreislaufsystem, respiratorischem System und anderen Organsystemen zusammen. Zur Beurteilung des Gasaustausches der Lunge wurden täglich arterielle und venöse Blutproben unter anaeroben Bedingungen für weiterführende blutgasanalytische und hämoximetrische Untersuchungen gewonnen.

Ergebnisse: Klinische Befunde - Während die Tiere, denen lediglich Tusche-Lösung appliziert wurde, kein klinisches Krankheitsbild entwickelten (durchschnittlicher Scorewert: 0,7), waren bei den Chlamydien-exponierten Tieren klinische Symptome zu beobachten, deren Schweregrad mit steigender Infektionsdosis zunahm und 2-3 Tage nach der experimentellen Infizierung seinen stärksten Ausprägungsgrad erreichte. Hierbei stieg insbesondere der durchschnittliche Scorewert des respiratorischen Systems mit zunehmender Infektionsdosis von 2,4 ( $10^6$

EBE) über 5,3 ( $10^7$  EBE) auf 6,0 ( $10^8$  EBE) bzw. 6,4 ( $10^9$  EBE) an. Gasaustausch in der Lunge - Mit ansteigender Infektionsdosis war die Gasaustauschfunktion der Lunge zunehmend beeinträchtigt. Hierbei sanken der Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut sowie die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins signifikant ab, so dass sich der prozentuale Anteil des Blutes, der in der Lunge nicht mehr mit Sauerstoff versorgt werden konnte wie folgt erhöhte: 5% ( $10^6$  EBE), 10% ( $10^7$ - $10^8$  EBE), 20% ( $10^9$  EBE). Einschätzung der Belastung und ethische Vertretbarkeit - Je Infektionsdosis waren 4 Tiere vorgesehen. Da die Tiere, die mit  $10^9$  EBE/Kalb infiziert wurden, einer unverträglich hohen Belastung ausgesetzt waren, wurde diese Tiergruppe auf  $n = 2$  begrenzt. Die beiden betroffenen Tiere wurden aus Gründen des Tierschutzes mit Sichtbarwerden der Schwere der Symptome schmerzfrei euthanasiert und der Sektion zugeführt.

Diskussion und Schlussfolgerungen: Die intrabronchiale Applikation von *Cp. psittaci* mittels Videoendoskop hat sich zur Etablierung des Infektionsmodells als geeignet erwiesen. Eine Infektionsdosis von  $10^6$  EBE/Kalb führte nicht zu einer klinisch manifesten Infektion der Tiere. Erst mit einer Infektionsdosis von  $10^7$ - $10^8$  EBE/Kalb ließ sich das Bild einer klinisch sichtbaren chlamydialen Infektion der Lunge induzieren. Hierbei erwies sich die Dosis von  $10^8$  EBE/Kalb als reproduzierbarer, so dass im weiteren Projektverlauf ausschließlich mit dieser Dosis gearbeitet wird.

**Poster E 20**

**Chlamydiaceae in sheep flocks in central Germany**

Lenzko, H.; Sprague, L. (Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Molekulare Pathogenese, Jena)

**Introduction:** Chlamydia (*C.*) abortus, the infectious agent of ovine enzootic abortion, is known to cause significant economic losses and poses a zoonotic threat, especially to pregnant women. The aim of our study is to determine the prevalence of Chlamydiaceae in sheep flocks in central Germany, since no systematic epidemiological data are available at present.

**Animals and methods:** We will sample two sheep flocks each in 23 districts of central Germany. Vaginal and rectal swabs from 11 animals are taken after lambing, as well as two blood samples from 29 animals (after lambing and three weeks later). If available, placentae and aborted foetuses are obtained. So far, we have sampled 13 flocks in 10 districts. DNA is isolated from swabs, foetal organs and placentae and tested in 23S family-specific real-time PCR. Borderline results are checked using a genus-specific conventional nested PCR. For species-identification, *C. abortus*-specific real-time PCR, DNA microarray testing and partial sequencing is being performed. In case of positive PCR results, a second vaginal swab, stored at -78 °C, is used for cultivation of chlamydiae in buffalo green monkey cells. Serological diagnosis is performed using a commercial antibody ELISA kit (CHEKIT Chlamydia(tm), IDEXX).

**Results:** In eleven flocks (85 %), between one and nine sheep were found to shed Chlamydiaceae. Only in two flocks, all swabs tested negative in PCR. *C. abortus* was detected in eight flocks (62 %) and serology was positive in twelve flocks (92 %). The owners of eleven flocks claimed to have no problems with abortion or weak lambs. In flock 5, abortions had occurred in the previous lambing season two months earlier. During the lambing season which we sampled, six ewes gave birth prematurely and all their lambs died within a few days. All other pregnant ewes were treated with long-acting tetracycline and no more sheep aborted. Flock 13 has had problems with abortion for many years and has been vaccinating against *C. abortus* using Ovilis Enzovax(tm) for eight years.

**Discussion:** Comparing the two PCR-negative flocks, we found that in flock 12 all animals tested negative in serology, whereas flock 9 had a higher percentage of seropositive animals than all the other flocks (48 %). Seropositivity was even higher than in the only vaccinated flock 13 (13 %) and five animals seroconverted during the three weeks after lambing. We

conclude that flock 12 is the only chlamydia-free flock out of 13 flocks tested so far.

**Poster E 21**

**Drug susceptibility of swine influenza A viruses isolated between 1981-2006 in Germany**

Schmidtke, M. (Universitätsklinikum Jena Institut für Virologie und Antivirale Therapie); Dürrwald, R.; Schlegel, M. (IDT Biologika GmbH, Abt. Forschung und Entwicklung); Glück, B.; Wutzler, P. (Universitätsklinikum Jena, Institut für Virologie und Antivirale Therapie)

The recent development of newly reassorted swine influenza A virus (FLUAV) of subtype H1N1 into pandemic virus demonstrated the important role of swine as mixing vessel and donor „ of human-pathogenic viruses. Noticeable, new pandemic viruses are resistant to ion channel blockers because of the introduction of M gene of European swine viruses. They also obtained the NA gene of European swine viruses. This underlines the need of a continuous antiviral surveillance among those viruses. In our study, drug susceptibility of ~120 serologically typed swine FLUAV circulating in Germany (~60 from 1981-2005 and ~60 in 2006) was analyzed by geno- and/or phenotyping. The results of this antiviral surveillance show that the M gene of all known isolates of the European lineage harbours mutations conferring resistance to ion channel blockers since 1989. Results from plaque reduction assays with 30 randomly selected isolates confirm amantadine resistance. Importantly, this M gene achieved general prevalence in all circulating subtypes. The NAI susceptibility of about 120 swine FLUAV strains of the years 1981-2006 was investigated in chemiluminescence-based NA inhibition assays. The mean 50% inhibitory concentration of swine FLUAV strongly corresponds with that of human strains. However, nine isolates with low drug susceptibility were identified which are presently being further characterized genetically. Moreover, a certain number of H1N2 isolates without resistance mutations in the NA gene contain an additional glycosylation site at Asn163 of HA that was shown to severely hamper the antiviral effect of NAI in MDCK cells. Using 2 isolates of this subtype as example, a markedly reduced oseltamivir and zanamivir susceptibility was confirmed in cell culture-based assays. To get an answer to the question whether these mutations would also affect negatively antiviral activity of NAI in vivo, mice as well as pigs were treated with oseltamivir and then infected with one isolate. The results indicate an antiviral effect of this NAI both in mice and the natural host.

**Poster E 22**

**Zoonotic potential of Chlamydia-infected cattle**

Kühlewind, S. (University Hospital Bergmannsheil, Medical Clinic III, Department for Respiratory Medicine, Allergology and Sleeping Medicine, Bochum); Theegarten, D.; Matzner, N. (University Hospital of Duisburg-Essen, Institute of Pathology and Neuropathology, Molecularpathology); Schultze-Werninghaus, G.; Rohde, G. (University Hospital Bergmannsheil, Medical Clinic III, Department for Respiratory Medicine, Allergology and Sleeping Medicine, Bochum)

**Introduction:** Chlamydia infections are a common problem in veterinary and human medicine. Studies showed an accumulation of chlamydia infections in certain dairy farms which might be related to an accumulation of chronic respiratory illnesses in farmers. In this project, the transmission of Chlamydia from animals to humans should be examined.

**Methods and material:** With the help of the Chamber of agriculture of North Rhine-Westphalia dairy risk farms and negative control farms were identified and the prevalence of Chlamydia infections in animals and humans was determined. For every farm 5 milk cows were examined by means of paired serology, nasal swabs, vaginal swabs, milk and fecal samples for the presence of chlamydia infections. The samples were analysed by means of real-time-PCR and culture.

The farmers were examined by lung function test, serology, allergy skin test and induced sputum. Preliminary results: The interim analysis of 40 dairy farms shows that in 22 farms, at least one sample from at least one animal was tested positive in PCR. Adding up the positive paired serology (ELISA) and positive PCR, we have now 72,5% of chlamydia positive farms. 5 human sputum samples were positive for *C. trachomatis*. Up to now only workers from 14 farms could be examined and final results have to be awaited. Nevertheless, from these persons 10 out of 36 had respiratory symptoms.

**Discussion:** This is a still ongoing study and no final conclusions can be drawn yet. Preliminary results show a wide spread of chlamydia in dairy cattle.

Direct zoonotic transmission has not been shown yet but simultaneous detection of Chlamydia in some farms indicates a zoonotic potential.

**Poster E 23**

**Prevalence of Chlamydia-infection in pigeons and possible impact on human health**

Kühlewind, S.; Schultze-Werninghaus, G.; Rohde, G. (University Hospital Bergmannsheil, Medical Clinic III, Department for Respiratory Medicine, Allergology and Sleeping Medicine, Bochum)

Introduction: Chlamydia infections are a common problem in veterinary and human medicine. Studies showed that the mean prevalence worldwide for *Chlamydia psittaci* in wild pigeons populations is 45,8%. In this study wild town pigeons of the Moerser Stadttaubenprojekt and people employed in this project, were examined for Chlamydia infection.

Methods and material: For the determination of the prevalence of Chlamydia infection in pigeons and persons the following methods were used: 270 pigeons from the population were examined by means of cloacal swabs, and collective fecal samples (from several pigeons in one sample) for Chlamydia infection. The swabs and fecal samples were analysed by means of Real-Time PCR and culture (not yet finished) and positive findings were tested by ArrayTube test to determine Chlamydia species. Persons were examined by lung function test, serology, allergy skin test and induced sputum.

Results: Out of 270 pigeons 26 animals were positive by PCR (9,6%). 22 of the 30 collective fecal samples were positive for Chlamydia (73,3%). 7 human sputum samples of 8 tested persons were all negative. The serology found 6 persons with *C. pneumoniae*-IgG (75%), in one person also IgA (12,5%) and in two of these persons borderline elevation of IgA-antibodies (25%). In one person *C. trachomatis*-IgA (12,5%) was found, whereas IgG and IgM were borderline. Another person was IgA positive (12,5%) and a third person was IgM positive (12,5%). One person showed *C. psittaci*-IgA and IgG (12,5%). Respiratory symptoms were present in 5 out of 8 persons.

Discussion: As expected a wide spreading of *C. psittaci* is found in town pigeons. The frequency detected in this study is markedly higher compared to other studies. Only in one employee a proof of *C. psittaci* infection was found by serology. *C. psittaci*-IgA and IgG were positive indicating an acute immunological reaction. Nevertheless, the sputum sample of this person as well as of all other persons were negative. There is a possibility of the transmission of *C. psittaci* from town pigeons to person. However, the transmission seems to be low.

**Poster E 24**

**Clinical implications of genotypes in ocular toxoplasmosis**

Pleyer, U.; Johnsen, J. (Department of Ophthalmology, Charité-University Medicine Berlin); Liesenfeld, O. (Mikrobiologie und Hygiene, Charité-Universitätsmedizin Berlin); Gross, U. (University Medical Center Göttingen); Grigg, M. (Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Health, Bethesda MD, USA)

Introduction: Toxoplasmosis is a worldwide occurring parasitic zoonosis and an important cause of posterior uveitis. The underlying organism *T. gondii* can be differentiated in 3 major genotypes (I - III) that varies in epidemiological distribution. Whereas there is a relation between these different strains and their virulence in rodents, this is unclear in humans. Therefore, this presentation will focus on a potential correlation between the infectious strain and clinical manifestations in our experience. Patients and methods: 108 consecutive patients with active lesions of OT, either as first attack and/or recurrence, were identified and were followed up for 3.8 years (mean). Patients with OT were subdivided according to clinical criteria including age and gender distribution, onset and course of infection, clinical features such as number and size of retinal lesions, number of recurrences, complications, and final visual acuity. These findings were correlated to the serotyped strains of *T. gondii*. Results: Serotyping revealed Type I (5.5%), type II (40.4%), and atypical „ (8.3%) *T. gondii* strains, whereas most frequently „nonreactive „ (43.1%) genotypes were present. Interestingly, „nonreactive „ organisms that do not belong to either type I, II, or III were not only the most frequently identified strain, but also led to more severe clinical manifestations. Contrary, type II strain, which is thought to be the main organism inducing human disease, caused less frequent recurrences of uveitis ( $p=0.029$ ) and had a smaller size of retinochoroidal lesions ( $p=0.02$ ) as compared to „nonreactive „ strains. Conclusions: Clinically more severe and recurrent retinochoroiditis was associated with *T. gondii* strains that do not belong to either type I, II, or III. This unusual bias toward atypical genotypes may have important implications for the epidemiology, transmission and treatment of OT.

### **Poster E 25**

## **Saisonalität und räumliche Verteilung Toxoplasma-gondii-positiver Katzenkotproben in Deutschland**

Hermann, D. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie); Pantchev, N. (Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories); Globokar Vrhovec, M. (Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories); Barutzki, D. (Tierärztliches Labor Freiburg); Fröhlich, A.; Wilking, H.; Conraths, F.; Schares, G. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie)

"Einleitung: Toxoplasma gondii ist weltweit verbreitet und kann eine Reihe von Wirbeltieren (Vögel und Säugetiere), einschließlich des Menschen, infizieren. Die Endwirte von T. gondii sind Feliden, wie z.B. Hauskatzen. Diese können im Kot Dauerstadien, sogenannte Oozysten ausscheiden. Neben Gewebezysten stellen diese eine Infektionsquelle für den Menschen und Zwischenwirte, wie z.B. Mäuse, Vögel und Haustiere, dar. Es gibt Hinweise darauf, dass Infektionen beim Menschen saisonal gehäuft auftreten. So werden laut European Center For Disease Prevention And Control (ECDC) Neuinfektionen bei Schwangeren vor allem im Winter und Frühjahr diagnostiziert. Hinweise auf eine erhöhte Seroprävalenz bei Schweinen im Herbst und im Winter gibt es aus Deutschland (Schulzig und Fehlhaber 2005, Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 118, 399-403). Informationen bezüglich der räumlichen Verbreitung und einer möglichen Saisonalität von T. gondii in Katzenkotproben in Deutschland waren allerdings bislang nicht bekannt.

Methodik: Zwei veterinärmedizinische Labors untersuchten im Zeitraum Juni 2007 bis Dezember 2008 Katzenkot auf Oozysten vom Toxoplasma-Typ; in positiven Proben wurde mittels PCR (Primer Tox4/5 und Tox 5/8) T. gondii nachgewiesen. Die Auswertung von Daten bezüglich der Probenherkunft (Postleitzahlen) erfolgte mit Hilfe eines geographischen Informationssystems (GIS). Probenentnahmezeitpunkte und Alter der Katzen von T. gondii-positiven Proben wurden ebenfalls statistisch ausgewertet.

Ergebnisse: Die statistische Analyse der Proben ergab, dass die Mehrzahl der untersuchten T. gondii-positiven Proben aus bevölkerungsreichen Regionen (815,8±149 Einwohner pro km<sup>2</sup>) stammten und sowohl junge (<1 Jahr) als auch ältere Katzen (>7 Jahre) infektiöse Oozysten ausschieden. Der Anteil T. gondii-positiver Proben an der Zahl der eingesendeten Katzenproben war im Zeitraum von Juli bis Dezember statistisch signifikant höher als der im Zeitraum von Januar bis Juni ( $p < 0,05$ ).

Diskussion: Sowohl junge als auch ältere Katzen stellen ein Risiko für Infektionen mit *T. gondii* dar. In der zweiten Jahreshälfte (in den Monaten Juli bis Dezember) werden anteilmäßig häufiger *T. gondii*-Oozysten im Kot von Katzen ausgeschieden als in der ersten Jahreshälfte. Diese Beobachtung zeigt erstmals eine Saisonalität in der *T. gondii*-Ausscheidung infizierter Katzen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass sich aufgrund der für Oozysten günstigen Witterungsbedingungen die Infektionswahrscheinlichkeit in den von Katzen gejagten Zwischenwirten erhöht. Unsere Beobachtung kann die erhöhte Inzidenz von *T. gondii*-Infektionen bei Menschen und Tieren im Winter erklären. Diese Studie wurde im Rahmen des Zoonoseverbundprojekts Toxonet 01 durchgeführt und wird vom BMBF gefördert (01 KI 0765).

**Poster E 26**

**Toxoplasma gondii: Erster Nachweis, Klonierung und Charakterisierung von atypischen, Typ-II/Typ-III-Rekombinanten in Europa**

Herrmann, D. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie), Pantchev, N.; Globokar Vrhovc, M. (Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories), Lüder, C. (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Georg-August-Universität); Conraths, F. J.; Schares, G. (Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Epidemiologie)

Einleitung: *Toxoplasma gondii* ist weltweit verbreitet und kann eine Reihe von Wirbeltieren (Vögel und Säugetiere), einschließlich des Menschen, infizieren. Die Endwirte von *T. gondii* sind Feliden, wie z.B. Hauskatzen. Diese können im Kot Dauerstadien, sogenannte Oozysten ausscheiden. Die Populationsstruktur von *T. gondii* ist klonal. In Nordamerika und Europa dominieren drei klonale Linien (I, II und III). Die klonalen Linien I, II und III weisen Unterschiede in ihrer Virulenz für Mäuse auf. Typ-I-Stämme sind hochvirulent. Die Infektion mit nur einem Organismus führt bereits zum Tod. Klonale Typ-II- und Typ-III-Stämme sind avirulent für Mäuse. Nur Infektionen mit mehr als 104 Organismen führen zum Tod. Aus den klonalen Linien I, II und III rekombinierte Genotypen wurden bislang nur bei experimentell infizierten Katzen beobachtet. Uns gelang kürzlich erstmals die Isolierung eines, aus einer Rekombination zwischen den klonalen Typen II und III entstandenen natürlichen *T. gondii*-Feldisolats (Herrmann et al., 2009. Int. J. Parasit., in Press). In Europa ist zwar die Mehrzahl der humanen Toxoplasmose-Fälle auf *T. gondii* der klonalen Linie II zurückzuführen, rekombinierte und atypische *T. gondii* Genotypen gelten aber als wichtige Ursache der okulären Toxoplasmose des Menschen. Methodik: *T. gondii*-Oozysten wurden mit einem kombinierten Sedimentations-Floatations-Verfahren aus dem Katzenkot isoliert und über IFN- $\gamma$ -knockout Mäuse passagiert. Tachyzoiten wurden aus dem Gewebe infizierter Mäuse gewonnen und in der Zellkultur vermehrt. DNS aus Zellkultur-Tachyzoiten wurde verwendet, um *T. gondii* Isolate mittels unabhängiger, nicht verbundener genetischer PCR-RFLP-Marker newSAG2, SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1 und Apico zu genotypisieren. Über eine Erreger-Endtitration wurden *T. gondii*-Isolate kloniert und mittels PCR-RFLP der Genotyp dieser Klone bestimmt. Die Klone wurden auf ihre Virulenz im BALB/c Mausmodell untersucht. Ergebnisse: Ein in Deutschland gewonnenes gemischtes, atypisches Isolat (TG-GER63) bestand aus zahlreichen verschiedenen *T. gondii*-Genotypen.

Neben verschiedenen atypischen Klonen, die alle Rekombinationen aus den klonalen Linien II und III darstellten, konnten auch mehrere Klone mit ausschließlich Typ-III-Allelen identifiziert werden. Im Vergleich mit Typ-II-Isolaten wurde gezeigt, dass sowohl das ursprüngliche, aus verschiedenen Einzelklonen bestehende Gemisch (TG-GER63) als auch daraus gewonnene Einzelklone mit unterschiedlichen Typ-II- und Typ-III-Allelen im BALB/c-Mausmodell signifikant virulenter waren. Während Anzeichen von Krankheit zeigten, starben Mäuse, die mit dem ursprünglichen Isolat TG-GER63, oder mit den daraus gewonnenen Klonen infiziert worden waren. Der Zeitpunkt des Todes war dosisabhängig.

Diskussion: Es konnte erstmals gezeigt werden, dass rekombinante und atypische *T. gondii* in Europa auftreten können. Rekombinante *T. gondii* aus den klonalen Typen II und III können, wie experimentelle (Saeji et al, 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314, 1780-1783) und auch unsere Untersuchungen (Herrmann et al., 2009. *Int. J. Parasit.*, in Press) zeigen, völlig andere Virulenz-Eigenschaften aufweisen, als Isolate der klonalen Linien II und III, aus denen sie entstanden sind. Die Bedeutung atypischer, rekombinanter Isolate für die Toxoplasmose des Menschen muss weiter untersucht werden. Unsere Arbeiten zeigten, dass 4 von 68 Oozysten-Isolaten aus Deutschland einen atypischen oder gemischten Genotyp aufwiesen und atypischen Isolaten bei der Toxoplasmose des Menschen daher eine größere Bedeutung zukommen dürfte, als bislang angenommen. Diese Studie wurde im Rahmen des Zoonoseverbundprojekts Toxonet 01 durchgeführt und wird vom BMBF gefördert (01 KI 0765).

## **Poster E 27**

### **Seroprävalenz von *Toxoplasma gondii* in Mastputen in Deutschland**

Koethe, M. (Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig); Pott, S.; Ludewig, M. (Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig); Bangoura, B.; Zöller, B.; Dauschies, A.; (Institut für Parasitologie, Universität Leipzig); Fehlhaber, K. (Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig); Straubinger, R. K. (Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, Ludwig-Maximilians-Universität München)

Einleitung: Der einzellige Parasit *Toxoplasma gondii* ist einer der häufigsten Zoonose-Erreger weltweit. Durch die Infektion kommt es unter anderem zur Bildung von Gewebezysten in der Muskulatur der Wirtstiere. Daher besteht ein potentielles Infektionsrisiko für den Verbraucher, wenn lebensmittelliefernde Tiere infiziert sind. Aus früheren Studien ist bekannt, dass eine Erhitzung des Fleisches auf 67 °C für 3 Minuten zu einer Abtötung der Erreger führt. Ein großer Teil der Produkte aus dem Handel sind aber nicht thermisch behandelte Fleischerzeugnisse, wie zum Beispiel Zwiebelmettwurst, Salami oder Rohschinken. Hier besteht das Risiko einer Gefährdung des Verbrauchers. Aktuelle Studien zeigen, dass es in Deutschland bei Mastschweinen eine durchschnittliche Seroprävalenz gegenüber *T. gondii* von 3,9 % gibt. In diesem Projekt sollte untersucht werden, ob auch Mastputen ein potentielles Infektionsrisiko darstellen können. Weiterführend zu dieser Untersuchung sollte die Tenazität von *T. gondii*-Gewebezysten in einem Mäusemuskulatur-Modell überprüft werden.

Methodik: Ein zum Nachweis *T. gondii*-spezifischer Antikörper in Putenserum entwickelter ELISA wurde verwendet. Dieser basiert auf rekombinanten GRA7 und GRA8 als Detektionsantigene und weist eine Sensitivität von 94,7 % und eine Spezifität von 96,6 % auf. Es wurden Seren von insgesamt 1913 Mastputen gesammelt und untersucht. Die Proben stammten aus 14 verschiedenen Mastbetrieben aus 5 Bundesländern aus zusammen 31 Schlachtdurchgängen. Das Blut der Tiere wurde direkt bei der Schlachtung gewonnen. Für den Tenazitätsversuch wurden im In-vitro-Modell Mäuse oral mit *T. gondii* infiziert. Für die Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Infektionsfähigkeit der Gewebezysten wurde die Mäusemuskulatur 6 Wochen p.i. in RPMI-Medium mit eingestelltem pH-Wert (5, 6 bzw. 7) bei 4 °C über eine Zeitdauer von bis zu 30 Tagen gelagert und an verschiedenen Probennahmetagen an Bioassaymäuse verfüttert. Die Gehirne dieser Mäuse wurde sowohl mikroskopisch als auch mittels real-time PCR auf das Vorhandensein von *T. gondii* überprüft.

Ergebnisse: Die Untersuchung der Putenserren ergab eine Gesamt-Seroprävalenz für *T. gondii* von 18,4 %, wobei das Maximum eines Schlachtdurchgangs bei 77,1 % lag. Verschiedene Schlachtdurchgänge aus dem gleichen Mastbetrieb variierten aber zum Teil sehr stark. Es gab keine Unterschiede hinsichtlich des Geschlechtes der Schlachttiere. Bezüglich der Tenazität ist zu sagen, dass eine Abtötung der Zysten allein durch den Parameter pH-Wert „ über einen Zeitraum von 10 Tagen in diesem Versuch nicht gegeben war. Die Infektionsfähigkeit der Gewebezysten ließ sich bei pH = 6 sogar am Tag 20 noch nachweisen. Am 30. Tag waren keine infektiösen Erreger mehr nachzuweisen.

Diskussion: Im Hinblick auf die wesentlich höhere Seroprävalenz bei Mastputen im Vergleich zu Mastschweinen und aufgrund der hohen pH-Wert-Toleranz des Erregers sollte davon ausgegangen werden, dass rohes oder nicht ausreichend erhitztes Putenfleisch oder Putenfleischprodukte potentielle Infektionsquellen für den Verbraucher darstellen können.

**Poster E 28**

**Seroprävalenz von *Toxoplasma gondii* bei Schweinen und Geflügel in Niedersachsen**

Buschtöns, S. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie); Görlich, K. (Institut für Parasitologie, Tierärztliche Hochschule Hannover); Maksimov, P. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie); Nagel-Kohl, U. (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Veterinärinstitut Hannover); Bötcher, L. (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Veterinärinstitut Oldenburg); Thoms, B. (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Veterinärinstitut Hannover); Kühne, M. (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Veterinärinstitut Oldenburg); Tenter, A. (Institut für Parasitologie, Tierärztliche Hochschule Hannover); Schares, G. (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie)

Einleitung: *Toxoplasma gondii* ist weltweit verbreitet und kann eine Reihe von Wirbeltieren (Vögel und Säugetiere) und den Menschen infizieren. Endwirte von *T. gondii* sind Feliden, wie z.B. Hauskatzen. Diese können im Kot Dauerstadien, sogenannte Oozysten ausscheiden. Oozysten stellen aber nur eine Infektionsquelle für Zwischenwirte dar. Hauptinfektionsquelle für den Menschen ist rohes oder ungenügend gegartes Fleisch infizierter Zwischenwirte, das infektiöses *T. gondii*-Gewebezysten enthält. Ziel der vorliegenden Studie war es, aktuelle Daten zur *T. gondii*-Seroprävalenz bei Schweinen und Geflügel in Niedersachsen zu erheben.

Methodik: Im Rahmen von Monitoringprogrammen zur AIV (Aviäres Influenzavirus), AK (Aujeszky'sche Krankheit) und KSP (Klassische Schweinepest) wurden zwischen Juli 2007 und Januar 2009 Serum- und Plasmaprobe von Puten, Hühnern, Enten, Gänsen und Schweinen in Niedersachsen gesammelt. Plasmaprobe von Schweinen werden nun in einem kommerziellen p30-ELISA, die Hühner- und Putenserum in einem kommerziellen Mikroagglutinationstest und Enten- und Gänserum in einem mit experimentellen Seren validierten in-house p30-ELISA untersucht.

Ergebnisse: Im Untersuchungszeitraum wurden ca. 15.000 Plasmaprobe (aus 889 Haltungen) von Schweinen und ca. 5.000 Seren (aus 230 Haltungen) von Geflügel gesammelt. Zurzeit werden die Proben serologisch untersucht. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass 5-10 % der Schweine, 19 % der Hühner, 4,9 % der Puten und 5,5 % der Enten seropositiv waren. Diskussion: Die Untersuchungen zur Seroprävalenz

zeigen, dass *T. gondii*-Infektionen bei den untersuchten Tierarten nicht selten vorkommen. Da rohes oder ungenügend gegartes Fleisch infizierter Schweine als wichtige Infektionsquelle für den Menschen angesehen wird, sind die von uns beobachteten Seroprävalenzen von Bedeutung für die Einschätzung von Infektionsgefahren für den Menschen. Geflügelfleisch wird in der Regel nicht roh oder ungenügend gegart verzehrt, dennoch wird zurzeit in nicht unerheblichem Umfang Geflügelfleisch (vor allem Putenfleisch) zur Herstellung nicht thermisch behandelter Fleischerzeugnisse verwendet, so dass insbesondere die Seroprävalenz bei Puten für die Einschätzung möglicher Infektionsgefahren für den Menschen von Bedeutung ist.

Diese Studie wurde im Rahmen des Zoonoseverbundprojekts Toxonet 01 durchgeführt und wird vom BMBF gefördert (01 KI 0765).

## **Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen**

### **§1 Name**

#### **Nationale Forschungsplattform für Zoonosen**

*Geschäftsstelle, Standort BERLIN*

c/o Telematikplattform für Medizinische Forschungsnetze e.V. (TMF)  
Neustädtische Kirchstraße 6  
10117 Berlin  
Tel.: 030 - 310 119 70  
Fax: 030 - 310 110 99  
Internet: [www.tmf-ev.de](http://www.tmf-ev.de)

*Geschäftsstelle, Standort MÜNSTER*

c/o Institut für Molekulare Virologie (IMV)  
Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE)  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Von-Esmarch-Str. 56  
48149 Münster  
Tel.: 0251 - 835 30 11  
Fax: 0251 - 835 77 93  
Internet: <http://zmbe.uni-muenster.de>

*Geschäftsstelle, Standort GREIFSWALD-INSEL RIEMS*

c/o Friedrich-Loeffler-Institut  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger (INNT)  
Südufer 10  
17493 Greifswald - Insel Riems  
Tel.: 038351 - 7145  
Fax: 038351 - 7194  
Internet: [www.fli.bund.de](http://www.fli.bund.de)

*Zentrale Kontaktadresse:*

E-Mail: [info@zoonosen.net](mailto:info@zoonosen.net)  
Internet: [www.zoonosen.net](http://www.zoonosen.net)  
Postadresse: siehe Standort Berlin

## **§2 Definition und Ziele der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen**

- (1) Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen (im Folgenden Zoonosenplattform genannt) ist ein institutionalisierter, durch diese Satzung gebundener Zusammenschluss von Forscherinnen und Forschern universitärer und außeruniversitärer Forschungseinrichtungen auf dem Gebiet der zoonotischen Infektionskrankheiten in ganz Deutschland.
  
- (2) Ziele der Zoonosenplattform sind:
  - Harmonisierung vorhandener und zukünftig notwendiger Aktivitäten im Bereich der Erforschung, Prävention und Bekämpfung der zoonotischen Infektionskrankheiten.
  - Koordination der Kommunikation und Zusammenarbeit auf nationaler und europäischer / internationaler Ebene.
  - Registrierung, Harmonisierung und Standardisierung der vorhandenen Ressourcen.
  - Verbesserung der Forschungsinfrastruktur durch die Bereitstellung von geeignetem Probenmaterial.
  - Förderung der breiten horizontalen Vernetzung von Human- und Veterinärmedizin sowie die Förderung der Kommunikation zwischen den auf dem Gebiet der Zoonosenforschung arbeitenden Wissenschaftlern und der interessierten Öffentlichkeit.
  
- (3) Diese Ziele sollen erreicht werden durch:
  - Organisation und Durchführung gemeinsamer Veranstaltungen (jährliche nationale Treffen sowie zum Abschluss ein internationales Treffen), die der Kontaktpflege, dem Erfahrungsaustausch und als Diskussionsforum dienen.

## Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

- Information für die und Kommunikation mit der Fachwelt und der allgemeinen Öffentlichkeit. Informationen werden auf einer eigenen Internet-Website zur Verfügung gestellt.
- Kommunikation innerhalb eines internen Netzwerkes (Intranet im Rahmen der Website), das nur den Mitgliedern der Zoonosenplattform offen steht.
- Bereitstellung von standardisiertem und qualitativ hochwertigem Probenmaterial aus zentralen oder virtuellen Depositorien der Zoonosenplattform.
- Initiierung und Durchführung von innovativen und interaktiven Pilotprojekten bzw. Querschnittsprojekten. Unterstützung und Begleitung zusätzlicher Förderaktivitäten.

### **§3 Organisation der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen**

Die Organe der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen sind das Plenum aller Mitglieder, der interne Beirat, der externe wissenschaftliche Beirat sowie die Geschäftsstelle an drei Standorten.

#### **Plenum**

##### a) Aufgaben

Das Plenum diskutiert den Forschungsbedarf im Bereich der zoonotischen Infektionsforschung und wählt den internen Beirat. Bei der Wahl sind alle Mitglieder vorschlags-, stimm- und wahlberechtigt.

##### b) Zusammensetzung

Das Plenum setzt sich zusammen aus allen Mitgliedern der Zoonosenplattform.

## Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

c) Aufnahme ins Plenum der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

Alle registrierten Mitglieder der Zoonosenplattform sind Mitglieder des Plenums.

d) Arbeitsweise

Das Plenum tritt mindestens einmal jährlich zusammen, in der Regel im Rahmen des jährlichen Symposiums der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen. Für die Einberufung ist die Geschäftsstelle der Zoonosenplattform verantwortlich. Mitglieder des Plenums können jederzeit Vorschläge zu Tagesordnungs- und Abstimmungspunkten für die jährlichen Treffen bei der Geschäftsstelle einreichen.

### **Interner Beirat**

a) Aufgaben

Der interne Beirat vertritt die Zoonosenplattform nach außen. Er führt gemeinsam mit der Geschäftsstelle die laufenden Geschäfte, nimmt übergeordnete Aufgaben der Leitung und Steuerung wahr und trifft alle wissenschaftsrelevanten Entscheidungen der Zoonosenplattform.

b) Zusammensetzung

Der interne Beirat besteht aus 15 gleichberechtigten Mitgliedern:

- i) mindestens 6 Vertreter der BMBF-geförderten Zoonosenverbände,
- ii) mindestens 1 Vertreter BMELV-geförderter Projekte zum Thema Zoonosen,
- iii) 5 weitere vom Plenum vorgeschlagene Mitglieder der Zoonosenplattform die die Wissenschaftsbereiche Humanmedizin, Tiermedizin und Infektionsbiologie mit den Fachrichtungen Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Epidemiologie, Infrastruktur- und Methodenwissenschaften und andere relevante Fachrichtungen abdecken sollten,
- iv) 3 Standortleiter der Geschäftsstelle (ständige Mitglieder).

## Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

Darüber hinaus nehmen namentlich benannte Vertreter der Bundesministerien für Bildung und Forschung (BMBF), Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) und Gesundheit (BMG) sowie des Projektträgers Gesundheitsforschung im DLR ohne Stimmrecht teil.

### c) Wahlen zum internen Beirat

Die Wahl zum internen Beirat erfolgt jährlich im Plenum der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen im Rahmen des Zoonosen-Symposiums. Die Wahl der Beiratsmitglieder erfolgt auf ein Jahr; eine Wiederwahl ist unbegrenzt möglich.

Die Wahlen erfolgen in drei getrennten Wahlgängen:

- i) für 6 Beiräte aus den aktuell vom BMBF geförderten Zoonosenverbänden,
- ii) für 1 Beirat aus den aktuell vom BMELV geförderten Zoonosenprojekten,
- iii) für die 5 weiteren Beiräte.

Alle Kandidaten sollen sich den Wahlberechtigten mit einer Zuordnung zu den geforderten Kompetenzfeldern gemäß § 3.2.b iii) vorstellen.

Für die Durchführung der Wahlen ist die Geschäftsstelle der Zoonosenplattform verantwortlich.

### d) Arbeitsweise

Der interne Beirat tagt 4-5 mal jährlich. Zusätzliche Abstimmungen per E-Mail, Telefon- oder Webkonferenz sind möglich. Für die Einberufung, Ausrichtung und Protokollierung ist die Geschäftsstelle der Zoonosenplattform verantwortlich.

## **Externer Wissenschaftlicher Beirat und Kreis der Förderer**

### a) Aufgaben

Der externe Beirat unterstützt und berät die Zoonosenplattform in ihrer wissenschaftlichen Arbeit und in ihrer strategischen Ausrichtung. Weiterhin wirkt er an der fachlichen Begutachtung der von der Zoonosenplattform auszuschreibenden Pilot- und Querschnittsprojekte im Rahmen des dem BMBF und seinem Projektträger unterliegenden Begutachtungsverfahrens mit. Details regelt die in der Anlage befindliche Geschäftsordnung zum Projektantragsverfahren.

### b) Zusammensetzung

Der Beirat besteht aus maximal 16 Mitgliedern:

i) wissenschaftliche Mitglieder,

ii) Mitglieder kraft Amtes: je 1 Vertreter der Ressortforschungseinrichtungen Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) Paul-Ehrlich-Institut (PEI) und Robert Koch-Institut (RKI) (Delegierte der Leitungsebene),

iii) ständige, nicht stimmberechtigte Vertreter der Ministerien BMBF, BMG und BMELV (Fachreferate) sowie des mit der Förderadministration beauftragten Projektträgers.

### c) Bestellung des externen Beirats

Die Beiratsmitglieder werden in Abstimmung mit dem BMBF, BMELV, BMG und dem Projektträger durch die Geschäftsstelle für einen Zeitraum von zwei Jahren bestellt.

### d) Arbeitsweise

# Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

Der externe Beirat tagt in der Regel ein- bis zweimal jährlich, im Frühjahr sowie im Herbst im Rahmen des Zoonosen-Symposiums.

## **Geschäftsstelle**

Die Geschäftsstelle führt gemeinsam mit dem internen Beirat die laufenden Geschäfte und Verwaltungsangelegenheiten der Zoonosenplattform und setzt die Ziele nach §2 um. Sie ist die Ansprechpartnerin für Mitglieder der Zoonosenplattform bei organisatorischen Fragen.

Die Geschäftsstelle wird durch ein Leitungsgremium aus den drei Standortleitern geführt. Die drei Standorte der Geschäftsstelle repräsentieren die Universitäre Forschung, Ressortforschung und die Expertise im infrastrukturellen und organisatorischen Bereich sowie die verschiedenen Fachrichtungen (Humanmedizin und Veterinärmedizin) der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen.

## **§4 Mitgliedschaft**

### a) Voraussetzungen für eine Mitgliedschaft

Mitglieder der Zoonosenplattform sind alle durch öffentliche Gelder geförderten Wissenschaftler, die sich mit der Zoonosenforschung befassen, und / oder deren Forschungsvorhaben zu Zoonosen im Vorfeld einer unabhängigen wissenschaftlichen Begutachtung unterzogen wurden. Weiterhin erhalten Mitgliedsstatus jene Wissenschaftler/innen, die in den vergangenen drei Jahren (zum Zeitpunkt des Antrags auf Mitgliedschaft) in peer-reviewten Fachzeitschriften zu Fragestellungen aus dem Bereich der Zoonosenforschung publiziert haben.

### b) Beantragung der Mitgliedschaft

Die Mitgliedschaft wird wirksam durch die Registrierung über das entsprechende Formular (s. Anlage) und gilt bis auf Widerruf. Die Registrierung dient der Legitimierung des Plenums und der

## Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

Nachvollziehbarkeit der Aktivitäten der Mitglieder in der Zoonosenforschung.

### c) Mitwirkungsrechte und Pflichten der Mitglieder

Registrierte Mitglieder der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen sind berechtigt, am Plenum teilzunehmen und die in §3 geregelten Rechte des Plenums auszuüben.

Jedes Mitglied kann auf Antrag Zugang zum internen Bereich der Website der Zoonosenplattform erhalten und kann dort den anderen Mitgliedern sowie im externen Bereich der interessierten Öffentlichkeit sein Projekt vorstellen.

Jedes Mitglied wird im Verteiler der Zoonosenplattform aufgenommen und wird von der Geschäftsstelle über Aktivitäten und Veranstaltungen der Zoonosenplattform informiert. Insbesondere erhält es die Einladungen zum Plenum der Zoonosenplattform.

Durch die Mitgliedschaft entstehen keine rechtlichen und finanziellen Pflichten.

### d) Ausschluss von der Mitgliedschaft

Auf Antrag eines Dritten kann ein Mitglied bei Vorliegen eines schwerwiegenden Grundes den Mitgliedsstatus verlieren. Über einen entsprechenden Antrag auf Ausschluss entscheidet der interne Bei at.

## **§5 Gaststatus**

### a) Voraussetzungen für einen Gaststatus

Ein Gaststatus kann grundsätzlich allen interessierten Gästen eingeräumt werden, insbesondere aber Wissenschaftler/innen, die einen Forschungsantrag eingereicht haben, über den noch nicht abschließend entschieden wurde. Auch Wissenschaftler, die an überwiegend kommerziell orientierten Forschungseinrichtungen arbeiten und daher von einer Mitgliedschaft ausgeschlossen sind, können einen solchen Gaststatus beantragen.

## Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

### b) Beantragung und Genehmigung eines Gaststatus

Der Antrag auf einen Gaststatus ist an die Geschäftsstelle der Zoonosenplattform zu richten. Über den Antrag entscheidet der interne Beirat.

### c) Mitwirkungsrechte und Pflichten der Gäste

Der Gaststatus bezieht sich jeweilig:

i) auf eine Sitzung des internen Beirats,

ii) auf eine sonstige Veranstaltung der Zoonosenplattform, soweit diese nicht öffentlich ist.

Ein bewilligter Gaststatus berechtigt zur einmaligen Teilnahme an der betreffenden Veranstaltung.

Gäste haben kein aktives oder passives Wahlrecht innerhalb der Zoonosenplattform.

Gäste können in den E-Mail-Verteiler der Zoonosenplattform aufgenommen und somit über deren Aktivitäten informiert werden.

Darüber hinaus entstehen für Gäste keine weiterreichenden Rechte oder Pflichten.

## **§7 Inkrafttreten, Satzungsänderungen**

Diese Satzung tritt mit ihrer Verabschiedung durch den Internen Beirat mit sofortiger Wirkung in Kraft. Sie kann jederzeit durch Beschluss des Internen Beirats verändert werden. Änderungen müssen dem Plenum zeitnah zur Kenntnis gegeben werden.

## **§8 Salvatorische Klausel**

Sollten Teile dieser Satzung per Beschluss oder faktisch unwirksam werden, behalten die restlichen Bestimmungen dieser Satzung Geltung.

## Satzung der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen

Die sich aus dem Zuwendungsbescheid und den Nebenbestimmungen des BMBF für die Zuwendungsempfänger im Rahmen des Förderprojekts „Zoonosenplattform“ ergebenden Rechte und Pflichten bleiben von den Bestimmungen dieser Satzung unberührt.

### **Geschäftsordnung für Projektantragsverfahren**

#### **Verfahren zur Vergabe und Betreuung von Pilot-Projekten und verbundübergreifenden Projekten**

##### **Präambel**

Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen ist ein Informations- und Servicenetzwerk für alle in Deutschland aktiven Forschungsgruppen im Bereich der Zoonosen. Ihr Ziel ist es, schnell funktionsfähige, flexible und nachhaltige Lösungen für die Erforschung, Prävention und Bekämpfung von zoonotischen Infektionskrankheiten zu entwickeln und gemeinsam mit den entsprechenden Institutionen umzusetzen.

Um dieses Ziel zu erreichen, fördert die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen wissenschaftliche und infrastrukturelle Arbeiten im Bereich der Zoonosenforschung. Diese sollen einen Anreiz zu intensiver Forschungsvernetzung und –kooperation zwischen Human- und Veterinärmedizin einerseits und Universitäten und Bundesinstituten andererseits bieten.

Die Vergabe und Verwaltung von Pilot-Projekten und verbundübergreifenden Projekten im Rahmen der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen obliegt gemäß der Anlage zum Zuwendungsbescheid, Förderkennzeichen 01KI0805 vom 10.03.2009, der Geschäftsstelle Standort Berlin. Die erforderlichen Mittel werden im Rahmen eigener Zuwendungen vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)/Projektträger Gesundheitsforschung im Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e. V. (im Folgenden Projektträger genannt) bewilligt.

##### **Antragsberechtigung**

Alle Mitglieder der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen sind berechtigt, Projektanträge zu stellen und Mit Antragsteller zu sein. Mitglieder mit Gaststatus sind berechtigt, sich als Kooperationspartner an Projekten zu beteiligen. Der Interne Beirat

ist berechtigt, Projekte zu initiieren. Anträge können grundsätzlich jederzeit gestellt werden.

### **Art der Projekte**

Es werden zwei verschiedene Projektarten unterschieden: Pilotprojekte und verbundübergreifende Projekte (Querschnittsprojekte). Das Antragsverfahren für beide Projektarten ist identisch.

Pilotprojekte sind abgrenzbare Einzelvorhaben mit einem definierten Finanzrahmen. Die Projektdauer soll in der Regel zwölf Monate nicht übersteigen. Sie sollen eine Anschubfinanzierung für darauf aufbauende Forschungsvorhaben der Antragsteller darstellen.

Querschnittsprojekte sind verbundübergreifende Projekte mit definiertem Finanzrahmen, die an mindestens zwei Forschungsstandorten in Deutschland durchgeführt werden. Sie sollen Strukturen aufbauen, die spätestens im Anschluss an die Förderphase für mehr als nur die antragstellenden Forschungsnetzwerke nutzbar sind und allen Zoonosenforschern in Deutschland zur Verfügung gestellt werden sollen. Die Projektdauer soll 24 Monate nicht überschreiten.

### **Antragsverfahren**

Die Beantragung von Projektmitteln erfolgt im Rahmen des im Folgenden beschriebenen Verfahrens.

### **Einreichen des Projektantrages bei der Geschäftsstelle Standort Berlin**

Projektanträge sind bis spätestens 14 Tage vor der jeweiligen Sitzung des Internen Beirats bei der Geschäftsstelle der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen Standort Berlin, Neustädtische Kirchstraße 6, 10117 Berlin einzureichen.

Zur besseren Vergleichbarkeit und Beurteilung von eingereichten Projektvorschlägen sind die Antragsunterlagen in der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen standardisiert. Eine entsprechende Vorlage erhalten Sie bei der Geschäftsstelle oder auf der Internetseite [www.zoonosen.net](http://www.zoonosen.net).

Im Projektantrag soll das geplante Vorgehen detailliert beschrieben werden. In diesem sind die zu behandelnde Fragestellung, der wissenschaftliche Neuwert, der Mehrwert für die Zoonosenforschung sowie die Vernetzung zwischen Human- und Veterinärmedizin sowie universitärer und außeruniversitärer Forschung darzulegen. Der Umfang ist auf zehn Seiten beschränkt (ohne Anlagen).

Die Geschäftsstelle prüft die Unterlagen auf formale Korrektheit und versendet sie an die Mitglieder des Internen Beirats. Falls die Formalia nicht eingehalten sind, erhält der Antragsteller Gelegenheit, kurzfristig die entsprechenden Unterlagen nachzureichen. Die Geschäftsstelle ist berechtigt, formal unkorrekte Anträge zurückzuweisen. Die Entscheidung erfolgt nach pflichtgemäßem Ermessen.

### **Initiale Bewertung durch den Internen Beirat**

Der Antragsteller stellt den Projektantrag auf einer Sitzung des Internen Beirats vor. Die Mitglieder des Internen Beirats diskutieren und bewerten den Antrag anhand der folgenden Kriterien:

Expertise der Antragsteller,  
wissenschaftlicher Neuwert und Originalität,  
Realisierbarkeit des Vorhabens,  
Mehrwert für die Zoonosenforschung,  
Zeit- und Finanzrahmen und  
Vernetzung zwischen verschiedenen Forschungseinrichtungen  
sowie Human- und Veterinärmedizin.

Nach inhaltlicher und formaler Prüfung des Projektantrages kann der Interne Beirat wie folgt entscheiden:

- a) Der Projektantrag wird positiv bewertet und in die externe fachliche Begutachtung gegeben.
- b) Dem Projektantrag wird mit Veränderungen zugestimmt. Der Antragsteller wird aufgefordert, die beschlossenen Projektmodifikationen einzuarbeiten und den Antrag erneut vorzulegen.
- c) Der Projektantrag wird abgelehnt.

Die Weiterleitung eines Projektantrags wird im Internen Beirat mit einfacher Mehrheit beschlossen bzw. abgelehnt. Stimmberechtigt sind alle Mitglieder des Internen Beirats, sofern sie nicht befangen sind.

Sind Mitglieder des Internen Beirats befangen, haben sie während der Diskussion und der Abstimmung über den Antrag den Raum zu verlassen.

### **Externe fachliche Begutachtung**

Die inhaltliche Bewertung des Antrages geschieht in einer externen fachlichen Begutachtung unter Einbeziehung von Mitgliedern des Externen Beirats nach transparenten Kriterien. Die Begutachtung wird von der Geschäftsstelle in Abstimmung mit dem BMBF/Projektträger organisiert.

Der Externe Beirat sichert die Qualität der Entscheidungen auf Grundlage seiner fachlichen Expertise und des für die Beurteilung notwendigen Überblicks. Dabei wird streng darauf geachtet, dass Befangenheiten durch Kooperation oder Konkurrenz vermieden werden.

Im Falle einer positiven fachlichen Begutachtung wird der Antrag zur abschließenden Prüfung an den Projektträger weitergeleitet. Bei negativer fachlicher Begutachtung wird der Antrag an den Internen Beirat zurück verwiesen.

### **Abschließende Prüfung durch den Projektträger**

Für die abschließende Förderentscheidung reicht die Geschäftsstelle die Antragsunterlagen, das Protokoll der initialen Bewertung durch den Internen Beirat, das Protokoll der Begutachtung bzw. die schriftlichen fachlichen Stellungnahmen der Gutachter und einen Formantrag (AZA), der vom Antragssteller ausgefüllt werden muss, beim Projektträger ein.

Eine verbindliche Förderzusage kann erst nach abschließender Prüfung der Unterlagen durch den Projektträger erteilt werden.

### **Betreuung der Projekte**

#### **Umwidmungs- und Änderungsanträge**

Die Abgabe von schriftlichen Stellungnahmen zu Änderungsanträgen, wenn hierdurch Finanzmittel zwischen Teilprojekten umgewidmet werden sollen oder eine Änderung der Laufzeit beantragt wird, sind über die Geschäftsstelle der Zoonosenplattform, zusammen mit einer Stellungnahme der Geschäftsstelle, an den Projektträger zu richten. Andere Anträge (Änderungen bei Positionen des Finanzierungsplans innerhalb der einzelnen Teilprojekte, Mittelverschiebungen zwischen Haushaltsjahren) sowie Zahlungsanforderungen sind von jeder Einrichtung direkt an den Projektträger zu richten.

#### **Berichtspflicht**

Die Bündelung der im Rahmen der Berichtspflicht zu erstellenden rechnerischen Nachweise (Zwischennachweise, Verwendungsnachweis) obliegt gemäß der Anlage zum Zuwendungsbescheid (Förderkennzeichen 01Kt0805) vom 10.03.2009 der Geschäftsstelle. Dies soll es der Geschäftsstelle ermöglichen, sich einen Überblick über die zeitgerechte Verwendung der für die Pilotprojekte und Querschnittsprojekte insgesamt bewilligten Finanzmittel zu verschaffen. Die an den o. g. Projekten beteiligten Einrichtungen haben ihre rechnerischen Nachweise einschließlich der Aufschlüsselung für die Teilprojekte so rechtzeitig der Geschäftsstelle zuzusenden, dass diese die Unterlagen sichten, zusammenfassen und fristgerecht an den Projektträger weiterleiten kann.

Die Bündelung der Sachberichte für die o. g. Berichte obliegt ebenfalls der Geschäftsstelle. In den gemäß den Bestimmungen des Zuwendungsbescheids anzufertigenden Sachberichten (Zwischenberichten, Schlussbericht) muss auf jedes Teilprojekt eingegangen werden. Bei Verbänden ist darüber hinaus für alle Teilprojekte auch die Zusammenarbeit im Verbund darzustellen. Die Berichte zu den einzelnen Teilprojekten sind dem Verbundkoordinator zuzuleiten, der einen Gesamtbericht über den

Verbund erstellt, aus dem insbesondere auch die inhaltliche und strukturelle Entwicklung des Verbundes und ggf. die Beteiligung an verbundübergreifenden Aktivitäten hervor geht.

Die Berichte sind vom Projektleiter bzw. bei Verbänden vom Koordinator zunächst an die Geschäftsstelle zu senden. Nach Kenntnisnahme leitet die Geschäftsstelle diese Berichte fristgerecht zusammen mit einer fachlichen Stellungnahme an den Projektträger weiter.

Darüber hinaus sollen regelmäßige Berichte über den Fortgang des Projektes im Rahmen der Sitzungen des Internen Beirats erfolgen.

## Teilnehmerverzeichnis

(Stand 24.09.2009)

### Referenten

<b>Name</b>	<b>Institution und E-Mail</b>
Bauer, Johann	Technische Universität München johann.bauer@wzw.tum.de
Beer, Martin	Friedrich-Loeffler-Institut martin.beer@fli.bund.de
Böhnel, Helge	Universität Göttingen hboehne@gwdg.de
Brockmann, Stefan	Landesgesundheitsamt BW Stefan.Brockmann@rps.bwl.de
Däubener, Walter	Universität Düsseldorf daeubene@uni-duesseldorf.de
Deyneko , Igor	Helmholtz-Zentrum Igor.Deyneko@helmholtz-hzi.de
Dobler, Gerhard	Inst. f.Mikrobiologie der Bundeswehr gerharddobler@bundeswehr.org
Dressler, Dirk	Medizinische Hochschule Hannover dressler.dirk@mh-hannover.de
Drexler, Jan Felix	Universität Bonn drexler@virology-bonn.de
Drosten, Christian	Universitätsklinikum Bonn drosten@virology-bonn.de
Essbauer, Sandra	Insitut für Mikrobiologie der Bundeswehr sandraessbauer@bundeswehr.org
Essig , Andreas	Universitätsklinikum Ulm andreas.essig@uniklinik-ulm.de

Feldmann, Heinz	NLAID feldmannh@niaid.nih.gov
Fritsch , Isabel	Friedrich-Loeffler-Institut isabel.fritsch@fli.bund.de
Goethe, Ralph	Tierärztliche Hochschule Hannover ralph.goethe@tiho-hannover.de
Groschup, Martin	Nationale forschungsplattform für Zoonosen martin.groschup@fli.bund.de
Haller, Otto	Universitätsklinikum Freiburg haller.office@uniklinik-freiburg.de
Harmsen, Dag	Universität Münster dharmsen@uni-muenster.de
Henning, Klaus	Friedrich-Loeffler-Institut klaus.henning@fli.bund.de
Herrler, Georg	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover georg.herrler@tiho-hannover.de
Hertwig, Stefan	Bundesinstitut für Risikobewertung stefan.hertwig@bfr.bund.de
Hufert, Frank Torsten	Universität Göttingen fhufert@gwdg.de
Karch, Helge	Universität Münster hkarch@uni-muenster.de
Knittler, Michael	Friedrich-Loeffler-Institut michael.knittler@fli.bund.de
Lüder, Carsten G. K.	Universität Göttingen clueder@gwdg.de
Ludwig, Stephan	Nationale forschungsplattform für Zoonosen ludwigs@uni-muenster.de
Matthaei, Markus	Robert Koch-Institut

## Teilnehmerverzeichnis

---

	matthaeim@rik.de
Meemken, Diana	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover diana.meemken@tiho-hannover.de
Mellmann, Alexander	Universitätsklinikum Münster mellmann@uni-muenster.de
Menge, Christian	Friedrich-Loeffler-Institut christian.menge@fli.uni-giessen.de
Meyer-König, Ursula	Universitätsklinikum Freiburg ursula.meyer-koenig@uniklinik-freiburg.de
Neubauer, Heinrich	Friedrich-Loeffler-Institut heinrich.neubauer@fli.bund.de
Nitsche , Andreas	Robert Koch-Institut nitschea@rki.de
Överby, Anna	Universitätsklinikum Freiburg anna.oeverby@uniklinik-freiburg.de
Pauli, Eva-Katharina	ViroLogik GmbH e.pauli@virologik.com
Planz, Oliver	Friedrich-Loeffler-Institut oliver.planz@fli.bund.de
Pöhlmann, Stefan	Medizinische Hochschule Hannover poehlmann.stefan@mh-hannover.de
Rühe, Ferdinand	Universität Göttingen fruehe@gwdg.de
Sachse, Konrad	Friedrich-Loeffler-Institut konrad.sachse@fli.bund.de
Schares, Gereon	Friedrich-Loeffler-Institut gereon.schares@fli.bund.de
Schlüter, Dirk	Universität Magdeburg dirk.schlueter@medizin.uni-magdeburg.de

Semler, Sebastian	Nationale Forschungsplattform für Zoonosen sebastian.semmler@tmf-ev.de
Stäheli, Peter	Universitätsklinikum Freiburg peter.staeheli@uniklinik-freiburg.de
Stark, Klaus	Robert Koch-Institut starkk@rki.de
Staubach , Christoph	Friedrich-Loeffler-Institut Christoph.Staubach@fli.bund.de
Tedin, Karsten	Freie Universität Berlin tedin.karsten@vetmed.fu-berlin.de
Ulbert, Sebastian	Fraunhofer Institut sebastian.ulbert@izi.fraunhofer.de
Ulrich, Rainer G.	Friedrich-Loeffler-Institut rainer.ulrich@fli.bund.de
von Brunn, Albert	Universität München avonbrunn@mvp.uni-muenchen.de
Wagner, Ralf	Paul-Ehrlich-Institut wagra@pei.de
Weidmann, Manfred	Universität Göttingen mweidma@gwdg.de
Weinheimer, Viola K.	Robert Koch-Institut weinheimerv@rki.de
Wolff, Thorsten	Robert Koch-Institut wolfft@rki.de
Zell, Roland	Universität Jena roland.zell@med.uni-jena.de
Ziegler, Ute	Friedrich-Loeffler-Institut ute.ziegler@fli.bund.de

## Teilnehmerverzeichnis

---

### Teilnehmer

<b>Name</b>	<b>Institution und E-Mail</b>
Abt, Marion	Robert Koch-Institut abtm@rki.de
Achazi, Katharina	Robert-Koch-Institut achazik@rik.de
Ackermann, Mathias	Institut für Virologie, Universität Zürich email@vetvir.unizh.ch
Akineden, Ömer, Dr.	Universität Gießen oemer.akineden@vetmed.uni-giessen.de
Aktories, Klaus	Universität Freiburg klaus.aktories@pharmakol.uni-freiburg.de
Allerberger, Franz	AGES Österreich Franz.Allerberger@ages.at
Auer, Herbert	Medizinische Universität Wien herbert.auer@meduniwien.ac.at
Bangoura, Berit	Universität Leipzig bangoura@vetmed.uni-leipzig.de
Basler, Tina	Tierärztliche Hochschule Hannover tina.basler@tiho-hannover.de
Becher, Dietmar	MICROMUN GmbH becher@micromun.de
Becher, Anne	Charite Annebecher@gmail.com
Berndt, Angela	Friedrich-Loeffler-Institut angela.berndt@fli.bund.de
Bethe, Astrid	Freie Universität Berlin bethe.astrid@vetmed.fu-berlin.de
Beyer, Wolfgang	Universität Hohenheim

	beyer@uni-hohenheim.de
Beykirch, Stefanie	Universität Göttingen stefanie.beykirch@agr.uni-goettingen.de
Blaha, Thomas	Stiftung Tierärztliche Hochschule hannover thomas.blaha@tiho-bakum.de
Borth, Nicole	Leibniz-Institut Jena nicole.borth@hki-jena.de
Brinkmann, Detert	Universität Bonn brinkmann@uni-bonn.de
Burkhardt, Christiane	Erlangen Christiane.Burkhardt1@gmx.net
Buschtöns, Susanne	Friedrich-Loeffler Institut Wusterhausen susanne.buschtöns@tiho-hannover.de
Buschulte, Anja	Bundesinstitut für Risikobewertung anja.buschulte@bfr.bund.de
Cox, Christian	Universität Bonn christian.cox@uni-bonn.de
Cuny, Christiane	Robert Koch Institut cunych@rki.de
Däubener, Walter	Uniklinikum Düsseldorf daeubene@uni-duesseldorf.de
Dieckmann, Ralf	Bundesinstitut für Risikobewertung ralf.dieckmann@bfr.bund.de
Dilcher, Meik	Universitätsmedizin Göttingen virology@medizin.uni-goettingen.de
Dobler, Gerhard	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr gerharddobler@bundeswehr.org
Dorn, Christina	Bundesinstitut für Risikobewertung christina.dorn@bfr.bund.de

## Teilnehmerverzeichnis

---

Dressler, Dirk	Medizinische Hochschule Hannover dressler.dirk@mh-hannover.de
Drexler, Jan Felix	Universität Bonn drexler@virology-bonn.de
Drosten, Christian	Universität Bonn drosten@virology-bonn.de
Erfle, Volker	Helmholtz-Zentrum München erfle@helmholtz-muenchen.de
Espelage, Werner	Bundesinstitut für Risikobewertung espelagew@gmail.com
Essbauer, Sandra	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr sandraessbauer@bundeswehr.org
Essig, Andreas	Universitätsklinikum Ulm andreas.essig@uniklinik-ulm.de
Ewers, Christa	Freie Universität Berlin ewers.christa@vetmed.fu-berlin.de
Fernández Silva, Jorge Arturo	Universität Giessen jorge.a.fernandez-silva@vetmed.uni-giessen.de
Fetsch, Alexandra	Bundesinstitut für Risikobewertung alexandra.fetsch@bfr.bund.de
Fiegl, Dorothee	Friedrich-Loeffler-Institut Tübingen dorothee.fiegl@fli.bund.de
Fischer, Silke	Landesgesundheitsamt BW silke.fischer@rps.bwl.de
Fischer, Janett	IBS fischer@ibs-halle.de
Fischer, Marta	Universität Gießen marta.fischer@vetmed.uni-giessen.de

Forsbach-Birk, Vera	Uniklinik Ulm vera.forsbach-birk@uniklinik-ulm.de
Frangoulidis, Dimitrios	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr DimitriosFrangoulidis@Bundeswehr.org
Fritsch, Isabel	Friedrich-Loeffler-Institut Jena Isabel.Fritsch@fli.bund.de
Gareis, Manfred	Bundesanstalt für Ernährung und Lebensmittel manfred.gareis@mri.bund.de
Gerlach, Gerald-F.	IVD GmbH gerlach@ivd-gmbh.de
Gessler, Frank	Universität Göttingen fgessle@gwdg.de
Goethe, Ralph	Tierärztliche Hochschule Hannover ralph.goethe@tiho-hannover.de
Görllich, Kirsten	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover kirsten.goerlich@tiho-hannover.de
Grasse, Wolfgang	Robert Koch Institut GrasseW@RKI.de
Grobbe, Mirjam	IZW Berlin grobbe@izw-berlin.de
Groß, Uwe	Universitätsmedizin Göttingen ugross@gwdg.de
Große-Herrenthey, Anke	Universität Leipzig agrosse@vetmed.uni-leipzig.de
Haller, Otto	Uniklinikum Freiburg haller.office@uniklinik-freiburg.de
Händel, Ulrike	Universität Magdeburg ulrike.haendel@med.ovgu.de
Hänel, Frank	Leibniz-Institut Jena

## Teilnehmerverzeichnis

---

	frank.haenel@hki-jena.de
Hasib, Lekbira	Universitätsmedizin Göttingen lhasib@gwdg.de
Hassan, Hazem	Universität Göttingen hazemhassan84@yahoo.com
Heblinski, Nikola	Freie Universität Berlin heblinski.nikola@vetmed.fu-berlin.de
Heckenbach, Kirsten	Bundesinstitut für Risikobewertung kirsten.heckenbach@bfr.bund.de
Hedemann, Claudia	Robert Koch-Institut hedemannc@rki.de
Heidemanns, Katrin	Freie Universität Berlin heidemanns.katrin@vetmed.fu-berlin.de
Heirich, Martina	Senatsverw. f. Wirtschaft, Technologie Berlin martina.heirich@senwtf.berlin.de
Helmuth, Reiner	Bundesinstitut für Risikobewertung reiner.helmuth@bfr.bund.de
Henning, Klaus	Friedrich-Loeffler-Institut Wusterhausen klaus.henning@fli.bund.de
Herrler, Georg	Tierärztliche Hochschule Hannover Georg.Herrler@tiho-hannover.de
Herrmann, Daland C.	Friedrich-Loeffler-Institut daland.herrmann@fli.bund.de
Hertwig, Stefan	Bundesinstitut für Risikobewertung stefan.hertwig@bfr.bund.de
Herzog, Petra	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin herzog@bni-hamburg.de
Heuer, Dagmar	MPI für Infektionsbiologie heuer@mpiib-berlin.mpg.de

Hilbert, Angela	Friedrich-Loeffler-Institut Wusterhausen angela.hilbert@fli.bund.de
Hippenstiel, Stefan	Charité Berlin stefan.hippenstiel@charite.de
Hoffmann, Markus	Tierärztliche Hochschule Hannover markus30952@web.de
Hruzik, Andrea	Universitätsmedizin Göttingen ahruzik@gwdg.de
Hufert, Frank T.	Universitätsmedizin Göttingen fhufert@gwdg.de
Jansen-Rosseck, Rolf	Senatsverw. für Gesundheit, Umwelt und Verbraucherschutz Berlin horsecorner1@daad-alumni.de
Janßen, Traute	Freie Universität Berlin janssen.traute@vetmed.fu-berlin.de
Johnson, Alan	Research Management Services International Pty Ltd alanjohnson@rmsinternational.com.au
Junglen, Sandra	Robert Koch-Institut junglens@rki.de
Junker, Barbara	Projekträger im DLR barbara.junker@dlr.de
Kaiser, Melanie	Universität Leipzig melanielpj@googlemail.com
Kaspari, Marion	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) marion.kaspari@bvl.bund.de
Kaspers, Bernd	Universität München kaspers@lmu.de
Keller, Markus	Friedrich-Loeffler-Institut Greifswald markus.keller@fli.bund.de

## Teilnehmerverzeichnis

---

Kimmig, Peter	Universität Hohenheim kimmigpe@uni-hohenheim.de
Klauke, Thorsten	Universität Bonn tnklauke@uni-bonn.de
Knittler, Michael	Friedrich-Loeffler-Institut Tübingen michael.knittler@fli.bund.de
Knoop, Eva	Bundesinstitut für Risikobewertung eva.knoop@bfr.bund.de
Kohl, Claudia	Robert Koch-Institut claukohl@googlemail.com
Kopp, Ursula	Projekträger im DLR Ursula.Kopp@dlr.de
Kopp, Anne	Robert Koch-Institut koppa@rki.de
Köthe, Martin	Universität Leipzig mkoethe@vetmed.uni-leipzig.de
Kothlow, Sonja	Universität München Sonja.Kothlow@lmu.de
Kreienbrock, Lothar	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover lothar.kreienbrock@tiho-hannover.de
Kühlewind, Simone	Uniklinikum Bergmannsheil GmbH, Bochum s.kuehle76@gmx.de
Kuhn, Matthias	CONGEN Biotechnologie GmbH mk@congen.de
Kurth, Andreas	Robert Koch-Institut kurtha@rki.de
Lenzko, Hannah	Friedrich-Loeffler-Institut Jena hannah.lenzko@fli.bund.de
Lesnik, René	Robert Koch-Institut

	lesnikr@rki.de
Levina, Inna	Institut für Medizinische Mikrobiologie Jena innalevina@yahoo.de
Liebler-Tenorio, Elisabeth M.	Friedrich-Loeffler-Institut Elisabeth.Liebler-Tenorio@fli.bund.de
Lüder, Carsten	Universitätsmedizin Göttingen clueder@gwdg.de
Maksimov, Pavlo	Friedrich-Loeffler-Institut pavlo.maksimov@fli.bund.de
Malorny, Burkhard	Bundesinstitut für Risikobewertung burkhard.malorny@bfr.bund.de
Mänzb, Benjamin	Universität Freiburg maenzb@staff.uni-marburg.de
Matthaei, Markus	Robert Koch-Institut matthaeim@rki.de
Meemken, Diana	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover diana.meemken@tiho-hannover.de
Mellmann, Alexander	Universitätsklinikum Münster mellmann@uni-muenster.de
Menge, Christian	Friedrich-Loeffler-Institut christian.menge@fli.bund.de
Meyer-Koenig, Ursula	Universitätsklinikum Freiburg ursula.meyer-koenig@uniklinik-freiburg.de
Moebius, Petra	Friedrich-Loeffler-Institut petra.moebius@fli.bund.de
Mühdorfer, Kristin	IZW muehdorfer@izw-berlin.de
Müller, Hermann	Universität Leipzig virology@vetmed.uni-leipzig.de

## Teilnehmerverzeichnis

---

Müller, Marcel	Universitätsklinikum Bonn muller@virology-bonn.de
Muth, Doreen	Bernhard-Nocht-Institut muth@bni-hamburg.de
Naucke, Torsten	Universität Stuttgart Hohenheim TJNaucke@aol.com
Nedelko, Tatiana	Helmholtz Centre for Infection Research tne08@helmholtz-hzi.de
Neubauer, Heinrich	Friedrich-Loeffler-Institut Jena heinrich.neubauer@fli.bund.de
Niedrig, Matthias	Robert Koch-Institut niedrigm@rki.de
Nitsche, Andreas	Robert Koch-Institut nitschea@rki.de
Nöckler, Karsten	Bundesinstitut für Risikobewertung karsten.noeckler@bfr.bund.de
Ostermann, Carola	Friedrich-Loeffler-Institut carola.ostermann@fli.bund.de
Osterrieder, Klaus	Freie Universität Berlin no.34@fu-berlin.de
Ovelhey, Amely	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover amely.ovelhey@tiho-hannover.de
Överby, Anna K.	Universitätsklinikum Freiburg anna.oeverby@uniklinik-freiburg.de
Pauli, Eva-Katharina	ViroLogik GmbH E.Pauli@virologik.com
Pfefferle, Susanne	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin pfefferle@bni-hamburg.de
Piechotowski, Isolde	Landesgesundheitsamt BW Isolde.Piechotowski@rps.bwl.de

Planz, Oliver	Friedrich-Loeffler Institut oliver.planz@fli.bund.de
Pleschka, Stephan	Universität Gießen stephan.pleschka@mikro.bio.uni-giessen.de
Pleyer, Uwe	Charité Berlin uwe.pleyer@charite.de
Plog, Stephanie	Freie Universität Berlin plog.stephanie@vetmed.fu-berlin.de
Pott, Johanna	Medizinische Hochschule Hannover pott.johanna@mh-hannover.de
Pott, Susan	Universität Leipzig pott@vetmed.uni-leipzig.de
Probst, Carolina	Friedrich-Loeffler-Institut Carolina.Probst@fli.bund.de
Rautenschlein, Silke	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Silke.Rautenschlein@tiho-hannover.de
Reinhold, Petra	Friedrich-Loeffler-Institut petra.reinhold@fli.bund.de
Rödel, Jürgen	Universitätsklinikum Jena juergen.roedel@med.uni-jena.de
Rotter, Björn	GenXPro-GmbH rotter@genxpro.de
Rubbenstroth, Dennis	Tierärztliche Hochschule Hannover Dennis.Rubbenstroth@tiho-hannover.de
Rühe, Ferdinand	Universität Göttingen fruehe@gwdg.de
Rummel, Andreas	Medizinische Hochschule Hannover rummel.andreas@mh-hannover.de
Ruscher, Claudia	Freie Universität Berlin

## Teilnehmerverzeichnis

---

	ruscher.claudia@vetmed.fu-berlin.de
Sachse, Konrad	Friedrich-Loeffler-Institut Jena konrad.sache@fli.bund.de
Schade, Carolin	Universität Leipzig schade@vetmed.uni-leipzig.de
Schares, Gereon	Friedrich-Loeffler-Institut gereon.schares@fli.bund.de
Schell, Jens	Friedrich-Loeffler-Institut jens.schell@fli.bund.de
Schmidtke, Michaela	Universitätsklinikum Jena michaela.schmidtke@med.uni-jena.de
Schrödl, Wieland	Universität Leipzig schroedl@vmf.uni-leipzig.de
Schulze, Steffen	MICROMUN GmbH schulze@micromun.de
Schwagerick, Birgit	Rindergesundheitsdienst Tierseuchenkasse schwagerick@googlemail.com
Schwan, Carsten	Universität Freiburg carsten.schwan@pharmakol.uni-freiburg.de
Schwarz, Sabine	Friedrich-Loeffler-Institut Wusterhausen Sabine.Schwarz@fli.bund.de
Schwarzbach, Anita	BVL anita.schwarzbach@bvl.bund.de
Schwemmler, Martin	Universität Leipzig martin.schwemmler@uniklinik-freiburg.de
Seeger, Torsten	Universität Gießen torsten.seeg@vetmed.uni-giessen.de
Semmler, Torsten	Freie Universität Berlin semmler.torsten@vetmed.fu-berlin.de

Seyboldt, Christian	Friedrich-Loeffler-Institut christian.seyboldt@fli.bund.de
Spekker, Katrin	Universität Düsseldorf Spekker@uni-duesseldorf.de
Splettstoesser, Wolf	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr wolfsplettstoesser@bundeswehr.org
Stäheli, Peter	Universität Freiburg peter.staeheli@uniklinik-freiburg.de
Ständer, Norman	Universität Leipzig staender@vetmed.uni-leipzig.de
Stark, Klaus	Robert Koch-Institut starkk@rki.de
Sterthoff, Charlott	Universität Bielefeld cstertho@cebitec.uni-bielefeld.de
Straubinger, Reinhard K.	Universität München R.Straubinger@lmu.de
Strotmeier, Jasmin	Medizinische Hochschule Hannover strotmeier.jasmin@mh-hannover.de
Sutor, Astrid	Friedrich-Loeffler-Institut Wusterhausen Astrid.Sutor@fli.bund.de
Takács, Anna Claudia	Institut für med. Mikrobiologie Göttingen atakacs@gwdg.de
Taute, Stefanie	Robert Koch-Institut steffi_taute@yahoo.de
Tedin, Karsten	Freie Universität Berlin tedin.karsten@vetmed.fu-berlin.de
Tenhagen, Bernd-Alois	Bundesinstitut für Risikobewertung Bernd-Alois.Tenhagen@bfr.bund.de
Tenter, Astrid M.	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Astrid.M.Tenter@vetmed.uni-giessen.de

## Teilnehmerverzeichnis

---

Ulbert, Sebastian	Fraunhofer Institut IZI, Leipzig sebastian.ulbert@izi.fraunhofer.de
Ulrich, Rainer G.	Friedrich-Loeffler-Institut rainer.ulrich@fli.bund.de
von Brunn, Albrecht	Max-von-Pettenkofer-Institut/LMU München avonbrunn@mvp.uni-muenchen.de
Wagner, Ralf	Paul-Ehrlich-institut wagra@pei.de
Wagner, Martin	Institut für Milchhygiene, Department für Nutztiere und Öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin martin.wagner@vetmeduni.ac.at
Wang, Zhongfang	Universität Gießen zhongfang.wang@med.uni-giessen.de
Weidmann, Manfred	Universitätsmedizin Göttingen virology@medizin.uni-goettingen.de
Weigoldt, Mathias	Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover weigoldt@gmx.de
Weinheimer, Viola	Robert-Koch-Institut weinheimerv@rki.de
Weiss, Siegfried	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung siegfried.weiss@helmholtz-hzi.de
Wieler, Lothar	Freie Universität Berlin wieler.lothar@vetmed.fu-berlin.de
Wolf, Katharina	Universitätsklinikum Jena katharina.wolf1@med.uni-jena.de
Wölfel, Roman	Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr romanwoelfel@bundeswehr.org
Zell, Roland	Institut für Virologie und Antivirale Therapie Roland.Zell@med.uni-jena.de

Ziegler, Ute

Friedrich-Loeffler-Institut Greifswald  
ute.ziegler@fli.bund.de

Zielecki, Florian

Robert Koch-Institut  
zieleckif@rki.de

### **Koordinatoren der BMBF-geförderten Zoonosenverbände**

#### **Verbund Arboviren**

Prof. Dr. med. Frank T. Hufert

Institut für Virologie,  
Universitätsmedizin der Georg-August-  
Universität Göttingen,  
Kreuzberggring 57, 37075 Göttingen  
Tel.: 0551 395 872  
Fax: 0551 394 471  
fhufert@gwdg.de

#### **Verbund Botulinom**

Prof. Dr. Dr. Helge Böhnelt

Fakultät für Agrarwissenschaften  
Institut für Pflanzenbau und Tierproduktion  
in den Tropen und Subtropen  
Georg-August-Universität,  
Marie-Curie-Str. 7, 37079 Göttingen  
Tel.: 0551 49566813  
Fax: 0551 49566811  
hboehne@gwdg.de

#### **Verbund FBI-Zoo**

Prof. Lothar H. Wieler

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen,  
Freie Universität Berlin,  
Phillipstraße 13, 10115 Berlin  
Tel.: 030 2093 6300  
Fax: 030 2093 6067  
wieler.lothar@vetmed.fu-berlin.de

#### **Verbund FluResearchNet**

Prof. Dr. Stephan Ludwig

Institut für Molekulare Virologie, Zentrum für  
Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE),  
Universität Münster, Von-Esmarch-Straße 56,  
48149 Münster  
Tel.: 0251 835 7791  
Fax: 0251 835 7793  
ludwigs@uni-muenster.de

### **Verbund Q-Fieber**

Prof. Dr. Heinrich Neubauer

Institut für bakterielle Infektionen und  
Zoonosen, Friedrich-Loeffler-Institut,  
Naumburger Str. 96a, 07743 Jena  
Tel.: 03641 804 200  
Fax: 03641 804 228  
heinrich.neubauer@fli.bund.de

### **Verbund SARS**

Prof. Dr. Christian Drosten

Institut für Virologie, Rheinische Friedrich  
Wilhelms-Universität Bonn,  
Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn  
Tel.: 0228 2871 1055  
Fax: 0228 2871 4433  
drosten@virology-bonn.de

### **Verbund TOXONET01**

Prof. Dr. Dirk Schlüter

Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Otto von Guericke Universität Magdeburg,  
Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg  
Tel.: 0391 67 13317  
Fax: 0391 67 290717  
dirk.schlueter@med.ovgu.de

### **Verbund ZooMAP**

Prof. Dr. Ralph Goethe

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen,  
Zentrum für Infektionsbiologie,  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover,  
Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover  
Tel.: 0511 856 7625  
Fax. 0511 856 7697

ralph.goethe@tiho-hannover.de

## **Verbund Zoonotische Chlamydien**

Dr. Konrad Sachse

Institut für molekulare Pathogenese,  
Nationales Referenzlabor für Psittakose,  
Friedrich-Loeffler-Institut,  
Naumburger Str. 96a, 07743 Jena  
Tel.: 03641 804 334  
Fax: 03641 804 228  
konrad.sachse@fli.bund.de

## **Geschäftsstelle der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen**

Standort BERLIN

c/o Telematikplattform für Medizinische  
Forschungsnetze e.V. (TMF)  
Neustädtische Kirchstraße 6  
10117 Berlin  
Tel.: 030 - 310 119 70  
Fax: 030 - 310 110 99  
Internet: [www.tmf-ev.de](http://www.tmf-ev.de)

Standortleiter  
Wiss. Referentin  
Sachbearbeiterin

Sebastian Claudius Semler  
Dr. Ilia Semmler  
Nadine Sept

Standort MÜNSTER

c/o Institut für Molekulare Virologie (IMV)  
Zentrum für Molekularbiologie der  
Entzündung (ZMBE)  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Von-Esmarch-Str. 56  
48149 Münster  
Tel.: 0251 - 835 30 11  
Fax: 0251 - 835 77 93  
Internet: <http://zmbe.uni-muenster.de>

Standortleiter  
Wiss. Referentin  
Sachbearbeiterin

Prof. Dr. Stephan Ludwig  
Dr. Gerlinde Benninger  
Vanessa Hugo

Standort GREIFSWALD-INSEL  
RIEMS

c/o Friedrich-Loeffler-Institut

Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

## Teilnehmerverzeichnis

---

Standortleiter  
Wiss. Referentin  
Informationstechnikerin  
Sachbearbeiterin

Institut für Neue und Neuartige  
Tierseuchenerreger (INNT)  
Südufer 10  
17493 Greifswald - Insel Riems  
Tel.: 038351 - 7145  
Fax: 038351 - 7194  
Internet: [www.fli.bund.de](http://www.fli.bund.de)  
Prof. Dr. Martin Groschup  
Anke Wiethölter  
Cathleen Plötz  
Claudia Nittke