



Year: 2003

Die Myxomatose des Kaninchens : serologische und molekularbiologische Nachweisverfahren : epidemiologische Situation in der Schweiz

Rutz, Corinne

Abstract: Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einsatz serologischer und molekular-biologischer Nachweisverfahren zu prüfen sowie die epidemiologische Situation der Myxomatose während der letzten zwanzig Jahre in der Schweiz zu beurteilen. Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass der Rückgang der Myxomatose durch die sinkende Zahl der Wildkaninchen in der Schweiz bedingt war. Die enge Verknüpfung der Seuchenzüge wies auf ein endemisches Vorkommen der Myxomatose innerhalb der Wildkaninchenpopulation hin. Ein Wiederanstieg von Myxomatose-Fällen in der Zukunft wird von der Entwicklung der Wildpopulation und der Vektorsituation abhängig sein. Mittels PCR und Klonierung der Amplifikate wurde das Serp 2-Gen dreier Myxoma-Virus-Stämme sequenziert. Der Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Stämmen Lausanne und Uriarra zeigte, dass Serp 2 nur wenigen Mutationen unterworfen und somit hochkonserviert ist. Zusätzlich wurden unverdächtige sowie histologisch bestätigte Organproben in der PCR untersucht. Unverdächtige Proben ergaben ein negatives Resultat; bei 25% der histologisch bestätigten Proben konnte Virus-DNS nachgewiesen werden. Zwei ELISA-Testsysteme wurden hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität im Vergleich zum Plaquereduktionstest geprüft. Beide ELISA's zeigten eine deutlich niedrigere Spezifität. Aufgrund dieser Resultate erwies sich die PCR als mässig geeignet zum Nachweis von Myxoma- Virus-DNS in Hautproben, da nur während weniger Tage eine detektierbare Erreger-Menge in der Haut vorhanden ist. Die serologische Untersuchung von Serumproben mittels ELISA eignet sich aufgrund der niedrigen Spezifität nur für das Screening klinisch erkrankter Tiere auf Herdenbasis und nicht für die Einzeltierdiagnostik. Dazu wäre die Verbesserung des Verfahrens mittels Einsatz monoklonaler Antikörper notwendig. The aim of this study was to examine serological and molecular detection systems for myxomatosis and to review the epidemiological situation of the disease in Switzerland during the past twenty years. The epidemiological studies showed that the decrease of myxomatosis was due to the decreasing number of wild rabbits. The correlation of the epidemics indicated that myxomatosis is endemic in the wild rabbit population. A possible increase of myxomatosis in the future will depend on the development of the rabbit population and the vectors. The Serp-2 gene of three Myxoma virus strains was sequenced by PCR and cloning the amplification products. When compared with the strains Lausanne and Uriarra described in the literature it was evident that the gene has been subjected to fewer mutations and is highly conserved. Additionally, histologically confirmed tissue samples and several unsuspecting samples were tested by PCR. Unsuspecting tissues were negative and virus DNA was detected in 25% of the histologically positive samples. Two ELISA systems were tested and compared with the plaque reduction test in regard to specificity and sensitivity. Both ELISAs were markedly less specific. These findings indicated that PCR is an unsuitable method for the detection of Myxoma virus DNA in the skin since detectable virus quantities remain there for only a few days. ELISA may be used for the screening of animals on a herd basis, but not for the diagnosis in individual animals. Monoclonal antibodies would improve the procedure.

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-163104>
Dissertation
Published Version

Originally published at:

Rutz, Corinne. Die Myxomatose des Kaninchens : serologische und molekularbiologische Nachweisverfahren : epidemiologische Situation in der Schweiz. 2003, University of Zurich, Vetsuisse Faculty.

Institut für Veterinärbakteriologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der
Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. M. M. Wittenbrink

**DIE MYXOMATOSE DES KANINCHENS:
SEROLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE
NACHWEISVERFAHREN
EPIDEMIOLOGISCHE SITUATION IN DER SCHWEIZ**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Corinne Rutz
Tierärztin von Krummenau (SG)

genehmigt auf Antrag von
PD Dr. med. vet. Richard Hoop, Referent
PD Dr. med. vet. Monika Engels, Korreferentin

Zürich 2003

RUTH, PEPI UND MARKUS

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	6
2. SUMMARY	7
3. EINLEITUNG	8
4. LITERATURÜBERSICHT	9
4.1. TAXONOMIE UND MORPHOLOGIE	9
4.2. REPLIKATION	11
4.3. IMMUNMODULATORISCHE PROTEINE	12
4.4. INFEKTION UND PATHOGENESE	14
4.5. KLINISCHER VERLAUF	15
4.6. DIAGNOSTIK	17
4.6.1. PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE UND HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN	17
4.6.2. DIREKTER ERREGERNACHWEIS	19
4.6.3. INDIREKTER ERREGERNACHWEIS	21
4.7. EPIDEMIOLOGIE	22
4.8. VERBREITUNG	23
4.8.1. SITUATION IN EUROPA	23
4.9. BEKÄMPFUNG	24
4.9.1. ALLGEMEINE MASSNAHMEN	24
4.9.2. MASSNAHMEN IN DER SCHWEIZ	24
5. MATERIAL UND METHODEN	25
5.1. EPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	25
5.2. ORGANMATERIAL	25
5.3. VIRUSSTÄMME	25
5.4. ZELLKULTUREN	26
5.5. AUFBEREITUNG VON ORGANMATERIAL	26
5.6. VIRUSREINIGUNG	27
5.7. PROTEINBESTIMMUNG	27
5.8. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	28
5.8.1. PROBENAUFBEREITUNG AUS ZELLKULTURMATERIAL	28
5.8.2. PROBENAUFBEREITUNG AUS ORGANMATERIAL	28
5.8.3. ISOLIERUNG VIRALER DNS	28
5.8.4. AUSWAHL DER PRIMER FÜR DAS SERP 2-PROTEIN-GEN (PETIT ET AL., 1996)	29
5.8.5. DURCHFÜHRUNG DER PCR	30
5.9. KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN	30
5.10. ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS ("PLASMIDSCHNELLTEST")	31
5.11. SEQUENZIERUNGEN	32
5.12. DATENANALYSEN	32

5.13. GEWINNUNG VON IMMUNSEREN	33
5.14. SERUMPROBEN	34
5.15. PLAQUEREDUKTIONSTEST	35
5.16. ELISA 1	36
5.17. ELISA 2	37
5.17.1 TESTPRINZIP	37
5.17.2. TESTDURCHFÜHRUNG	38
5.17.3. PRÄADSORPTION	38
5.17.4. AUSWERTUNG	39
5.18. WESTERN BLOT	40
5.18.1. SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	41
5.18.2. WESTERN BLOT-ASSAY	41
6. RESULTATE	43
6.1. SITUATION IN DER SCHWEIZ	43
6.2. MASSNAHMEN IN SEUCHENFÄLLEN	44
6.3. VIRUSVERMEHRUNG IN AFFENNIEREN-ZELLEN (MA 104)	46
6.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	47
6.4.1. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) ZUR AMPLIFIZIERUNG DES SERP 2-GENS	47
6.4.2. KLONIERUNG DER PCR-AMPLIFIKATE FÜR DIE SEQUENZIERUNG	48
6.4.3. NUKLEOTID – UND AMINOSÄURESEQUENZEN DES SERP 2-GENS	49
6.5. SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	55
6.5.1. PLAQUEREDUKTIONSTEST, ELISA 1 UND ELISA 2	55
6.5.2. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER ELISA-TESTSYSTEME IM VERGLEICH ZUM PLAQUEREDUKTIONSTEST	57
6.5.3. ANHAND VON NEGATIV- UND POSITIVSEREN ERMITTELTE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT	59
6.5.4. VIERFELDER-TEST (MCNEMAR)	60
6.6. WESTERN BLOT	61
6.6.1. SPEZIFITÄTSKONTROLLE	61
6.6.2. VERGLEICH DETEKTIERTER PROTEINBANDEN	61
7. DISKUSSION	64
7.1. EPIDEMIOLOGISCHE SITUATION IN DER SCHWEIZ	64
7.2. MV-ISOLATE UND SHOPE FIBROMA-VIRUS IN DER ZELLKULTUR	66
7.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	68
7.3.1. CHARAKTERISIERUNG VON MV-ISOLATEN	68
7.3.2. DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION IN DER ROUTINEDIAGNOSTIK	68
7.4. SEROLOGISCHE METHODEN	70
7.4.1. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	70
7.4.2. WESTERN BLOT-ASSAY	72
7.5. MÖGLICHKEITEN DER BEKÄMPFUNG	73
7.5.1. PROPHYLAXE DURCH IMPFUNG?	73

7.5.2.	EFFIZIENTERE BEKÄMPFUNG DURCH SEROLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	75
8.	LITERATURVERZEICHNIS	76
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	88
10.	VERDANKUNGEN	90
11.	LEBENS LAUF	91

1. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einsatz serologischer und molekularbiologischer Nachweisverfahren zu prüfen sowie die epidemiologische Situation der Myxomatose während der letzten zwanzig Jahre in der Schweiz zu beurteilen.

Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass der Rückgang der Myxomatose durch die sinkende Zahl der Wildkaninchen in der Schweiz bedingt war. Die enge Verknüpfung der Seuchenzüge wies auf ein endemisches Vorkommen der Myxomatose innerhalb der Wildkaninchenpopulation hin. Ein Wiederanstieg von Myxomatose-Fällen in der Zukunft wird von der Entwicklung der Wildpopulation und der Vektorsituation abhängig sein.

Mittels PCR und Klonierung der Amplifikate wurde das Serp 2-Gen dreier Myxoma-Virus-Stämme sequenziert. Der Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Stämmen Lausanne und Uriarra zeigte, dass Serp 2 nur wenigen Mutationen unterworfen und somit hochkonserviert ist. Zusätzlich wurden unverdächtige sowie histologisch bestätigte Organproben in der PCR untersucht. Unverdächtige Proben ergaben ein negatives Resultat; bei 25% der histologisch bestätigten Proben konnte Virus-DNS nachgewiesen werden.

Zwei ELISA-Testsysteme wurden hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität im Vergleich zum Plaquereduktionstest geprüft. Beide ELISA's zeigten eine deutlich niedrigere Spezifität.

Aufgrund dieser Resultate erwies sich die PCR als mässig geeignet zum Nachweis von Myxoma-Virus-DNS in Hautproben, da nur während weniger Tage eine detektierbare Erreger-Menge in der Haut vorhanden ist. Die serologische Untersuchung von Serumproben mittels ELISA eignet sich aufgrund der niedrigen Spezifität nur für das Screening klinisch erkrankter Tiere auf Herdenbasis und nicht für die Einzeltierdiagnostik. Dazu wäre die Verbesserung des Verfahrens mittels Einsatz monoklonaler Antikörper notwendig.

2. SUMMARY

The aim of this study was to examine serological and molecular detection systems for myxomatosis and to review the epidemiological situation of the disease in Switzerland during the past twenty years.

The epidemiological studies showed that the decrease of myxomatosis was due to the decreasing number of wild rabbits. The correlation of the epidemics indicated that myxomatosis is endemic in the wild rabbit population. A possible increase of myxomatosis in the future will depend on the development of the rabbit population and the vectors.

The Serp 2 gene of three Myxoma virus strains was sequenced by PCR and cloning the amplification products. When compared with the strains Lausanne and Uriarra described in the literature it was evident that the gene has been subjected to fewer mutations and is highly conserved. Additionally, histologically confirmed tissue samples and several unsuspecting samples were tested by PCR. Unsuspecting tissues were negative and virus DNA was detected in 25% of the histologically positive samples.

Two ELISA systems were tested and compared with the plaque reduction test in regard to specificity and sensitivity. Both ELISAs were markedly less specific.

These findings indicated that PCR is an unsuitable method for the detection of Myxoma virus DNA in the skin since detectable virus quantities remain there for only a few days. ELISA may be used for the screening of animals on a herd basis, but not for the diagnosis in individual animals. Monoclonal antibodies would improve the procedure.

3. EINLEITUNG

Durch das vermehrte Auftreten der Myxomatose in der Schweiz im Spätsommer und Herbst 1999 ist man auf diese anzeigepflichtige Tierseuche wieder aufmerksam geworden. Die Myxomatose ist eine Viruserkrankung des Kaninchens, die meist zum Tod führt. Betroffene Bestände müssen laut geltendem Tierseuchengesetz ausgemerzt werden. Für Züchter bedeutet dies den wirtschaftlichen und persönlichen Verlust wertvoller Rassetiere. Die Einschleppung dieser Erkrankung erfolgt durch die Einwanderung von Wildkaninchen sowie durch den Import infizierter Tiere. Zur Verhinderung der Verschleppung von Myxomatose-Viren in der Schweiz kommt einem effizienten diagnostischen Verfahren eine wichtige Bedeutung zu. Mit den bis heute zur Verfügung stehenden Methoden sind aber weder eine effiziente Untersuchung betroffener Bestände noch eine Analyse der aktuellen Seuchenlage möglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Daten zur epidemiologischen Situation in der Schweiz während der letzten zwanzig Jahre zu erheben sowie neue serologische und molekularbiologische Nachweismethoden zu prüfen. Zwei ELISA-Testsysteme wurden mit dem auf Zellkulturen basierenden Plaquereduktionstest verglichen. Zusätzlich wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Virus-DNS aus klinischem Organmaterial evaluiert.

Vorschläge zu möglichen Nachweismethoden und zukünftigen Bekämpfungsmassnahmen werden vorgestellt.

4. LITERATURÜBERSICHT

4.1. TAXONOMIE UND MORPHOLOGIE

Die Pockenviren sind in die Familie der *Poxviridae* (Francki et al., 1991) eingeteilt und gehören zu den grössten bekannten Viren (200x400nm). Die Familie der Poxviridae umfasst die Subfamilien Chordopoxvirinae (Vertebratenviren) und Entomopoxvirinae (Insektenviren). Das Myxoma-Virus ist innerhalb der Vertebratenviren im Genus Leporipoxvirus eingeteilt. Ein weiterer wichtiger Vertreter desselben Genus ist das Shope fibroma-Virus, welches eine hohe antigenetische Verwandtschaft mit Myxoma-Virus besitzt. Das ebenfalls bekannte Kaninchenpocken-Virus gehört zum Genus der Orthopoxviren.

Die acht Genera der Chordopoxvirinae sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1 Einteilung der Subfamilie

Unterfamilie	Genus	Virus
Chordopoxvirinae	Orthopoxvirus	Kuhpocken, Affenpocken Kaninchenpocken , Kamelpocken
	Parapoxvirus	Pseudokuhpocken, Stomatitis papulosa
	Avipoxvirus	Kanarienspocken, Taubenspocken, Hühnerspocken, Trutenpocken
	Capripoxvirus	Schafpocken, Ziegenpocken
	Leporipoxvirus	Myxoma-Virus (MV) , Shope fibroma-Virus
	Suipoxvirus	Schweinepocken
	Yatapoxvirus	Tanapocken, Yabapocken
	Molluscipoxvirus	

Die Pockenviren sind grosse, ovale bis backsteinförmige Partikel. Aufnahmen im Ultradünnschnitt zeigen eine komplexe Struktur aus einem zentral liegenden bikonkaven Innenkörper (Core) und zwei anliegenden Lateralkörpern (Epstein, 1958). Die äussere Begrenzung des Virions stellt eine dichte, aus Lipoproteinen bestehende Doppelmembran dar. Die Hülle besitzt auf ihrer äusseren Oberfläche filamentöse Proteinstrukturen (Oberflächenfilamente) von 5-7nm Durchmesser.

Das Core enthält das Virusgenom, welches aus einer linearen, doppelsträngigen DNS mit einem GC-Gehalt von ca. 36% besteht (Goebel et al., 1990). Die Länge des MV Genoms liegt zwischen 162 und 163 Kilobasenpaaren (Russell et al., 1989; Cabirac et al., 1985; Cameron et al., 1999). Im zentralen Bereich des Genoms liegen die meisten für die Replikation essentiellen Gene (Goebel et al., 1990). Die beiden DNS-Stränge formen an jedem Ende sog. "hairpin loops" und sind über diese kovalent miteinander verbunden (Baroudy et al., 1982). Sie entstehen durch inkomplette Basenpaarungen und kommen in zwei untereinander komplementären und umgekehrten, isomeren Formen vor (Moss, 1985). Der Adenin- und Thymingehalt dieser Bereiche liegt bei 56,4% und ist damit kleiner als bei anderen bekannten Pockengenomen (Goebel et al., 1990). An beiden Enden folgen Richtung Genomzentrum die "inverted terminal repeats" (ITR). Es handelt sich dabei um identische, aber gegensätzlich orientierte Nukleinsäuresequenzen (Garon et al., 1978; Pickup et al., 1982; Esposito und Knight, 1985). Sie weisen bei MV eine Länge von 11,5 kbp auf (Cabirac et al., 1985). In diesen Bereichen sind Gene lokalisiert, welche für phänotypische Eigenschaften wie z.B. Wirtsspektrum, Pockenmorphologie auf der Chorioallantoismembran von Hühnereiern oder für Plauegrösse auf Zellkulturen codieren (Wittek, 1982; Pickup et al., 1986; Paez et al., 1987; Martinez-Pomares et al., 1993).

4.2. REPLIKATION

Die Replikation der Pockenviren ist zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt.

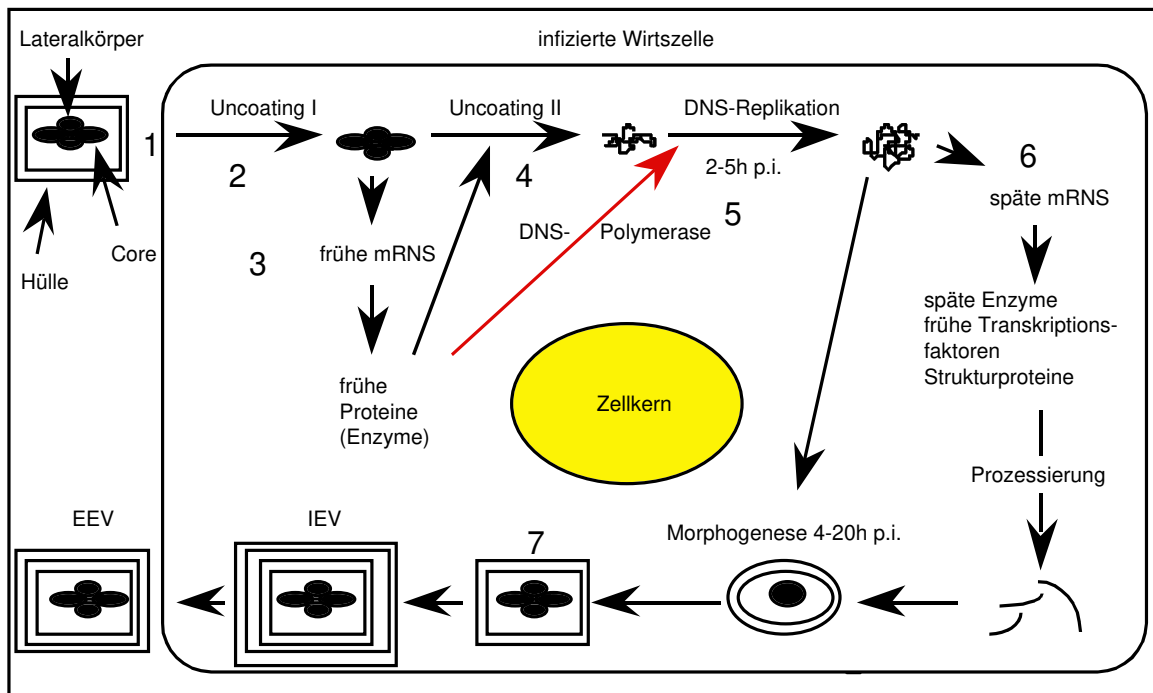


Abb. 1 Replikationszyklus (nach Moss, 1985)

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1. Einschleusen des Virus in die Zelle | 5. DNS-Replikation |
| 2. Freisetzung des viralen Cores | 6. Expression der späten Gene |
| 3. Expression der frühen Gene | 7. Zusammenbau und Ausschleusung |
| 4. Freisetzung der Virus-DNS | des reifen Viruspartikels |

Die DNS-Replikation bei Pockenviren findet im Gegensatz zu anderen DNS-Viren im Zytoplasma in den sog. "viral factories" (auch "Guarnieri-bodies" oder Einschlusskörperchen vom Typ B) statt. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden Hinweise für eine Beteiligung des Zellkerns an der Replikation. So wurde sowohl virale DNS als auch RNS im Zellkern infizierter Zellen identifiziert (LaColla und Weissbach, 1975; Minnegan und Moyer, 1985).

Untersuchungen an enukleierten Zellen zeigten jedoch, dass ausschliesslich viruseigene Enzyme und Faktoren für die Replikation verwendet werden (Prescott et al., 1971; Pennington und Follett, 1974). Sie beginnt zwei Stunden nach der Infektion und erreicht 10-12 Stunden danach ein Plateau (Moss, 1990).

Abhängig von Virusstamm und Zellkultur verlassen 1 bis 30% der reifen Viruspartikel die Zelle durch Fusion der äussersten Hülle mit der Zellmembran (Payne und Kristensson, 1985). Die so aus der Zelle freigesetzten Virionen werden EEV genannt ("extracellular enveloped virus"). Die Mehrzahl der Viruspartikel wird ohne zusätzliche Hülle durch Zytolyse frei.

4.3. IMMUNMODULATORISCHE PROTEINE

Die Fähigkeit vieler Viren, sich innerhalb eines immunkompetenten Wirtes zu replizieren, resultiert aus dem Vermögen, ihre Erkennung durch das wirtseigene Immunsystem zu vermeiden (Barrett et al., 2001). Eine charakteristische Eigenschaft des Myxomatose-Virus ist es, die spezifischen Abwehrmechanismen des Wirtes mithilfe viruseigener Virulenzfaktoren herabzusetzen (Macen et al., 1993). Eine Komponente besteht in der Produktion virus-codierter und von der infizierten Zelle sezernierter Proteine, die spezifische Rezeptoren oder Cytokine des Wirtes imitieren, die andere auf intrazellulären Virusproteinen, welche direkt die antivirale Immunantwort verzögern und die Kommunikation der Zelle mit dem Immunsystem verhindern (Nash et al., 1999). Bis 1995 wurden fünf dieser Immunmodulatoren beschrieben (McFadden et al., 1995) und mit Hilfe detaillierter Studien im Bereich der ITR und in einer kleinen Region innerhalb des „central core“ auf dem Genom lokalisiert (Barrett et al., 2001).

MGF („myxoma growth factor“) und **M11L**, ein rezeptorähnliches Oberflächenprotein (Graham et al., 1992), stellen die Expression zweier in Tandemanordnung liegender Virulenzgene auf dem Genom dar (Opgenorth et al., 1992). MGF gehört zu den Virokinen, vergleichbar mit dem zellulären, homologen EGF und ist mitverantwortlich für die fibroblastische Proliferation der Haut bei nodulären Formen der Myxomatose (McFadden und Graham, 1994). M11L, wie auch **M-T2**, eine homologe Rezeptor-Form des Tumor-Nekrose-Faktors, hemmen die Apoptose infizierter T-Lymphozyten (Macen et al., 1996). Das 1992 von Upton und Mitarbeitern beschriebene ORF des **M-T7**-Gens codiert für ein 37kDa-Protein mit signifikanten Sequenzhomologien gegenüber humanen und murinen Interferon- γ -Rezeptoren. Durch die Bindung an IFN- γ , einem der

wichtigsten Zytokine, hemmt es dessen biologische Aktivität (Upton et al., 1992) bei der Immunantwort des Wirtes.

1990 charakterisierten Upton und Mitarbeiter das erste dreier serpin-ähnlicher Proteine: **Serp 1**. Es wird als spätes Gen exprimiert und codiert für ein 55kDa-Protein (Macen et al., 1993). Durch Komplexbildung mit verschiedenen fibrinolytischen Enzymen blockiert es deren Funktion und hemmt den ersten Schritt in der Komplementkaskade (Lomas et al., 1993). Die Deletion des Serp 1-Gens im Virus resultiert in einer deutlichen Minderung der Virulenz, so dass über 50% der infizierten Tiere überleben. Histologische Untersuchungen bestätigten die ausbleibende antiinflammatorische Wirkung von Serp1 durch eine signifikant stärkere Entzündungsreaktion des Gewebes (Macen et al., 1993). Petit und Mitarbeiter lokalisierten 1996 über einen selektierten Klon den ORF für ein 34kDa-Protein mit starken Sequenzhomologien zur Serpinfamilie. **Serp 2** bindet spezifisch an Interleukin-1 β , verhindert damit die Spaltung von pro-IL-1 β durch Protease (Petit et al., 1996) und hemmt die Entzündungsantwort. Experimente mit Serp 2-deletierten Viren zeigten, dass sie sich in Zellkulturen mit CD4⁺-Lymphozyten problemlos replizieren, bei Inokulation in lebende Tiere verglichen mit dem Wildtyp aber hochattenuiert sind (Messud-Petit et al., 1998). In histologischen Schnitten sind, wie bei Serp1 massive Entzündungsreaktionen zu sehen (Messud-Petit et al., 1998), zu dem scheint Serp 2 die Apoptose infizierten Lymphozyten innerhalb drainierender Lymphknoten zu hemmen (Messud-Petit et al., 1998). Während die ersten beiden Serpine stark homolog sind, zeigt das dritte Protein, **Serp 3**, das zwischen Serp 2 und Serp 1 auf dem Genom liegt, signifikante Sequenzdeletionen. Molekulare Modellstudien lassen aber vermuten, dass die serpintypische Sekundär- und Tertiärstruktur vollständig erhalten ist. Eine Inaktivierung des Gens führt zu einer deutlichen Schwächung der Virulenz verbunden mit der limitierten Verbreitung im Organismus. Das klinische und histologische Hauptmerkmal ist deshalb das Fehlen von sekundären Myxomen (Guerin et al., 2001).

4.4. INFEKTION UND PATHOGENESE

Blutsaugende Insekten (Anopheles-, Aedes- und Culex-Arten, Flöhe, Milben und Zecken) sind die Hauptvektoren der Myxomatose. Sie übertragen das Virus mit ihren Mundwerkzeugen beim Stechakt (Knorr, 1978). Die direkte Übertragung erfolgt durch gegenseitiges Berühren und Beschnuppern. Eintrittspforten des Virus sind dabei Läsionen der äusseren Haut, die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes und der Genitalien sowie die Augen. Weitere Verschleppungsmöglichkeiten sind der Mensch, kontaminierte Futtermittel (vor allem Grünfutter) und Stallgeräte (Knorr, 1978).

Nach einer initialen Virusreplikation in der Inokulationsstelle (Best et al., 2000) verteilt sich der Erreger in der Haut und in den regionalen Lymphknoten (Fenner und Woodroffe, 1953). Die darauffolgende transiente Virämie führt zur Ausbreitung des Virus in Milz, Lunge, Leber, Hoden und Haut (Best und Kerr, 2000). Sekundäre Virusläsionen in der Haut und Schleimhaut, die 6-8 Tage p.i. einen Virustiter von bis zu 10^6 pfu/g aufweisen, sind entscheidend für die Weiterverbreitung der Krankheit (Best und Kerr, 2000).

Der Befall epidermaler Zellen führt zu Zellproliferation und -lyse, verbunden mit entzündlicher Infiltration und Oedembildung (Hurst, 1937). Verantwortlich für die exzessive Proliferation sind Wachstumsfaktoren des Virus (McFadden and Graham, 1994). Die Schädigung des betroffenen Gewebes erklärt nach Mims (1964) nicht die Letalität des Virus. Die durch die zunehmende Schwellung der Augenlider erschwerte Sicht und damit auch reduzierte Futteraufnahme führt zu Auszehrung und zur Schwächung des Immunsystems. Es kommt zusätzlich zu sekundären Infektionen, vor allem des Respirationstraktes (Hobbs, 1928; McFadden et al., 1995; Best und Kerr, 2000). *Pasteurella multocida* ist der häufigste aus der Lunge isolierte Keim (Marlier et al., 2000b). Überlebende Tiere entwickeln einen über ein Jahr andauernden Immunschutz.

4.5. KLINISCHER VERLAUF

Akute Form: Die ersten Symptome treten zwischen dem 2. und 5. Tag p.i. auf (Knorr, 1978). Es entwickelt sich eine seromuköse Blepharokonjunktivitis mit massiver Anschwellung der Augenlider (Schulz und Völker, 1962; Knorr, 1978; Kötsche und Gottschalk, 1990). In diesem Stadium besteht eine hohe Lichtempfindlichkeit (Kötsche und Gottschalk, 1990). Im weiteren Verlauf kommt es zu generalisierten Krankheitserscheinungen in Form von knotigen Anschwellungen (Myxödeme) der Unterhaut im Bereich des Kopfes, der Nase und des Ohrgrundes (Rieck, 1953; Schulte und Scholz, 1954; Schultze-Petzold, 1953) (Abb. 2). Beim männlichen Tier wird eine Verdickung des Skrotums, des Präputiums sowie eine Orchitis (Rieck, 1953), beim weiblichen Tier eine Anschwellung der Vulva beschrieben (Schulte und Scholz, 1954). Selten kommt es auch zu Schwellungen im Krallenbett. Gleichzeitig entwickeln sich feste Knötchen in der Rücken- und Lendengegend sowie an den distalen Extremitäten, welche nach einigen Tagen ulzerieren können (Knorr, 1978). Das Haarkleid ist über den Knötchen und den geschwollenen Körperregionen noch vorhanden, aber gelichtet (Schulz und Völker, 1962). Auf dem Höhepunkt der Erkrankung, zwischen dem 9. und 11. Tag, kommt es zu Apathie und Atemstörungen (Rieck, 1953). Die Tiere verenden geschwächt und abgemagert nach einer Krankheitsdauer von ca. 1-2 Wochen (Schoop, 1954). Der Appetit bleibt in der Regel bis wenige Tage vor dem Tod erhalten (Müller-Using, 1953).

Perakute Form: Bei Verlaufsformen, wie sie auf dem Höhepunkt eines Seuchenzuges beobachtet werden können, dauert die Erkrankung nur wenige Tage, so dass sich klinische und pathologische Erscheinungsbilder häufig nicht ausgeprägt darstellen (Kötsche und Gottschalk, 1990).

Protrahierte Form: Im Verlauf einer Epizootie kann die Virulenz eines Stammes abnehmen, so dass es zu einem veränderten, atypischen Krankheitsbild kommt (Kaaden, 2002; Kötsche und Gottschalk, 1990). Anstelle hochgradiger Schwellungen treten Quaddeln und kleine knotige, scharf umschriebene Haut- und Unterhautverdickungen, vor allem im Bereich von Ohren, Nase, Lippen und Extremitäten auf (Werffeli, 1967; Kötsche und Gottschalk, 1990) (Abb. 3). Die Krankheit verläuft

langsamer, und die Tiere zeigen häufig ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Die protrahierten Formen sind durch eine niedrigere Erkrankungs- und Todesrate gekennzeichnet.



Abb. 2: Akute Form bei einem Wildkaninchen



Abb. 3: Protrahierte Form bei einem Hauskaninchen

Arthur und Louzis beschrieben 1988 neben der klassischen (nodulären) Myxomatose eine atypische, sogenannte amyxomatöse Form, welche bis jetzt nur in Frankreich (Brun et al., 1981; Joubert et al., 1982), Spanien (Rosell et al., 1984) und Belgien (Marlier und Vindevogel, 1996) aufgetreten ist. Die amyxomatöse Form ist gekennzeichnet durch eine deutlich reduzierte Affinität des Virus zu Epidermis und Dermis (Arthur und Louzis, 1988; Marlier et al., 1999; Marlier et al. 2000b). Die Hauptsymptomatik dieser Form äussert sich in einer mehr oder weniger ausgeprägten respiratorischen Erkrankung, welche durch bakterielle Sekundärinfektionen, abhängig vom Immunstatus, ausgelöst wird (Marlier et al., 1999, 2000a, 2000b). Bei experimentellen Infektionsversuchen mit fünf amyxomatösen Virusstämmen wurden regelmässig Blepharokonjunktivitiden beobachtet. Hautläsionen waren klein oder blieben ganz aus (Marlier et al., 1999). Die Affinität zum Respirationstrakt ist nicht grösser als bei nodulären Stämmen, aber die Entwicklung des Ektodermotropismus ist klar reduziert (Marlier et al., 1999, 2000a, 2000b). Die Herkunft dieser neuen Form ist noch weitgehend ungeklärt. Hypothesen sprechen von einer Mutation bestimmter Virusstämme und von der Expression einer

„latenten“ Infektion (Arthur und Louzis, 1988). Die klinische Diagnose der amyxomatösen Myxomatose ist deutlich schwieriger als die der nodulären Form.

4.6. DIAGNOSTIK

4.6.1. PATHOLOGISCH-ANATOMISCHE UND HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN

Abhängig vom Krankheitsverlauf sind bei der Sektion unterschiedlich ausgeprägte Veränderungen von Haut und Unterhaut zu erkennen. Schwellungen der Augenlider, des Ohrgrundes und der Anogenitalregion sind zusammen mit eitrigen Blepharokonjunktivitiden die häufigsten makroskopisch erkennbaren Veränderungen. Die Subkutis der betroffenen Körperstellen ist ödematös verändert. Myxomknoten bestehen aus einem knorpelig-elastischen Zentrum und einem peripheren, schleimigen Bereich (Kötsche, 1954). Der Durchmesser kann zwischen 1 und 6 cm betragen. Die Knoten sind eng mit der Kutis verbunden und mit dieser zusammen gegenüber tieferen Gewebsschichten verschieblich (Kötsche, 1954). Bei der protrahierten Form treten häufig erbsgrosse, derbe Knoten im Bereich von Ohren, Nase, Rücken, Extremitäten und Genitalien auf (Werffeli, 1967). In selteneren Fällen sind unspezifische Lungenveränderungen (Kötsche, 1954) bis katarrhalisch-eitrig Bronchopneumonien zu sehen (Schoop, 1954). Anhand makroskopischer Veränderungen ist nur die Verdachtsdiagnose möglich, eine endgültige Bestätigung erfolgt durch die histologische oder elektronenmikroskopische Untersuchung.

Im histologischen Schnitt sind Epidermis, Haarbälge, Korium und Subkutis verändert, selten auch der Hautmuskel. Das Stratum germinativum ist verbreitert, seine Zellen sind vakuolärhydropisch degeneriert. Im Zytoplasma sieht man häufig Einschlusskörperchen, welche, wie Untersuchungen im EM zeigen, Virusmaterial enthalten. Korium und Subkutis sind unter Verlust ihrer ursprünglichen Struktur aufgelockert. In diesem myxomatösen Grundgewebe liegen in wechselnder Menge Zellen. Für die Diagnose pathognomonisch sind sogenannte spezifische Myxomzellen (Kötsche, 1954), die sich von Histiocyten herleiten (Von Sandersleben et al., 1989). In ihrem Zytoplasma lassen sich häufig eosinophile Körnchen nachweisen. Es handelt sich teils um Zelltrümmer,

teils um Viruseinschlüsse. Daneben treten fibroblastenähnliche Zellen und pseudoeosinophile Granulozyten, in weniger aufgelockerten Arealen auch Lymphozyten und Plasmazellen auf (Abb. 4). Mit fortschreitender Erkrankung sind Myxomzellen auch in den regionären Lymphknoten nachweisbar (Von Sandersleben et al., 1989).

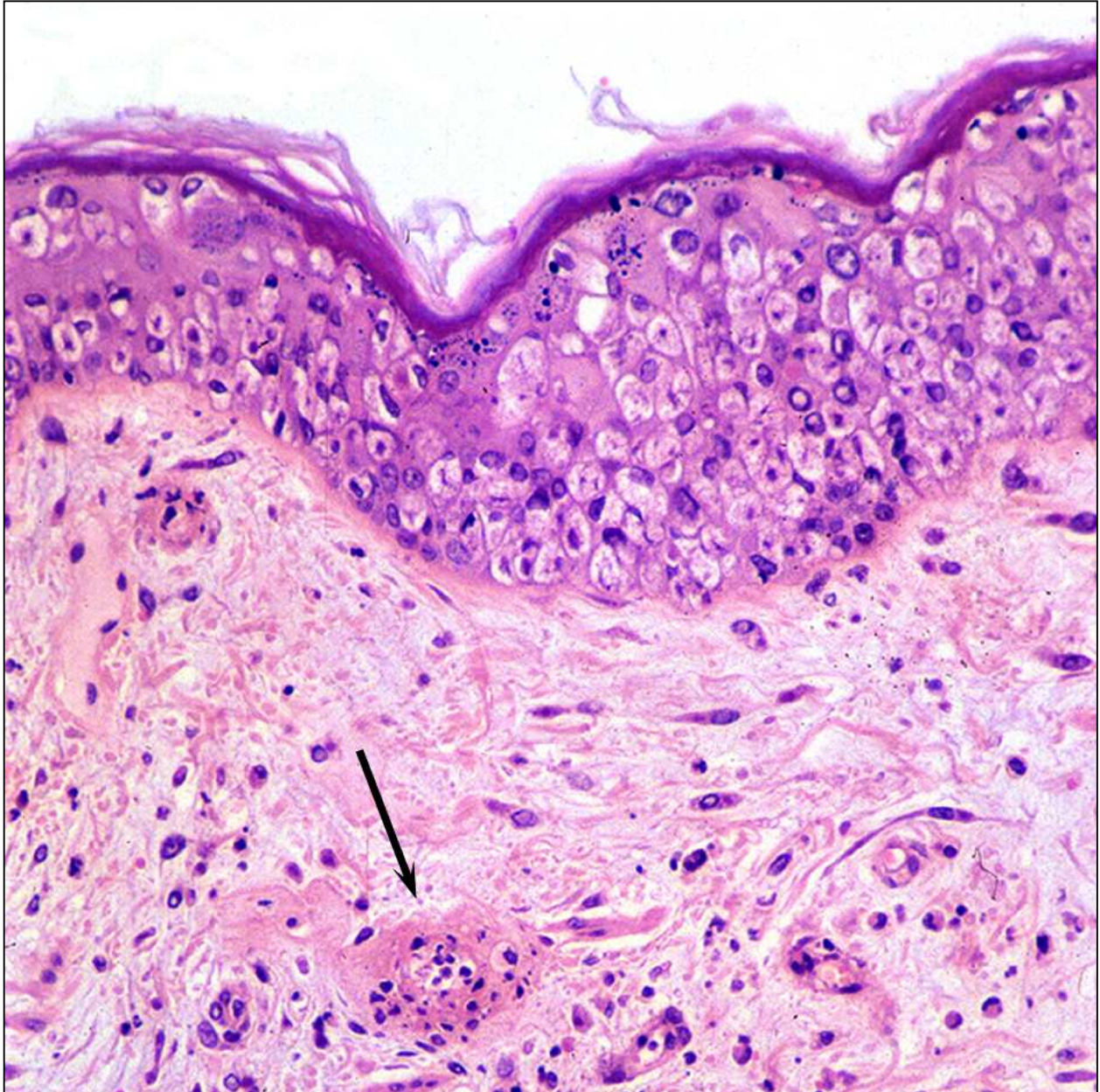


Abb. 4 Myxomzelle in der Subkutis (mit freundlicher Genehmigung des IVPZ)

4.6.2. DIREKTER ERREGERNACHWEIS

Die grösste Schwierigkeit beim Erregernachweis stellt die Abgrenzung vom antigenetisch eng verwandten Shope fibroma - Virus (SFV) dar.

Die vier gängigsten Testmethoden sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2 Vergleich direkter Nachweisverfahren

	AGPT ¹ (Sobey et al., 1966)	IFT ² (Marlier et al., 1999)	IPT ³ (Marlier et al., 1999)	Zellkultur (Woodroffe und Fenner, 1964 OIE Manual, 2000)
Proben- material	Haut	Augentupfer Nasentupfer	Augentupfer Nasentupfer	Haut Augensekret Nasensekret
Testmedium	0,12g Noble Agar 0,5% EDTA 0,9% NaCl	RK13-Zelllinie	RK13-Zelllinie	RK13-Zelllinie Kaninchen- nierenzellen
Beurteilung	I.d.R. 3 spezifische Prä- zipitationslinien	Fluoreszenz	Farbumschlag	CPE ⁴
Vorteil	Differenzierung zwischen Myxoma und Shope fibroma möglich	Kurze Testdauer	Beurteilung ohne Spezialgeräte möglich	Differenzierung zwischen Myxoma und Shope fibroma möglich
Nachteil	Geringe Sensitivität	Geringe Spezifität	Geringe Spezifität	Aufwendiges Verfahren

¹ Agargelpräzipitationstest

² Immunfluoreszenztest

³ Immunperoxidasetest

⁴ Cytopathogener Effekt

4.6.2.1. Molekularbiologische Nachweismethoden

Fountain und Mitarbeiter untersuchten 1997 die Pathogenese der Infertilität bei männlichen Kaninchen in Verbindung mit einer durch MV verursachten Orchitis. Der Nachweis von Virus in Hodenzellen wurde über eine in situ Hybridisierung mit Hilfe von Restriktionsenzymen nach Russell und Robbins (1989) und mittels einer PCR durchgeführt. Für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten die Autoren Primersequenzen (Upton et al., 1987), welche für das immunmodulatorische Protein MGF („myxoma growth factor“) codieren und ein Amplifikat von 640bp ergaben. Die Überprüfung der Spezifität der PCR erfolgte im Southern Blot. Virale DNS konnte vom 5. bis 120. Tag p.i. detektiert werden.

Die Arbeit von Marlier und Mitarbeitern (1999) zeigte eine vergleichende Studie bezüglich der Pathogenese und der Symptomatik der amyxomatösen Myxomatose. Zu diesem Zweck wurden SPF-Kaninchen mit fünf MV-Stämmen infiziert. Eine Genomanalyse bestätigte, dass alle fünf Inokulate Abkömmlinge des 1952 in Frankreich ausgesetzten Lausanne Stammes waren. Die Primer für MGF (Myxoma Growth Factor) stammten aus den publizierten Sequenzen von Bertagnoli und Mitarbeitern (1996), die Primer für die Amplifikation von Serp 2 von Petit und Mitarbeitern (1996). Best und Mitarbeiter (2000) beobachteten bei zwei geographisch getrennt isolierten MV-Stämmen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Apoptose infizierter Lymphozyten und führten aufgrund der Vermutung von Nukleotidunterschieden im Serp 2-Gen eine Sequenzanalyse durch. Vier gefundene Punktmutationen führten zu einer Änderung der Aminosäuresequenz, welchen durch ihre Lage innerhalb des Gens aber kaum Einfluss auf die unterschiedliche Pathogenität zugesprochen werden konnte.

4.6.3. INDIREKTER ERREGERNACHWEIS

Eine Übersicht über die serologischen Testverfahren ist in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3 Vergleich serologischer Methoden

	AGPT ¹ (Sobey et al., 1966; OIE Manual, 2000)	KBR ² (Chantal et al., 1993; Gelfi et al., 1999,	IFT ³ (Gelfi et al., 1999)
Probenmaterial	Serum	Serum	Serum
Antigen	Standardantigen	Gewebehomogenisat infizierter Tiere	Wildstamm T1 (Frankreich)
Zellinie/ Testmedium	0,12g Noble Agar 0,5% EDTA 0,9% NaCl	Kaninchenserum anti-Schaf ⁴ EC Schaferythrozyten	RK13-Zellen Kükenembryo- fibroblasten
Serumtiter/ Beurteilung	3 Präzipitationslinien. Positiv, wenn Beugung min. 1 Linie zum Antigen.	Höchste Verdünnung, die 50% der Hämolyse hemmt. Titer ≥ 4 positiv.	Reziproker Wert der höchsten Verdünnung, bei der Fluoreszenz min. +2. Titer ≥ 20 positiv.

	Plaquereduktionstest (Kerr, 1997; Woodroffe und Fenner, 1964; Fenner et al., 1953)	ELISA ⁴ (Gelfi et al., 1999; Wetherall, 1983)
Probenmaterial	Serum	Serum
Antigen	MV-Stamm Lausanne	MV-Stamm Lausanne/ Glenfield
Zellinie/ Testmedium	Verozellen Kaninchennierenzellen Kaninchenembryofibroblasten	RK13-Zellen
Serumtiter/ Beurteilung	Reziproker Wert der höchsten Verdünnung, welche Plaquezahl um > 50% reduziert, verglichen mit einem Negativserum.	Reziproker Wert der höchsten Verdünnung, bei der Extinktion 3x grösser als bei Negativkontrolle. Titer ≥ 100 positiv.

¹Agargelpräzipitationstest

²Komplementbindungsreaktion

³Immunfluoreszenztest

⁴Enzyme-linked immunosorbent assay

4.7. EPIDEMIOLOGIE

Das hauptsächlich saisonale Auftreten der Myxomatose im Spätsommer und Herbst ist durch das vermehrte Vorkommen von Vektoren (Mücken, Flöhe) während dieser Zeit bestimmt. Die Effizienz der Transmission ist abhängig vom Virulenzgrad des Stammes, dem gebildeten Virustiter in der Haut und der Strecke, die der Vektor zurücklegen kann. Studien mit markierten Mückenweibchen zeigten, dass Culex- und Anophelesarten Strecken von mehr als zehn Kilometern zurücklegen (Fenner und Ross, 1994). Virusmaterial kann während Monaten an den Mundwerkzeugen überwinternder Mückenspezies infektiös bleiben (Andrewes et al., 1956) und so zusätzlich im Frühjahr zu Seuchenzügen führen. Eine Hypothese zur Überwinterung des Erregers ist die Existenz sogenannter „carrier animals“. Rekonvaleszente Tiere können noch Virusträger sein ohne klinische Symptome zu zeigen. In Stressituationen kann es zu Reaktivierung, erneuter Vermehrung und anschliessender Transmission kommen (Arthur und Louzis, 1988; Williams et al., 1972).

In Grossbritannien scheint der Europäische Kaninchenfloh (*Spilopsyllus cuniculi*) die grösste Bedeutung als Vektor in der Wildkaninchenpopulation zu haben (Muirhead-Thomson, 1956; Rothschild, 1953; Service, 1971). Die Myxomatose besitzt dort eine weniger ausgeprägte saisonale Prävalenz als im übrigen Europa (Andrewes et al., 1959).

Hinweise lassen vermuten, dass von rekonvaleszenten Böcken ein nichtgenetisch bedingter Faktor an die Nachkommenschaft weitergegeben wird, welcher einen Überlebensvorteil bei Myxomatose verleiht. Dieser Effekt wird von Sobey und Conolly (1986), Williams und Moore (1991) sowie von Parer und Mitarbeitern (1995) als „sire effect“ beschrieben. Es wird vermutet, dass ein Teil der beobachteten Resistenzen in Kaninchenpopulationen auf diesem Faktor beruhen (Sobey und Conolly, 1986).

Aufgrund der Überlebensrate in Tagen werden die Stämme in fünf Virulenzgrade eingeteilt. Grad I (<13 Tage Überlebenszeit) gilt als hochvirulent mit fast 100% Mortalität, Grad V (>50 Tage Überlebenszeit) als hochattenuiert mit ca. 10% Mortalität (Fenner und Ross, 1994).

1975 zeigten Mead-Briggs und Vaughn, dass mässig virulente Stämme (Grad III) effektiver übertragen werden als virulente und hochattenuierte. Viren der Grade I und II töten den Wirt im akuten Verlauf so schnell, dass es selten zur Übertragung auf ein anderes Tier kommt, während hochattenuierte Stämme (Grad IV und V) einen niedrigeren Titer in der Haut bilden, welcher zur erfolgreichen Transmission nicht ausreicht.

4.8. VERBREITUNG

4.8.1. SITUATION IN EUROPA

Das aktuelle Vorkommen der Myxomatose in Europa ist schwer einzuschätzen, da in den meisten Ländern keine Meldepflicht besteht. Das Auftreten der Krankheit ist eng mit der Wildkaninchenpopulation verknüpft (Arthur und Louzis, 1988), deshalb werden sporadische Fälle bis jährliche saisonale Seuchenzüge überall dort beobachtet, wo stabile Wildverbände leben. Dies ist in Deutschland, Skandinavien, Frankreich, Spanien, Italien und einigen Ländern Osteuropas der Fall. Über die Situation in anderen europäischen Ländern sind keine Informationen vorhanden. Eine epidemiologische Studie im Naturschutzgebiet von Massereau (Frankreich) ergab eine jährlich auftretende Epizootie mit einer Morbiditätsrate von 17%. Serologische Untersuchungen zeigten, dass 50% der adulten Tiere Träger von Antikörpern sind, was die Hypothese des endemischen Vorkommens des Virus innerhalb grösserer Populationen bestätigt (Information des Office National de la Chasse, Frankreich).

Im europäischen Raum stehen homologe und heterologe Lebend-Impfstoffe zur Verfügung. In Deutschland impfen aber nur ca. 15% der Züchter (BKZV, persönliche Mitteilung).

4.9. BEKÄMPFUNG

4.9.1. ALLGEMEINE MASSNAHMEN

Folgende prophylaktische Massnahmen werden zur Bekämpfung der Myxomatose angewandt:

- 1 Populationskontrolle der Wildkaninchen (Reduktionsabschüsse bei Auftreten von Seuchenzügen in der Wildpopulation)
- 2 Kontrolle der Vektoren (Einsatz von Insektiziden und Schutzgittern)
- 3 Kontrolle der Vehikel (Verzicht auf Grünfütterung im Sommer)
- 4 Heterologe/homologe Immunsierung

Im Falle von Seuchenzügen in der Wildkaninchenpopulation und Ausbrüchen bei Hauskaninchen sind in Europa keine spezifischen Massnahmen vorgeschrieben.

4.9.2. MASSNAHMEN IN DER SCHWEIZ

In der Schweiz ist die Myxomatose anzeigepflichtig, und die Impfung ist verboten. Bei Krankheitsfällen werden die betroffenen Bestände gesperrt und die Tiere euthanasiert. In einer bis 30 Tage nach dem letzten Seuchenfall bestehenden Schutzzone ist jeglicher Tierverkehr verboten (TSV). Allgemeine Massnahmen wie in 4.9.1. beschrieben gehören ebenfalls zum Bekämpfungskonzept.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. EPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Das Vorkommen der Myxomatose innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte wurde anhand der Anzahl Fälle und ihrer zeitlichen und geographischen Verteilung neu beurteilt. Die Daten wurden aus den BVET-Mitteilungen der letzten zwanzig Jahre zusammengestellt. In persönlichen Gesprächen mit den Kantonstierärzten wurden die jeweils im Seuchenfall ergriffenen Massnahmen zur Bekämpfung der Krankheit besprochen und ihre Vor- und Nachteile diskutiert.

5.2. ORGANMATERIAL

Die zum Virusnachweis verwendeten Proben (Kutis und Subkutis von Nase und Augenlid; Lunge) wurden im Rahmen der Routinesektion vor und während der Projektphase gesammelt.

5.3. VIRUSSTÄMME

Die verwendeten Virusstämme und ihre Herkunft sind in Tabelle 4 dargestellt. Alle Isolate waren zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns nicht näher charakterisiert. Eine vorgängige Untersuchung im EM bestätigte die Zugehörigkeit zur Pockenfamilie.

Tab. 4 Verwendete Pockenvirusstämme

Genus	Spezies	Bezeichnung	Herkunft
Leporipox	Myxoma Virus	München 1 (MV-M ¹)	TGD
	Myxoma Virus	Feldisolat "Hasi" (MV-H ²)	BFAV
	Myxoma Virus	Impfstamm (MV-R ³)	
	Shope fibroma Virus	Impfstamm (SFV ⁴)	Merial
Orthopox	Rabbit pox Virus		TGD

¹ Myxoma-Virus München

² Myxoma-Virus „Hasi“

³ Myxoma-Virus Riems

⁴ Shope fibroma-Virus

5.4. ZELLKULTUREN

Material:

Zelllinie: Affennierenzelllinie MA 104 (Microbiology Associated 104; Wooster, Ohio, USA): Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Ceropithelus atiops*)

Kulturmedium:	MEM -EARLE (Biochrom AG, Schweiz)	500ml
	NaHCO ₃	0,68g
	L-Glutamin 200mM (Sigma AG, Schweiz)	5ml
	FKS 5% (Biochrom AG, Schweiz)	

Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% (Biochrom AG, Schweiz)

PBS-Puffer (pH 7,5)

Dreitägige Einschichtzellkulturen wurden mit einer Infektionsdosis von einer plaquebildenden Einheit pro Zelle beimpft. Nach 4-6 Tagen und nach Ausbildung eines cytopathogenen Effektes (cpE) mit einer Cytolyse von 80-90% wurde das Material nach dreimaligem Gefriertauen (-70°C, +20°C) geerntet. Die Anzahl plaquebildender Einheiten wurde mittels Plaquetitration bestimmt (Mayr et al., 1977)

5.5. AUFBEREITUNG VON ORGANMATERIAL

Material:

PBS-Puffer (Phosphate buffered saline), pH 7,5:

NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,1 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,1 g
Aqua dest.	ad 1000ml

Haut- und Lungenproben von klinisch und histologisch bestätigten Myxomatose-Fällen wurden mit einer sterilen Schere grob zerkleinert. Anschliessend wurden die Gewebestücke mit PBS und autoklaviertem Seesand in einem Mörser zerrieben, 0,05ml Garamycin/ml Suspension hinzupipettiert und das Gemisch über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Abschluss wurde die Organsuspension während 10 min zentrifugiert (600xg; Labofuge 400R, Heraeus, Schweiz).

5.6. VIRUSREINIGUNG

Material: Tris-Puffer (1mM; pH 9,0; Biosolve LTD; Niederlande)
Sucrose 99+% (Sigma, Schweiz)
PBS-Puffer (pH 7,5)

Die Aufreinigung des Materials erfolgte nach Joklik (1962) und wurde nach Czerny und Mahnel (1990) modifiziert.

Die Virus-Zellsuspension wurde 120 min mit 10000 U/min (18112xg) bei 4°C zentrifugiert (Suprafuge 22, Rotor 12500; Heraeus Sepatech; Kendro, Schweiz). Das aus Virus, Zellen und Zelltrümmern bestehende Pellet wurde in 1mM Tris-Puffer resuspendiert. In einem nächsten Schritt wurde die Suspension dreimal mit Ultraschall behandelt (Labsonic, Braun, Deutschland) und während 10 min zentrifugiert (800x; Labofuge 400R; Heraeus, Schweiz). Nach jedem Zentrifugenschritt wurde der Überstand separiert. Die überstehenden, virushaltigen Phasen wurden anschliessend 90min mit 25000 U/min (117731xg; SW-28 Rotor, Ultrazentrifuge Centrikon T-2060, Hemotec GmbH, Schweiz) bei 4°C durch 10ml eines 36%-igen Sucrosekissens pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 2ml 1mM Tris-Puffer aufgenommen und bei -70°C gelagert.

Mit einer elektronenmikroskopischen Untersuchung der Proben wurde die Qualität der Virusreinigung überprüft.

5.7. PROTEINBESTIMMUNG

Material:

Reagenz A:	Natriumcarbonat-Lösung (2%)	5ml
	Natriumtartrat-Lösung (2%)	50µl
	CuSO ₄ -Lösung (1%)	50µl

Reagenz B:	Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck, Deutschland)	200µl
	Aqua dest.	300µl

Der Proteingehalt des aufgereinigten Materials wurde mittels des Mikro-Lowry - Verfahrens bestimmt (Lowry et al., 1951).

Die Proben wurden 1:10 und 1:100 verdünnt und 100µl in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gefüllt. 500µl von Reagenz A wurde zu jeder Verdünnung gegeben, gemischt und 10min inkubiert (RT); anschliessend wurde 50µl Reagenz B zugegeben und 30min inkubiert (RT).

Die Dichte der Proben wurde bei 510nm photometrisch gemessen.

5.8. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

5.8.1. PROBENAUFBEREITUNG AUS ZELLKULTURMATERIAL

Drei Myxomatose-Stämme (MV-H, MV-M, MV-R) , ein Shope fibroma-Stamm (SFV) und ein Kaninchenpocken-Isolat wurden mit einer PCR untersucht. 0,5ml infiziertes Zellmaterial in sterilen Eppendorfröhrchen wurde dreimal abwechselnd in Trockeneis schockgefroren und bei 100°C gekocht (jeweils 10min).

2µl des Materials wurden als Template eingesetzt.

5.8.2. PROBENAUFBEREITUNG AUS ORGANMATERIAL

Siehe 3.5. "Aufbereitung von Organmaterial". Anschliessend erfolgte die Isolierung viraler DNS aus den Proben.

5.8.3. ISOLIERUNG VIRALER DNS

<u>Material:</u>	TEN-Puffer (pH 7,4):	100mM Tris 10mM EDTA 1 M NaCl;
	Proteinase K (20mg/ml; Fa. Roche) SDS Phenol (Rotiphenol, Fa. Roth)	
	IAC:	1 Teil Isoamylalkohol 24 Teile Chloroform
	Natriumacetatlösung (pH 5,2) Ethanol (70%)	
	TE-Puffer (pH 8,0):	10mM Tris 1mM EDTA

400µl gereinigtes Virusmaterial (Zellkultur- und Organmaterial) wurde mit 22,5µl TEN-Puffer, 45µl SDS und 10µl Proteinase K bei 37°C über Nacht inkubiert.

Durch zweimalige Extraktion mit Phenol wurde die DNS von Protein- und Lipidresten gereinigt. Dazu wurde dem Ansatz 400µl Phenol zugegeben, ca. 100x vorsichtig geschwenkt, 20min auf Eis inkubiert und 5min bei 1000 U/min und RT zentrifugiert. Der DNS-haltige Überstand wurde in neue Gefässe abpipettiert. Der daraus resultierende Überstand wurde zur Reinigung von Phenolresten zweimal mit je 400µl IAC versetzt, durch Schwenken vermischt und sofort zentrifugiert (10000 U/min, 5min, RT).

Für die DNS-Fällung wurden 40µl Natriumacetat und 800µl eiskalten, absoluten Ethanol zum Überstand dazugegeben und das Gemisch während 30 min bei -70°C inkubiert. Anschliessend wurde die DNS mittels Zentrifugation (30min, 16440xg, 4°C, Biofuge Stratos, Heraeus, Kendro, Schweiz) pelletiert. Das Pellet wurde anschliessend mit eiskaltem 70%-igem Ethanol unter Zentrifugation (15min, 16440xg, 4°C) gewaschen, luftgetrocknet und in 20µl TE-Puffer resuspendiert. Als Prozesskontrolle wurde jeweils eine Probe ohne Virusmaterial mitgeführt.

5.8.4. AUSWAHL DER PRIMER FÜR DAS SERP 2-PROTEIN-GEN (PETIT ET AL., 1996)

Primer 1 low: 5' AGAGTATAATGTATAAGTGC 3'

Primer 2 up: 5' CTAACGGATACAGGAGAG 3'

Die obengenannten Primer sind spezifisch für das Serp 2-Gen. Das daraus translatierte 34kDa grosse Protein gehört zu einer Überfamilie serpin-ähnlicher, vor allem extrazellulärer Proteine, welche die proteolytischen Kaskaden der Koagulation, der Komplementaktivierung und der Entzündungsantwort regulieren.

5.8.5. DURCHFÜHRUNG DER PCR

<u>Material:</u>	Aqua dest.	
	Taq-Polymerase-Puffer (Fa. Eppendorf, Schweiz)	
	dNTP	
	Primer: 32kDa low / 32 kDa up (Fa. MWG, Deutschland)	
	Taq-Polymerase (Fa. Eppendorf, Schweiz)	
	Template-DNS	
<u>PCR-Ansatz:</u>	Aqua dest.	14,8µl
	PCR-Puffer (10x)	2µl
	dNTP	0,6µl
	Primer 1 (up, Konzentration: 200ng/µl)	0,3µl
	Primer 2 (low, Konzentration: 200ng/µl)	0,3µl
	Taq-Polymerase	0,3µl

Nach Zugabe von 2µl Template-DNS wurde der Ansatz im Thermocycler für 5 min auf 94°C erhitzt. 30 Amplifikationszyklen liefen nach folgendem Schema ab: Schmelzen der DNS für 1min bei 94°C, Anlagerung der Primer während 1min bei 50°C, Synthese für 1min bei 72°C. Eine Inkubation (10min, 72°C) zur Vervollständigung der Synthese schloss die PCR ab.

Zur Beurteilung der Resultate wurden die PCR-Ansätze mit 2µl Laufpuffer (Bromphenolblau, Serva, Basel) in 1%-igem Agarosegel (Agarose Standard, Fa. Brunschwig AG, Schweiz) elektrophoretisch aufgetrennt (80Volt, 45min).

5.9. KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN

<u>Material:</u>	Topo TA Cloning® Kit (Invitrogene, NV Leek, Holland)
	LB-Z-Agar-Platten (Merck, Schweiz)
	Elektro- und chemischkompetente E.coli (Invitrogene, NV Leek, Holland)
	SOC-Medium (Invitrogene, NV Leek, Holland)
	LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin (Merck, Schweiz)

Die Klonierung von frischen PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Vektors pCR 2.1 (Fa. Invitrogene). Verwendete Bakterienspezies war E. coli. Dabei wird der Poly-A-Überhang am 3'-Ende von PCR-Produkten ausgenützt. Ligation und Transformation wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.10. ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS ("PLASMIDSCHNELLTEST")

Material:

LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin (Merck, Schweiz)

Puffer 1 (TE-Puffer):	Tris (pH 8,0)	50mM	
	EDTA (pH 8,0)		10mM
Puffer 2:	NaOH		0,2M
	SDS (Dnase-frei)		1% w/v
Puffer 3:	Kaliumacetat		3M
	Essigsäure		2M

Ethanol absolut/70%

Aqua dest. mit RNase (100µg/ml)

Puffer H (Roche, Deutschland)

EcoRI-Restriktionsenzym (Roche, Deutschland)

Aqua bidest.

Die Plasmid-DNS wurde nach der von Hattori und Sakaki (1986) beschriebenen Methode isoliert. Positive Kolonien wurden gepickt und in 4ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5ml einer jeden Übernachtskultur wurden in 2ml Eppendorf®-Reaktionsgefäße (Renner, Heidelberg) gegeben und zentrifugiert (6000 U/min, 9503xg; 10min, RT, Biofuge Pico, Heraeus, Schweiz). Der Überstand wurde durch Absaugen entfernt, das Pellet in 300µl Puffer 1 und anschliessend in 300µl Puffer 2 durch Schwenken resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden nochmals 300µl Puffer 3 hinzupipettiert und das Gemisch für weitere 15min auf Eis belassen. Durch diese Behandlung wurden die Bakterien aufgeschlossen und die denaturierten Proteine präzipitiert. Nun wurde die Mischung zentrifugiert (15000 U/min, 21885xg; 20min; 4°C; Biofuge Stratos, Sorvall Heraeus, Schweiz) und die DNS im wässrigen Überstand mit 800µl absolutem Alkohol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 30min unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet mit 200µl 70%-igem Ethanol gewaschen, ein drittes Mal zentrifugiert (15min), getrocknet und in 20µl Aqua dest. mit RNase resuspendiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung (Grösse des Inserts) wurde die Plasmid-DNS mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt (1% Agarose, 77 Volt, 45min).

5.11. SEQUENZIERUNGEN

Material: Plasmid Midi Kit (25) (Hilden, Deutschland)
Isopropanol (Sigma-Aldrich, Deutschland)
Ethanol 70%

Die DNS aller Klone, die zur Sequenzierung herangezogen wurden, wurde mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit gereinigt. Dazu wurden die plasmidhaltigen Bakterien in 50ml LB-Amp-Medium bis zu einer optischen Dichte $OD_{600nm} = 1,0 - 1,5$ bei 37°C vermehrt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10min, 4°C, 6000g) gewonnen. Das Bakterienpellet wurde in 4ml P1-Puffer resuspendiert, mit 4ml P2-Puffer vermischt und das Gemisch 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4ml eiskaltem P3-Puffer folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 15min. Nun wurde die Mischung 30min bei 30000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar auf eine Quiagen-Säule, welche vorher mit 4ml QBT-Puffer äquilibriert wurde, gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 10ml QC-Puffer wurde die DNS mit 5ml QF-Puffer von der Säule eluiert. Die DNS wurde mit 3,5ml Isopropanol gefällt, bei 15000xg und 4°C 30min pelletiert, mit 5ml eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, nochmals für 15min zentrifugiert, getrocknet und in 10µl Aqua bidest. resuspendiert.

Über einen Verdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym wurde die Qualität der Aufreinigung überprüft, anschliessend der DNS-Gehalt gemessen und die geeigneten Klone zur Sequenzierung umgefällt.

Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma MTW Biotech in Ebersberg.

5.12. DATENANALYSEN

Die Sequenzen der Serp2-Gene wurden mit dem Computerprogramm seq.Web (Version 10) ausgewertet und anschliessend mit den entsprechenden, bereits publizierten Daten der MV-Stämme Lausanne und Uriarra, sowie mit dem Shope fibroma-Virus verglichen (Petit et al., 1996; Messud-Petit et al., 1998; Willer et al., 1999, Cameron et al., 1999; Best et al., 2000).

5.13. GEWINNUNG VON IMMUSEREN

Material:

Cunivax Myxo sc (Myxomatose-Lebendimpfstoff, lyophilisiert; Impfstoffwerk Dessau/Tornau, D):

mind. $10^{3,11}$ KID₅₀ Myxomatose-Virus,
Neomycinsulfat

Lyomyxovax (Myxomatose-Lebendimpfstoff, lyophilisiert, Merial, Frankreich):

mind. 500 ID₅₀ Shope fibroma-Virus
max. 50µg Kanamycin
max. 10µg Vancomycin
max. 5µg Pimafucin

Vier weibliche, ca. 3kg schwere New Zealand White Kaninchen (LTK, Universität Zürich) wurden jeweils mit homologem oder heterologem Myxomatose-Lebendimpfstoff immunisiert. Bei jeder Immunisierung wurde die dreifache Impfdosis im Bereich des rechten Schulterblattes subkutan injiziert.

Tab. 5 Immunisierungsprotokoll

1. Tag	8. Tag	15. Tag	36. Tag	57. Tag
Einstellung	Blutentnahme für Nullserum	1. Immunisierung	Blutentnahme für Immunserum 1 2. Immunisierung	Blutentnahme für Immunserum 2 3. Immunisierung
78. Tag	91. Tag			
Blutentnahme für Immunserum 3	Entblutung			

5.14. SERUMPROBEN

Insgesamt wurden 418 Serumproben verschiedener Herkunft mit dem Plaquereduktionstest und zwei ELISA-Testsystemen untersucht. In allen Systemen wurden Proben chlamydienimmunisierter Tiere mitgeführt, um mögliche Reaktionen aufgrund eines aktivierten Immunsystems abzuklären.

In ELISA 2 wurden stichprobenartig ausgewählte Proben mittels drei verschiedener Präadsorptionsmethoden vorbehandelt, um eventuelle unspezifische Bindungen mit Zellanteilen und Kreuzreaktionen mit dem Shope fibroma-Virus zu minimieren.

Tab. 6 Untersuchte Serumproben

Proben	Anzahl
Negativkontrollseren (Seren unverdächtiger, klinisch gesunder Tiere)	42
Positivkontrollseren (Seren klinisch kranker und Seren immunisierter ^{*1*2} Tiere)	15
Feldseren (Seren aus Mast- und Hobbybetrieben in der Schweiz)	345
Seren chlamydienimmunisierter Tiere	16

^{*1}Cunivax Myxo (homologer Lebendimpfstoff, Impfstoffwerk Dessau, D)

^{*2}Lyomyxovax (heterologer Lebendimpfstoff mit Shope fibroma, Merial, F)

Die Negativkontrollseren stammten von Kaninchen der Rasse New Zealand White aus der LTK der Universität Zürich. Positivkontrollseren wurden vom TGD, dem BFAV und der Ecole vétérinaire Toulouse zur Verfügung gestellt.

Die Feldseren stammten aus der Kaninchenserumbank des IVI und des IVP der Universität Zürich.

5.15. PLAQUEREDUKTIONSTEST

Material:

Zelllinie:	Affennierenzelllinie MA 104 (Microbiology Associated 104; Wooster, Ohio, USA): Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Ceropithelus atiops</i>)	
Kristallviolett:	Kristallviolett (Merck, Darmstadt)	15g
	Ethanol (Ethanolum ketonatum 80% v/v KA)	85ml
	Formaldehyd (Merck, Darmstadt)	250ml
	Aqua dest.	ad 1000ml
Kulturmedium:	MEM -EARLE (Biochrom AG, Schweiz)	500ml
	NaHCO ₃	0,68
	L-Glutamin 200mM (Sigma AG, Schweiz)	5ml
	FKS (Biochrom AG, Schweiz)	5%

Trypsin/EDTA Solution (Biochrom AG, Schweiz)

PBS-Puffer (pH 7,5)

Zum Nachweis neutralisierender Antikörper wurde der Plaquereduktionstest in 24-Loch-Platten durchgeführt (Mayr et al, 1977). Die Serumproben wurden in log₂-Schritten in Kulturmedium in 96-Loch-Platten (Cellstar®, Greiner, Schweiz) titriert. Zu jeweils 100µl der einzelnen Serumverdünnungen wurden je 100µl Virus zugegeben. Drei Löcher dienten als Zellkontrolle, in die jeweils die doppelte Menge Medium gegeben wurde; in weitere drei Löcher wurde nur Virusverdünnung gegeben, um eine Kontrolle der Plaquezahl zu erhalten. Das Virus wurde zuvor auf 100pfu/100µl/Loch eingestellt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C unter CO₂-Bebrütung wurde der Überstand auf tags zuvor mit Zellen beschickten 24-Loch-Platten (Cellstar®, Greiner, Schweiz) verimpft und eine weitere Stunde adsorbiert. Der Überstand wurde darauf wieder von den Zellen abgesogen und durch 1ml EMEM/Loch ersetzt. Nach 6 Tagen Inkubation (37°C, CO₂) wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Anzahl der gebildeten Plaques unter dem Mikroskop ausgezählt.

Als positiv wurden Seren gewertet, welche die Plaquezahl um mindestens 50% verminderten.

5.16. ELISA 1

Der verwendete ELISA zum indirekten Nachweis von IgG-Antikörpern in Kaninchenserum stammt von der Firma Cypress Diagnostics (Cypress Diagnostics, 3012 Leuven, Belgien). Die technischen Daten sind in Tab. 7 dargestellt. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Tab. 7 Technische Daten Myxomatose ELISA

Hersteller	Cypress Diagnostics, Belgien
Probenzahl/Platte	96
Serumverdünnung	1:40
Substrat A	TMB ¹
Substrat B	H ₂ O ₂
Konjugat	Ziege-Anti-Kaninchen HRPO ²
Stopplösung	H ₂ SO ₄
Reaktionstemperaturen	RT ³ 37°C
Kontrollen	1 Negativkontrollserum 1 Positivkontrollserum
Auswertung (Relativer Index)	$\frac{OD^4 \text{ Probe} - OD \text{ Negativkontrolle}}{OD \text{ Positivkontrolle} - OD \text{ Negativkontrolle}}$
Interpretation	Relativer Index x10 > 2 = positiv Relativer Index x10 < 1 = negativ Relativer Index x10 > 1 und < 2 = fraglich

¹ Tetramethylbenzidin

² Horse radish peroxidase

³ Raumtemperatur

⁴ Optische Dichte

5.17. ELISA 2

Material:

Coating-Puffer(pH9,6):	Na ₂ CO ₃	1,59g
	NaHCO ₃	2,93g
	NaN ₃	0,20g
	Aqua dest.	ad 1000ml
PBS (pH 7,4):	NaCl	8,0g
	KH ₂ PO ₄	0,2g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9g
	KCl	0,2g
	Aqua dest.	ad 1000ml
Blocking-Puffer:	PBS (pH 7,4)	1000ml
	Proteose-Pepton (Nr.3) (Becton Dickinson, USA)	10g
Wasch-Puffer:	PBS (pH 7,4)	1000ml
	Proteose-Pepton (Nr. 3) (Becton Dickinson, USA)	5g
	Tween 20 (Merck, Schweiz)	0,5ml
Substrat-Puffer:	Na ₂ HPO ₄	0,1M
	mit 0,1M C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O (Zitronensäure) auf pH 4,25 einstellen	davon 2000ml
	ABTS	800mg
	H ₂ O ₂ 30% (Merck, Schweiz)	400µl

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (Sigma, Schweiz)

5.17.1 TESTPRINZIP

Das zweite ELISA-Testsystem zum indirekten Nachweis von IgG-Antikörpern in Kaninchenserum wurde selbst entwickelt. Als Antigen diente das Myxoma Virus-Feldisolat „Hasi“ (BFAV, Riems). Die Beschichtungsmenge wurde mittels einer Antigentitration ermittelt.

5.17.2. TESTDURCHFÜHRUNG

96-Loch-Platten (Microlon, Greiner, Schweiz) wurden mit einer Antigenmenge von 100ng/Loch beschichtet. Als Verdünnungsmedium wurde Coating-Puffer eingesetzt. Die Platten wurden 1h bei RT geschüttelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurden sie 3x in Blocking-Puffer gewaschen (Columbus Microplate Strip Washer, Tecan, Schweiz), mit 200µl Blocking-Puffer/Loch 1/2h unter Schütteln abgesättigt und anschliessend mit Waschpuffer 3x gewaschen. Nach Zugabe der verdünnten Serumproben (1:100, in Verdünnungspuffer) wurde 1h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100µl/Loch markierte Ziege-Anti-Kaninchen IgG zugegeben und 1h inkubiert. Nach dem letzten Waschdurchgang folgte die Zugabe von 100µl Substrat-Puffer und nach 1h Inkubation unter Schütteln wurde die Extinktion des Farbumschlages bei 405nm gemessen (Absorbance Reader Spectra Classic, Tecan, Schweiz).

Auf jeder Platte wurden ein positives Kontrollserum und acht negative Kontrollseren mitgeführt. In der ersten und letzten Reihe einer Platte wurden jeweils ein Antigen-Leerwert und eine Substratkontrolle mitgeführt.

5.17.3. PRÄADSORPTION

Um falsch-positive Resultate aufgrund unspezifischer Bindungen mit Zellanteilen zu minimieren, wurden zufällig ausgewählte Negativ- und Positivseren mit aufgereinigtem Zellmaterial inkubiert. Zellen in einer Dichte von 10^6 /ml wurden 10min (1000xg, 4°C) zentrifugiert, der Überstand abgekippt, mit PBS gewaschen und darauf ein zweites Mal zentrifugiert. Jeweils 500µl einer 1:100 verdünnten Probe wurden mit ca. 10^6 Zellen über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurden die Proben erneut zentrifugiert und die Überstände abpipettiert.

Zur Verifizierung, ob Kreuzreaktionen mit dem Shope fibroma-Virus minimiert werden können, wurden in gleicher Weise ausgewählte Seren mittels zweier Präadsorptionsmethoden vorbehandelt.

In der ersten Methode wurde aufgereinigtes Shope fibroma-Virus-Antigen in einer Menge von 100ng/Loch auf eine 96-Loch-Platte (Microlon, Greiner, Schweiz)

beschichtet und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank belassen. Die ausgewählten Seren wurden anschliessend in einer Verdünnung von 1:100 auf die beschichteten Platten gegeben und während 2h im Brutschrank (37°C) belassen. Die präadsorbierten Seren wurden direkt im ELISA 2 weiterverwendet.

Bei der zweiten Methode wurde jeweils 500µl 1:50 verdünntes Serum mit der gleichen Menge aufgereinigtem, unverdünntem Shope fibroma-Virus in Eppendorf-Röhrchen gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Material wurde anschliessend ohne Zentrifugation weiterverwendet.

Alle Proben wurden gleichzeitig unbehandelt in beiden Testsystemen eingesetzt.

5.17.4. AUSWERTUNG

Auf jeder Platte wurden zufällig ausgewählte negative Referenzseren (n=8) für die Berechnung des Cut off mitgeführt.

5.17.4.1. Benutzte Formeln

1. Arithmetisches Mittel: $\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n OD_i$

2. Standardabweichung: $\sqrt{\frac{n \cdot \sum_{i=1}^n OD_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n OD_i\right)^2}{n \cdot (n-1)}}$

5.17.4.2. Berechnung des Cut off

negativ	$OD < \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n OD_i + 3 \cdot \sqrt{\frac{n \cdot \sum_{i=1}^n OD_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n OD_i\right)^2}{n \cdot (n-1)}}$
positiv	$OD > \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n OD_i + 3 \cdot \sqrt{\frac{n \cdot \sum_{i=1}^n OD_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n OD_i\right)^2}{n \cdot (n-1)}}$

5.18. WESTERN BLOT

Material:

Trenngel (10%):	Acrylamid-Bisacrylamid (30%) (Rotiphorese®, Roth, Schweiz)	10,2ml
	1,88mM Tris (pH 8,8)	6ml
	SDS (0,5%)	6ml
	Aqua bidest.	7,8ml
	Temed (Bio-Rad, Schweiz)	60µl
	Ammoniumpersulfat 10% (Sigma, Schweiz)	180µl
Sammelgel:	Acrylamid-Bisacrylamid (30%) (Rotiphorese®, Roth, Schweiz)	1,98ml
	0,625mM Tris (pH 6,8)	2,4ml
	SDS (0,5%)	2,4ml
	Aqua bidest.	5,22ml
	Temed (Bio-Rad, Schweiz)	60µl
	Ammoniumpersulfat 10% (Sigma, Schweiz)	60µl
Proben-Puffer:	Aqua bidest.	18,4ml
	0,625mM Tris (pH 6,8)	4ml
	Glycerol	3,2ml
	SDS 20%	3,2ml
	Bromphenolblau 1% (Serva, Heidelberg)	1,6ml
	β-Mercaptoethanol (Bio-Rad, Schweiz)	
Elektrophorese-Puffer:	Tris	7,56g
	Glycin	35,56g
	SDS 20%	8ml
	Aqua dest.	ad 2000ml
Transfer-Puffer:	Tris	5,05g
	Glycin	14,4g
	Aqua dest.	ad 800ml
	Methanol	200ml
Blocking-Puffer:	Magermilchpulver (Fluka, Schweiz)	40g
	TBS	ad 2000ml
TBS:	Tris	2,42g
	NaCl	17,56g
	Aqua dest.	ad 2000ml
	pH auf 8,5 einstellen	
TBS-Tween:	TBS	
	Tween 20 (Merck, Schweiz)	1ml

Entwicklerlösung:	TBS (eiskalt)	100ml
	H ₂ O ₂	60µl
	Methanol (eiskalt)	58ml
	4Chloro-1-Naphtol (Sigma, Schweiz)	1,2g

5.18.1. SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Pro Ansatz wurden jeweils 6 Gele im Mini Protean 3-Elektrophoresesystem gegossen. Um durch Luftabschluss die Polymerisation des Trenngels zu beschleunigen, wurde dieses mit Ethanol überschichtet. Nach dem Abgiessen des Ethanols wurde das Sammelgel eingefüllt und die Kämme zur Geltaschenbildung eingesetzt.

Eine Menge von 2µg/µl aufgereinigtem Myxoma-Virus-Antigen. (Feldisolat, BFAV, Riems) wurde im Verhältnis 3,5:1 mit Probenpuffer versetzt und während 10min gekocht. Jeweils 5µl dieses Gemisches wurde pro Geltasche aufgetragen. Um unspezifische Banden herauszufiltern, wurde jeweils eine entsprechende Menge aufgereinigtes Zellmaterial parallel mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstant 200V während 30min. In jedem Lauf wurde ein Protein-Standard (Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175kDa), Neb Bioconcepts, Schweiz) mitgeführt.

5.18.2. WESTERN BLOT-ASSAY

Die SDS-Gele wurden nach Abschluss der Elektrophorese in Transferpuffer äquilibriert und gemäss Herstellerangaben im Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Element (Bio-Rad, Schweiz) bei 10V während 30min auf Nitrozellulosetransfermembranen (Protran®, Schleicher & Schuell, Dassel) von 0,45µm Porengrösse geblottet. Anschliessend wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h bei RT in Blockingpuffer geschwenkt und darauf mit ausgewählten Serumverdünnungen (1:100, in Blockingpuffer) über Nacht bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS (10min, RT) wurden die Membranen in verdünnten, peroxidasekonjugierten Ziege-Anti-Kaninchen IgG's (1:2000, in Blockingpuffer) während

2h bei RT inkubiert und anschliessend nochmals jeweils 2x10min in TBS-Tween und in TBS gewaschen. Die immunologische Färbung erfolgte in der frisch angesetzten Entwicklerlösung während 10-30min.

Die Grössen der detektierten Proteinbanden wurden mit der BioCapt MW Version 99.03 (für Windows) ermittelt.

6. RESULTATE

6.1. SITUATION IN DER SCHWEIZ

Das Vorkommen der Myxomatose ist in den folgenden drei Abbildungen dargestellt.

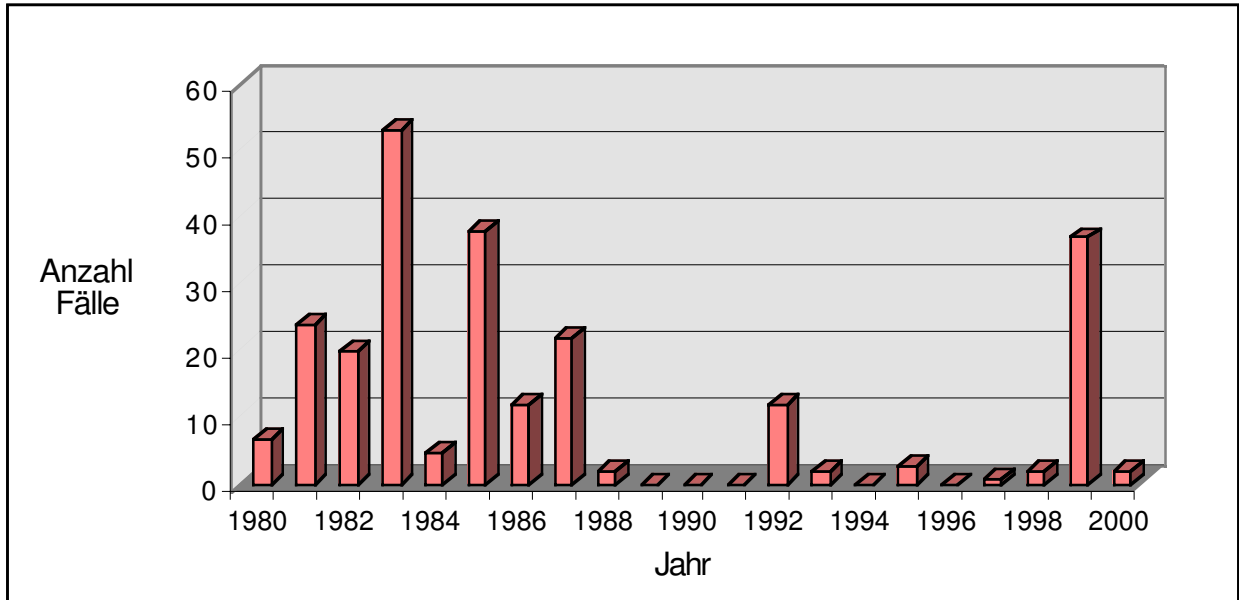


Abb. 5 Anzahl gemeldeter Myxomatosefälle in der Schweiz zwischen 1980 und 2001

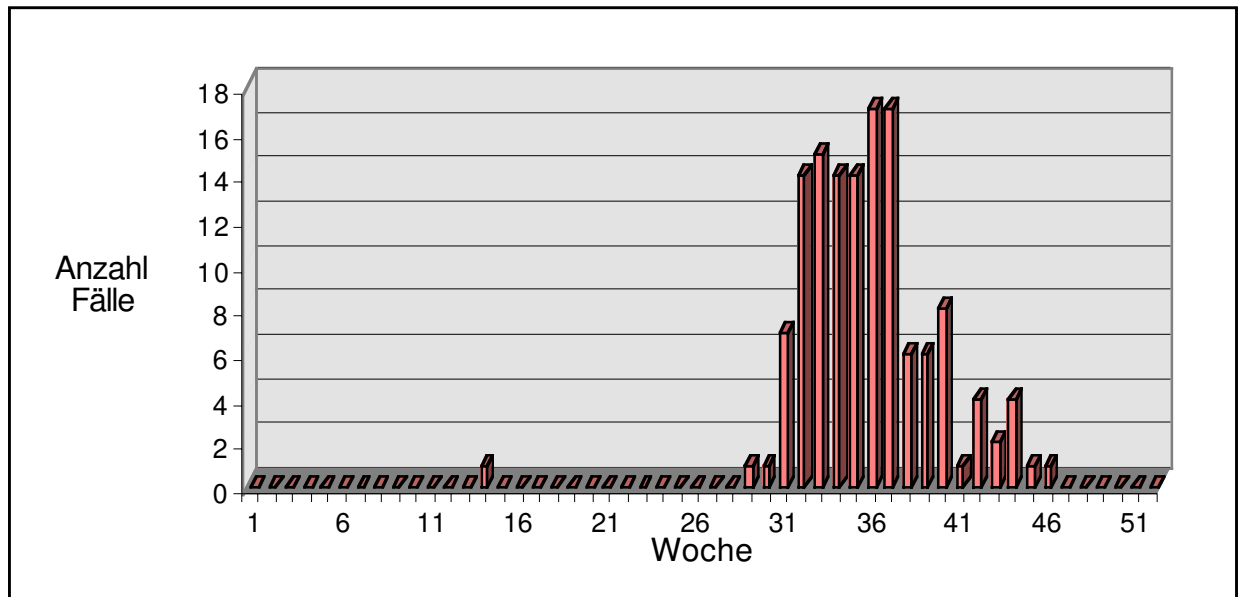


Abb. 6 Jahresverteilung der gemeldeten Myxomatosefälle zwischen 1980 und 2001

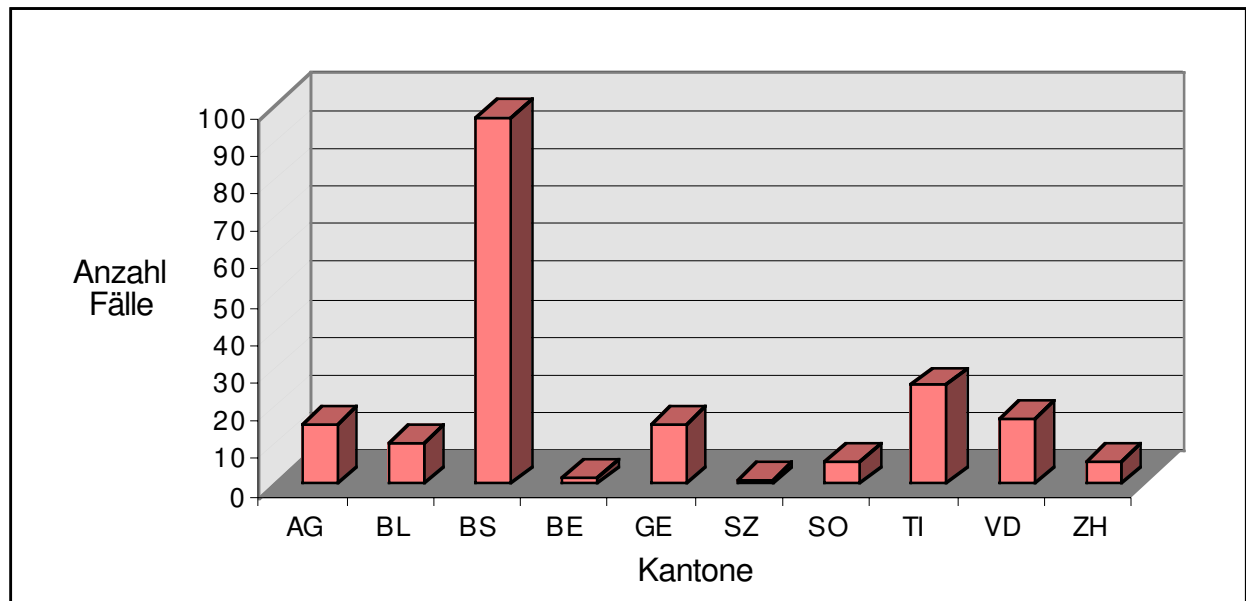


Abb. 7 Anzahl gemeldeter Myxomatosefälle in verschiedenen Kantonen zwischen 1980 und 2001

6.2. MASSNAHMEN IN SEUCHENFÄLLEN

Die Myxomatose der Haus- und Wildkaninchen gilt in der Schweiz als eine zu bekämpfende Tierseuche und ist anzeigepflichtig. In Verdachtsfällen wird die Diagnose durch die histologische Untersuchung von Hautgewebe oder mittels EM bestätigt. Im positiven Fall wird eine einfache Sperre 1. Grades über den Betrieb verhängt und die Tiere unblutig getötet und entsorgt. Zusätzlich wird ein den Umständen angepasstes Sperrgebiet angeordnet, in welchem jeglicher Handel und Verkehr mit lebenden Kaninchen verboten ist. Da blutsaugende Insekten zu den Hauptinfektionsquellen der Krankheit zählen, sind Vorkehrungen zu treffen, die das Eindringen von Insekten in die Stallungen verhindern. Die Sperrmassnahmen dürfen frühestens 30 Tage nach dem letzten Seuchenfall aufgehoben werden (TSV, 1995).

Eine Entschädigung der Tierverluste erfolgt nur bei Rassekaninchen durch den Kanichenzüchterverband. Entschädigungszahlungen in der Höhe von 80% werden allerdings nur bei getöteten Tieren geleistet. Umgestandene Tiere oder Tiere unter drei Monaten werden nicht kompensiert.

In besonderen Fällen kann die Tötung auf die erkrankten Tiere beschränkt und der Betrieb unter Quarantäne gestellt werden. Dem Halter ist es in dieser Zeit verboten, neue Tiere zu erwerben oder andere Kaninchenhalter und Ausstellungen zu besuchen. Diese Regelung kommt dann zum Tragen, wenn es sich um einzeln gehaltene Tiere handelt, die eine Funktion als „companion animal“ erfüllen (P. Gurdan, persönliche Mitteilung).

Da die Myxomatose in den angrenzenden Ländern nicht anzeige- oder meldepflichtig ist, gelangen Informationen zur Seuchenlage in Frankreich oder Deutschland meist nur über inoffizielle Wege in die Schweiz. Bei Verdachtsmeldungen aus dem Ausland werden im Kanton Basel-Stadt schon vor dem Ausbruch der Krankheit prophylaktische Schutzzonen errichtet, in denen Handel und Ausstellungen verboten sind (P. Gurdan, persönliche Mitteilung).

6.3. VIRUSVERMEHRUNG IN AFFENNIEREN-ZELLEN (MA 104)

Bei der Anzucht von Myxoma-Virus-Isolaten und Shope fibroma-Virus auf Affennierenzellen (MA104) konnten unterschiedliche cytopathogene Effekte beobachtet werden. Alle MV-Isolate bildeten nach einer Inkubationszeit von 3-5 Tagen p.i. deutliche Plaques, die sich nach 2 weiteren Tagen zu konfluierenden Läsionen im Zellrasen entwickelten (Abb. 8 und 9).

Die Vermehrung von Shope fibroma-Virus zeigte sich in der Bildung von Syncytien mit deutlich sichtbaren Kernbestandteilen und massiven Zelltrümmeransammlungen (proliferative Foci), deren Musterung von Auge zu erkennen war. Nach weiteren 2 Tagen bildeten sich kleine Plaques (Abb. 10 und 11).

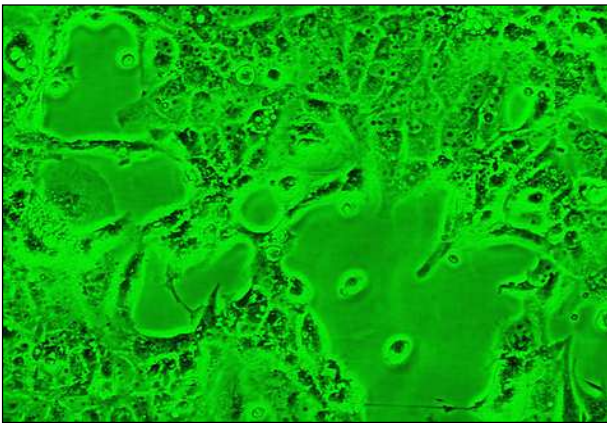


Abb.8 Plaques bei MV

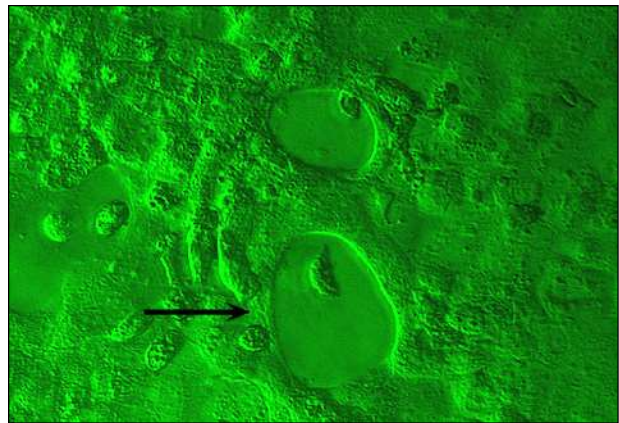


Abb. 9 Plaques bei MV (Phasenkontrast)

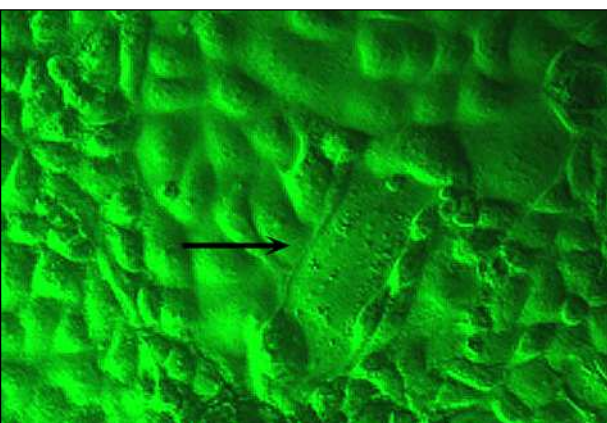


Abb. 10 Syncytienbildung bei SFV (PH)

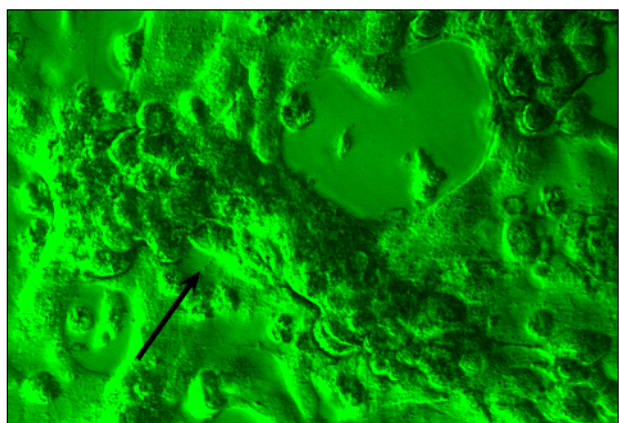


Abb. 11 Zelltrümmeransammlungen (Proliferative foci) bei SFV (PH)

6.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

6.4.1. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) ZUR AMPLIFIZIERUNG DES SERP 2-GENS

Insgesamt wurden 13 Haut- bzw. Organproben und 3 MV-Isolate molekularbiologisch untersucht (Tab. 8). Zu diesem Zweck wurde eine PCR zur Amplifikation des Serp2-Gens etabliert. Die ausgewählten Primer stammten aus der publizierten Sequenz von Petit und Mitarbeitern (1996). Primer 1 (low) bestand aus 20 Nukleotiden und umfasste den DNS-Bereich von 146661 - 146680, der zweite Primer (up) bestand aus 18 Nukleotiden innerhalb des DNS-Bereichs von 147742 – 147759.

Alle erhaltenen Amplifikate zeigten eine identische Grösse von ca. 1,1kb (Abb. 12 und 13). Um das Vorhanden sein von Hemmstoffen auszuschliessen, wurden Organproben mit der Positivkontrolle versehen und zusätzlich in der PCR untersucht. Das Ergebnis wurde in keinem Fall beeinflusst.

Tab. 8 Ergebnisse der Hautproben

	negativ	positiv
Proben unverdächtiger Tiere	5	0
Proben histologisch bestätigter Tiere Nase und Augenlid Lunge	4 2	2 0

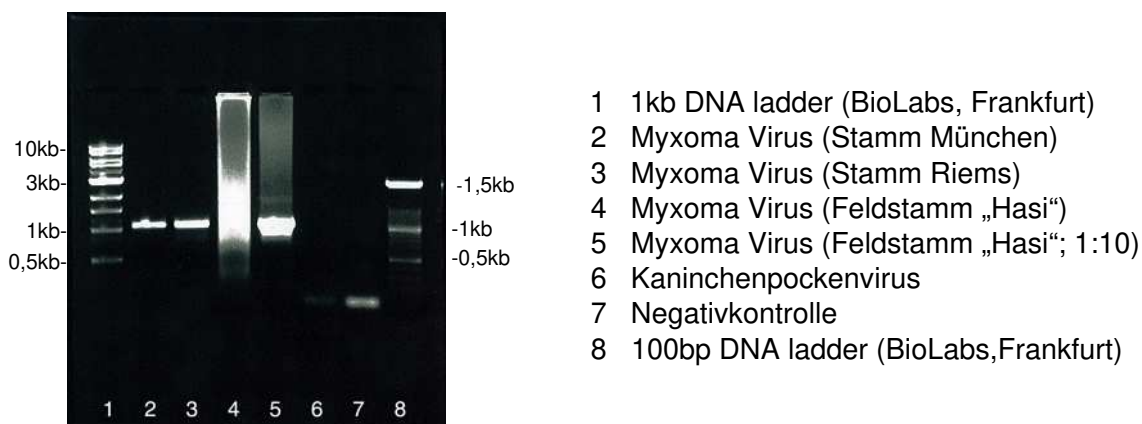


Abb. 12 PCR-Amplifikate der drei Myxoma-Virus-Stämme



- 1 1kb DNA ladder (BioLabs, Frankfurt)
- 2 Postivkontrolle (MV, Isolat Riems)
- 3 Negativkontrolle
- 4 Hautprobe eines erkrankten Tieres
- 5 Prozesskontrolle (DNS-Isolierung)

Abb.13 PCR-Amplifikat bei positivem Virusnachweis

6.4.2. Klonierung der PCR-AMPLIFIKATE FÜR DIE SEQUENZIERUNG

Die amplifizierten Serp2-Gene der drei Myxoma-Virus-Stämme wurden mittels des Topo TA Cloning Kit (Fa. Invitrogene, Holland) in den Plasmid-Vektor pCR 2.1 kloniert. Die erhaltene Plasmid-DNS wurde danach zur Überprüfung der Insertgrösse mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten (Abb. 14).



- | | |
|---------|-----------------------------|
| A 2-11 | Plasmid-DNS von MV (Riems) |
| A 1, 12 | 100bp und 1kb DNA ladder |
| B 2-11 | Plasmid-DNS von MV („Hasi“) |
| B 1,12 | 100bp und 1kb DNA ladder |

Abb. 14 Restriktionsenzymverdau

Um für die Sequenzierung eingesetzt werden zu können, wurden die Plasmide anschliessend mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit gereinigt.

6.4.3. NUKLEOTID – UND AMINOSÄURESEQUENZEN DES SERP 2-GENS

Mit einer Länge von 1002bp wiesen die untersuchten Sequenzen von MV-H, MV-M und MV-R die gleiche Länge auf wie die korrespondierenden Gene von MV-L und MV-U. MV-R und MV-H zeigten mehrere unregelmässig verteilte Punktmutationen (Abb. 15). MV-H besass an einer Position und MV-R an elf Positionen Basenabweichungen gegenüber MV-L. SFV zeigte an insgesamt 195 Positionen Abweichungen in der Nukleinsäurenabfolge und an 56 Positionen in der Aminosäuresequenz.

Auf der Basenebene waren MV-H und MV-M gegenüber den beiden MV-Stämmen Lausanne und Uriarra zu 100% homolog, während MV-R einen Homologiegrad von 98,9% aufwies. Die entsprechende Sequenz von Shope fibroma wies eine Homologie von 80,5% auf.

Abb. 15 Nukleinsäuresequenzen des 34kDa-Serp2-Gens der drei Myxoma Virus-Stämme im Vergleich zu den MV-Stämmen Lausanne und Uriarra und zum Shope fibroma-Virus (Abweichungen gegenüber MV-L und MV-U sind fettgedruckt)

146658 Primer 1 *1

AGTAGAGTATAATGTAT---AAGTGC**GATTATGGAGCTTTTCAAGCATTTCTCCAAT** MV-L¹
 CTTAGAGTATAATGTAT---AAGTGC**GATTATGGAGCTTTTCAAGCATTTCTCCAAT** MV-H²
 CTTAGAGTATAATGTAT---AAGTGC**GATTATGGAGCTTTTCAAGCATTTCTCCAAT** MV-M³
 CTTAGAGTATAATGTAT---AAGTGC**GATTATGGAGCTTTTCAAGCATTTCTCCAAT** MV-R⁴
 AGATATAATGTAT---AAGTGC**GATTATGGAGCTTTTCAAGCATTTCTCCAAT** MV-U⁵
 AATA**AGTAGATTATATAAGAAGTGCATTATGGAGCTTTTCAAATATTTCTTAAT** SFV⁶

146713

CGACAGCGTCGGACGTCTTCGTTTCTCCCGTATCCATTT**CAGCGGTTCTCGCCGTATT** MV-L
 CGACAGCGTCGGACGTCTTCGTTTCTCCCGTATCCATTT**CAGCGGTTCTCGCCGTATT** MV-H
 CGACAGCGTCGGACGTCTTCGTTTCTCCCGTATCCATTT**CAGCGGTTCTCGCCGTATT** MV-M
 CGACAGCGTCGGACGTCTTCGTTTCTCCCGTATCCATTT**CAGCGGTTCTCGCCGTATT** MV-R
 CGACAGCGTCGGACGTCTTCGTTTCTCCCGTATCCATTT**CAGCGGTTCTCGCCGTATT** MV-U
 CG**TCCGATCAGAA**TGT**GTTTATCTCTCCGGTATCCATTTGGCGGCTCTTGCCGTGTT** SFV

146771

ATTGGAAGGGGCAAAGGGACGCACTGCCGCGCAATTACGTCTCGCCCTAGAGCCGAGA MV-L
 ATTGGAAGGGGCAAAGGGACGCACTGCCGCGCAATTACGTCTCGCCCTAGAGCCGAGA MV-H
 ATTGGAAGGGGCAAAGGGACGCACTGCCGCGCAATTAC-TCTCGCCCTAGAGCCGAGA MV-M
 ATTGGAAGGGGCAAAGGGACGCACTGCCGCGCAATTACGTCTCGC**GCT**AGAGCCGAGA MV-R
 ATTGGAAGGGGCAAAGGGACGCACTGCCGCGCAATTACGTCTCGCCCTAGAGCCGAGA MV-U
 ATTGGAG**GGAGCAAAGGAACACACGGCCTTACAATTACGTATGGCGCTGGAACCTCGA** SFV

146829

TATTCCCATTGGATAAAGTAACCGTCGCATCCAGAGTATATGGCGACTGGAGACTGG MV-L
TATTCCCATTGGATAAAGTAACCGTCGCATCCAGAGTATATGGCGACTGGAGACTGG MV-H
TATTCCCATTGGATAAAGTAACCGTCGCATCCAGAGTATATGGCGACT**AG**AGACTGG MV-M
TATTCCCATT**AG**GATAAAGTAAC**AGT****AGC**CTCCAGAGTATAC**CG**GGCGACTGGAGACTGG MV-R
TATTCCCATTGGATAAAGTAACCGTCGCATCCAGAGTATATGGCGACTGGAGACTGG MV-U
T**ACT**CCCATTGGATAAAGT**CACC****AT**CG**CT**CCAGAGT**G**TATGGCGACTGGAGACTGG SFV

146887

ATATAAAACCCAAGTTTATGCAGGCGGTACGTGATCGATTTGAACTGGTAAACTTCAA MV-L
ATATAAAACCCAAGTTTATGCAGGCGGTACGTGATCGATTTGAACTGGTAAACTTCAA MV-H
ATATAAAACCCAAGTTTATGCAGGCGGTACGTGATCGATTTGAACTGGTAAACTTCAA MV-M
AT**G**TAA**AG**CCCAAGTTTATGCA**AG**CGGTACG**CGA**ACGATTTGAACTGGTAAACTTCAA MV-R
ATATAAAACCCAAGTTTATGCAGGCGGTACGTGATCGATTTGAACTGGTAAACTTCAA MV-U
ATATAAAACCCAAGTTTATGCA**AG**CGGTACG**CGA****CAA**ATT**CGAG****T**TGGTAAACTT**TAG** SFV

146945

TCACAGTCCTGAAAAGATTAAGGACGATATCAACCGATGGGTGGCGGCCAGAACAAT MV-L
TCACAGTCCTGAAAAGATTAAGGACGATATCAACCGATGGGTGGCGGCCAGAACAAT MV-H
TCACAGTCCTGAAAAGATTAAGGACGATATCAACCGATGGGTGGCGGCCAGAACAAT MV-M
TCACAGTCCTGAAAAGATTAAGGACGATATCAACCGATGGGTGGCGGCCAGAACAAT MV-R
TCACAGTCCTGAAAAGATTAAGGACGATATCAACCGATGGGTGGCGGCCAGAACAAT MV-U
TCACAGTCC**G**GAAAAGATTA**AA****AG**GACATCAACCGATGGGTGGCG**TG**TAAACA**AA**C SFV

147003

AATAAAATACTCAACGCCGTAAATAGTATCAGTCCTGACACTAAACTCCTCATCGTTCG MV-L
AATAAAATACTCAACGCCGTAAATAGTATCAGTCCTGACACTAAACTCCTCATCGTTCG MV-H
AATAAAATACTCAACGCCGTAAATAGTATCAGTCCTGACACTAAACTCCTCATCGTTCG MV-M
AATAAAATACTCAACGCCGTAAATAGTATCAGTCCTGACACTAAACTCCTCATCGTTCG MV-R
AATAAAATACTCAACGCCGTAAATAGTATCAGTCCTGACACTAAACTCCTCATCGTTCG MV-U
A**ACA**AGATA**ATA**AAACGC**G**GTAG**AT****TAC**AT**TAG**TC**AT**GATACTAAACTCCT**T**ATCGT**TG** SFV

147061

CAGCCATCTACTTTGAAGTGGCGTGGAGAAACCAATTTGTGCCCGACTTCACGATAGA MV-L
CAGCCATCTACTTTGAAGTGGCGTGGAGAAACCAATTTGTGCCCGACTTCACGATAGA MV-H
CAGCCATCTACTTTGAAGTGGCGTGGAGAAACCAATTTGTGCCCGACTTCACGATAGA MV-M
CAGCCATCTACTTTGAAGTGGCGTGGAGAAACCAATTTGTGCCCGACTTCACGATAGA MV-R
CAGCCATCTACTTTGAAGTGGCGTGGAGAAACCAATTTGTGCCCGACTTCACGATAGA MV-U
TGGCCATCTACT**T**CG**AG****G**T**CG**CGTGGAGAAACCAATTT**AT****AG****CT**GAT**T**TCACG**G**TAGA SFV

147119

GGGGGAGTTCTGGGTACCAAAGATGTGTCGAAGACGGTTCGAATGATGACATTGAGC MV-L
GGGGGAGTTCTGGGTACCAAAGATGTGTCGAAGACGGTTCGAATGATGACATTGAGC MV-H
GGGGGAGTTCTGGGTACCAAAGATGTGTCGAAGACGGTTCGAATGATGACATTGAGC MV-M
GGGGGAGTTCTGGGTACCAAAGATGTGTCGAAGACGGTTCGAATGATGACATTGAGC MV-R
GGGGGAGTTCTGGGTACCAAAGATGTGTCGAAGACGGTTCGAATGATGACATTGAGC MV-U
TGACGAGTT**T**TGG**A**TTACCA**AA****A**AC**G**T**AT**CGAAG**A****T**AG**T****AA**GAATGATGACT**T**TA**AG**C SFV

147177

GACGACTTCAGATTCGTGGACGTGAGGAACGAGGGCATAAAAAATGATAGAACTCCCGT MV-L
GACGACTTCAGATTCGTGGACGTGAGGAACGAGGGCATAAAAAATGATAGAACTCCCGT MV-H
GACGACTTCAGATTCGTGGACGTGAGGAACGAGGGCATAAAAAATGATAGAACTCCCGT MV-M
GACGACTTCAGATTCGTGGACGTGAGGAACGAGGGCATAAAAAATGATAGAACTCCCGT MV-R
GACGACTTCAGATTCGTGGACGTGAGGAACGAGGGCATAAAAAATGATAGAACTCCCGT MV-U
GACGACTTC**GAGATA**CGTGGACGT**G**CGGAACGAGGG**T**ATAAAAAAT**G**GTAGAACTCCCGT SFV

147235

ACGAGTACGGGTACTCCATGCTGGTTATCATTCCGGACGACTTAGAACAGGTTCGAACG MV-L
ACGAGTACGGGTACTCCATGCTGGTTATCATTCCGGACGACTTAGAACAGGTTCGAACG MV-H
ACGAGTACGGGTACTCCATGCTGGTTATCATTCCGGACGACTTAGAACAGGTTCGAACG MV-M
ACGAGTACGGGTACTCCATGCTGGTTATCATTCCGGACGACTTAGAACAGGTTCGAACG MV-R
ACGAGTACGGGTACTCCATGCTGGTTATCATTCCGGACGACTTAGAACAGGTTCGAACG MV-U
ACGAGTACGG**A**TACTCCATG**T**TGGTTATC**G**T**CCCC**GACG**A**T**A**T**T**GAAC**C**G**T**A**G**A**A**A SFV

147293

ACATCTGTCGCTTATGAAGGTTATATCATGGCTGAAAAATGTCCACGTTGCGATACGTA MV-L
ACATCTGTCGCTTATGAAGGTTATATCATGGCTGAAAAATGTCCACGTTGCGATACGTA MV-H
ACATCTGTCGCTTATGAAGGTTATATCATGGCTGAAAAATGTCCACGTTGCGATACGTA MV-M
ACATCTGTCGCTTATGAAGGTTATATCATGGCTGAAAAATGTCCACGTTGCGATACGTA MV-R
ACATCTGTCGCTTATGAAGGTTATATCATGGCTGAAAAATGTCCACGTTGCGATACGTA MV-U
AC**AC**CTGTCGCTTATGAA**A**GTTATA**A**CG**T**GG**T**GAAAAATGTCCA**AACTACGGT**ACGTA SFV

147351

CATCTCTCGTTTTCCCAAGTTCAAGATGGAAACCTCTTACACGCTAAACGAGGCGTTGG MV-L
CATCTCTCGTTTTCCCAAGTTCAAGATGGAAACCTCTTACACGCTAAACGAGGCGTTGG MV-H
CATCTCTCGTTTTCCCAAGTTCAAGATGGAAACCTCTTACACGCTAAACGAGGCGTTGG MV-M
CATCTCTCGTTTTCCCAAGTTCAAGATGGAAACCTCTTACACGCTAAACGAGGCGTTGG MV-R
CATCTCTCGTTTTCCCAAGTTCAAGATGGAAACCTCTTACACGCTAAACGAGGCGTTGG MV-U
CATCT**T**T**CG**TTTTCCCAAGTTCAA**A**ATGGAAAC**A**TCTTACAC**A**T**T**AAACG**A**T**G**C**A**T**T**G**A** SFV

147409

CGACATCGGGCGTAACAGATATCTTCGCACATCCTAACTTTCGAGGACATGACCGATGA MV-L
CGACATCGGGCGTAACAGATATCTTCGCACATCCTAACTT**T**GAGGACATGACCGATGA MV-H
CGACATCGGGCGTAACAGATATCTTCGCACATCCTAACTTTCGAGGACATGACCGATGA MV-M
CGACATCGGGCGTAACAGATATCTTCGCACATCCTAACTTTCGAGGACATGACCGATGA MV-R
CGACATCGGGCGTAACAGATATCTTCGCACATCCTAACTTTCGAGGACATGACCGATGA MV-U
TGGCGTCGG**T**G**T**T**AC**C**G**ATATCTT**TACA**AATCCT**G**ACTT**TGGC**GACATGACCG**ACGA** SFV

147467

CAAAAACGTGGCCGTGTCGGACATCTTTCACAAGGCCTACATAGAAGTGACCGAGTTC MV-L
CAAAAACGTGGCCGTGTCGGACATCTTTCACAAGGCCTACATAGAAGTGACCGAGTTC MV-H
CAAAAACGTGGCCGTGTCGGACATCTTTCACAAGGCCTACATAGAAGTGACCGAGTTC MV-M
CAAAAACGTGGCCGTGTCGGACATCTTTCACAAGGCCTACATAGAAGTGACCGAGTTC MV-R
CAAAAACGTGGCCGTGTCGGACATCTTTCACAAGGCCTACATAGAAGTGACCGAGTTC MV-U
CAA**A**G**A**T**G**T**A**A**C**A**G**TGTCGGACAT**T**T**T**C**A**T**A**A**G**T**C**C**T**ACATAGAAG**C**G**A**C**A**G**A**T**A**T SFV

147525

GGTACGACAGCTGCATCTTGTACGTACGGATGTGTTACAGACTTTGGTGGTACGATGG MV-L
 GGTACGACAGCTGCATCTTGTACGTACGGATGTGTTACAGACTTTGGTGGTACGATGG MV-H
 GGTACGACAGCTGCATCTTGTACGTACGGATGTGTTACAGACTTTGGTGGTACGATGG MV-M
 GGTACGACAGCTGCATCTTGTACGTACGGATGTGTTACAGACTTTGGTGGTACGATGG MV-R
 GGTACGACAGCTGCATCTTGTACGTACGGATGTGTTACAGACTTTGGTGGTACGATGG MV-U
 GGTACGAT**TCGC**GCATCTT**GC**ACGTAC**AGCTGC**GTTAC**GGAT**TTT**GGAGGAT**CGATGG SFV

147583

ATCCCGTCGTATTAAAGGTGAACAAGCCGTTCAATTTTCATCATCAAACACGACGACAC MV-L
 ATCCCGTCGTATTAAAGGTGAACAAGCCGTTCAATTTTCATCATCAAACACGACGACAC MV-H
 ATCCCGTCGTATTAAAGGTGAACAAGCCGTTCAATTTTCATCATCAAACACGACGACAC MV-M
 ATCCCGTCGTATTAAAGGTGAACAAGCCGTTCAATTTTCATCATCAAACACGACGACAC MV-R
 ATCCCGTCGTATTAAAGGTGAACAAGCCGTTCAATTTTCATCATCAAACACGACGACAC MV-U
 AT**TC**CGT**GGT**ATTAA**AGTAA**ACAAGCCGTT**CTA**TTTCATCAT**TAA**ACACGAC**GAT**AC SFV

147641

GTTTTCGTTACTATTCCTGGGTAGAGTCACTTCTCCCAATTACTAAATATGGATATCT MV-L
 GTTTTCGTTACTATTCCTGGGTAGAGTCACTTCTCCCAATTACTAAATATGGATATCT MV-H
 GTTTTCGTTACTATTCCTGGGTAGAGTCACTTCTCCCAATTACTAAATATGGATATCT MV-M
 GTTTTCGTTACTATTCCTGGGTAGAGTCACTTCTCCCAATTACTAAATATGGATATCT MV-R
 GTTTTCGTTACTATTCCTGGGTAGAGTCACTTCTCCCAATTACTAAATATGGATATCT MV-U
 GTTTTCGTTACT**GTTTG**TGGG**C**AGAGT**AACT**TCTC**TA**ATTACTAAATAC**CGG**ATATCT SFV

147699

*2
Primer 2

-TTAATCATTTAAATAGCATTAAACCCACGCACACGTTTTTGT**TTTCTCTCCTGTATCCG** MV-L
 -TTA**AC**CATTTAAATAGCATTAAACCCACGCACACGTTTTTGT**TTCTCTCCTGTATCCG** MV-H
 -TTAATCATTTAAATAGCATTAAACCCACGCACACGTTTTTGT**TTCTCTCCTGTATCCG** MV-M
 -TTAATCATTTAAATAGCATTAAACCCACGCACACGTTTTTGT**TTCTCTCCTGTATCCG** MV-R
 -TTAATCATTTAAATAGCATTAAACCCACGCACACGTTTTTGT**TTCTCTCCTGTATCCG** MV-U
TTTAATAATTTAAATAG**TATTTA-CAATAACGCGCTTGTTT****TTCTCGTAAAAAACA** SFV

147756

TTAG MV-L
TTAG MV-H
TTAG MV-M
TTAG MV-R
TTAG MV-U
CGTT SFV

- 3 Myxoma-Virus, Stamm Lausanne
- 4 Myxoma-Virus, Impfstamm München
- 5 Myxoma-Virus, Feldstamm „Hasi“
- 6 Myxoma-Virus, Impfstamm Riems
- 7 Myxoma-Virus, Stamm Uriarra
- 8 Shope fibroma-Virus

*1 Start

*2 Stop

Abb. 16 Vergleichende Darstellung der aus den Basensequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen von MV-H, MV-M und MV-R

1

MELFKHFLQSTASDV FVSPVSI SAVLAVLLEGAKGR TAAQLRLALEPRYS HLDK MV-L
 MELFKHFLQSTASDV FVSPVSI SAVLAVLLEGAKGR TAAQLRLALEPRYS HLDK MV-H
 MELFKHFLQSTASDV FVSPVSI SAVLAVLLEGAKGR TAAQLRLALEPRYS HLDK MV-M
 MELFKHFLQSTASDV FVSPVSI SAVLAVLLEGAKGR TAAQLRLALEPRYS HLDK MV-R
 MELFKHFLQSTASDV FVSPVSI SAVLAVLLEGAKGR TAAQLRLALEPRYS HLDK MV-U
 MELFK**YFLKSDQN**VFI SPVSI SA**AL**AVLLEGAK**EH**T**AL**QLR**MA**LEPRYS HLDK SFV

55

VTVASRVYGDWRLDIKPKFMQAVRDRFELVNFNHSPEKIKDDINRWVAARTNNK MV-L
 VTVASRVYGDWRLDIKPKFMQAVRDRFELVNFNHSPEKIKDDINRWVAARTNNK MV-H
 VTVASRVYGDWRLDIKPKFMQAVRDRFELVNFNHSPEKIKDDINRWVAARTNNK MV-M
 VTVASRVYGDWRLDVKPKFMQAVRERFELVNFNHSPEKIKDDINRWVAARTNNK MV-R
 VTVASRVYGDWRLDIKPKFMQAVRDRFELVNFNHSPEKIKDDINRWVAARTNNK MV-U
 VT**I**ASRVYGDWRLDIKPKFMQAVR**D**KFELVNF**S**HSP**E**KIK**K**DINRWV**A**CKTNNK SFV

109

ILNAVNSISPDTKLLIVAAIYFEVAWRNQFVPDFTIEGEFWVTKDVSKTVRMMT MV-L
 ILNAVNSISPDTKLLIVAAIYFEVAWRNQFVPDFTIEGEFWVTKDVSKTVRMMT MV-H
 ILNAVNSISPDTKLLIVAAIYFEVAWRNQFVPDFTIEGEFWVTKDVSKTVRMMT MV-M
 ILNAVNSISPDTKLLIVAAIYFEVAWRNQFVPDFTIEGEFWVTKDVSKTVRMMT MV-R
 ILNAVNSISPDTKLLIVAAIYFEVAWRNQFVPDFTIEGEFWVTKDVSKTVRMMT MV-U
 I**I**NAV**DY**IS**H**DTKLLIV**V**AIYFEVAWRNQF**I**ADFT**V**DDEFW**I**T**K**N**V**SK**I**VRMMT SFV

163

LSDDFRFVDVRNEGIIKMIELPYEYGY SMLV IIPDDLEQVERHLSLMKVISWLKM MV-L
 LSDDFRFVDVRNEGIIKMIELPYEYGY SMLV IIPDDLEQVERHLSLMKVISWLKM MV-H
 LSDDFRFVDVRNEGIIKMIELPYEYGY SMLV IIPDDLEQVERHLSLMKVISWLKM MV-M
 LSDDFRFVDVRNEGIIKMIELPYEYGY SMLV IIPDDLEQVERHLSLMKVISWLKM MV-R
 LSDDFRFVDVRNEGIIKMIELPYEYGY SMLV IIPDDLEQVERHLSLMKVISWLKM MV-U
 LSDD**LRY**VDVRNEGIIK**M**VELPYEYGY SMLV**I**VPDD**I**E**H**VE**K**HLSLMKV**I**TWLKM SFV

217

STLRYVHLSFPKFKMETS YTLNEALATSGVTDIFAHPNFEDMTDDKNVAVSDIF MV-L
 STLRYVHLSFPKFKMETS YTLNEALATSGVTDIFAHPNFEDMTDDKNVAVSDIF MV-H
 STLRYVHLSFPKFKMETS YTLNEALATSGVTDIFAHPNFEDMTDDKNVAVSDIF MV-M
 STLRYVHLSFPKFKMETS YTLNEALATSGVTDIFAHPNFEDMTDDKNVAVSDIF MV-R
 STLRYVHLSFPKFKMETS YTLNEALATSGVTDIFAHPNFEDMTDDKNVAVSDIF MV-U
 S**K**LRYVHLSFPKFKMETS YTL**N**D**A**L**M**ASGVTDI**F**T**N**P**D**F**G**DMTDD**K**D**V**T**V**SDIF SFV

6.5. SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

6.5.1. PLAQUEREDUKTIONSTEST, ELISA 1 UND ELISA 2

Die Ergebnisse sind in den Tab. 10, 11 und 12 aufgeführt.

Mittels der beschriebenen Präadsorptionsmethoden konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben gefunden werden.

Tab. 10 Ergebnisse der im Plaquereduktionstest getesteten Seren

	negativ		positiv
Negativkontrollseren	42		0
Positivkontrollseren			
Klinisch erkrankte, natürlich infizierte Tiere	0		3
Homolog immunisierte Tiere	1		7
Heterolog immunisierte Tiere	2		6
Feldseren	338		7
Seren chlamydienimmunisierter Tiere	16		0

Tab. 11 Ergebnisse der im ELISA 1 getesteten Seren

	negativ	grenzwertig	positiv
Negativkontrollseren	23	14	5
Positivkontrollseren			
Klinisch erkrankte, natürlich infizierte Tiere	0	0	3
Homolog immunisierte Tiere	0	0	8
Heterolog immunisierte Tiere	0	0	8
Feldseren	184	112	49
Seren chlamydienimmunisierter Tiere	0	1	15

Tab. 12 Ergebnisse der im ELISA 2 getesteten Seren

	negativ		positiv
Negativkontrollseren	37		5
Positivkontrollseren			
Klinisch erkrankte, natürlich infizierte Tiere	0		3
Homolog immunisierte Tiere	1		7
Heterolog immunisierte Tiere	0		8
Feldseren	258		87
Seren chlamydienimmunisierter Tiere	1		15

Die Ergebnisse der Negativ- bzw. Positivkontrollseren sowie der Feldseren und der Proben der chlamydienimmunisierten Tiere sind zusätzlich graphisch dargestellt (Abb. 17-20).

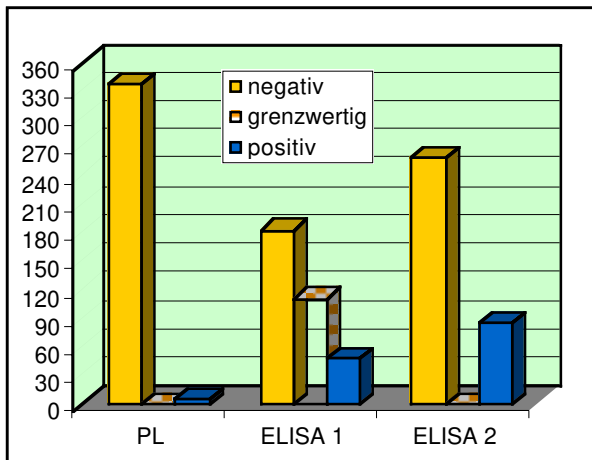


Abb.17 Resultate der Negativkontrollseren

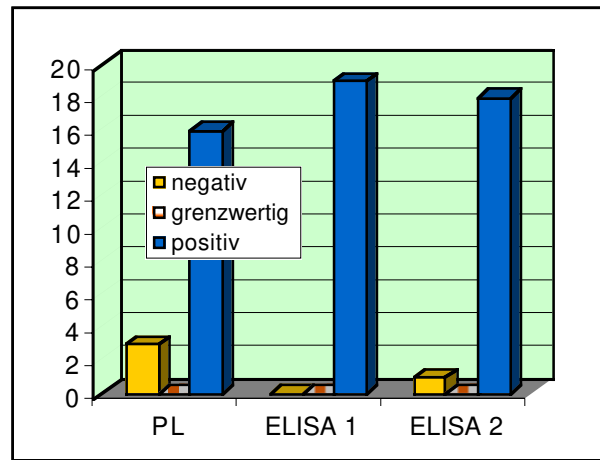


Abb.18 Resultate der Positivkontrollseren

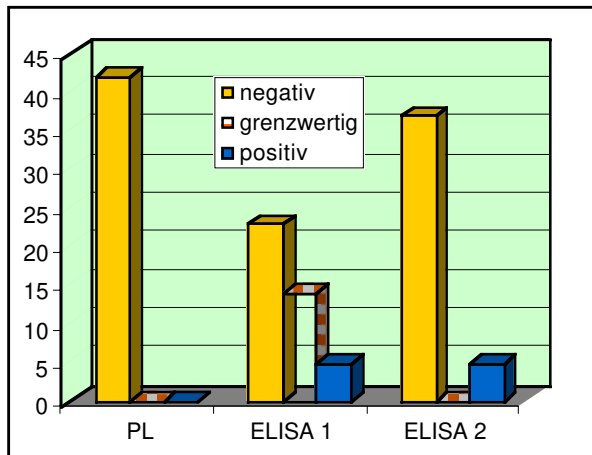


Abb. 19 Resultate der Feldseren

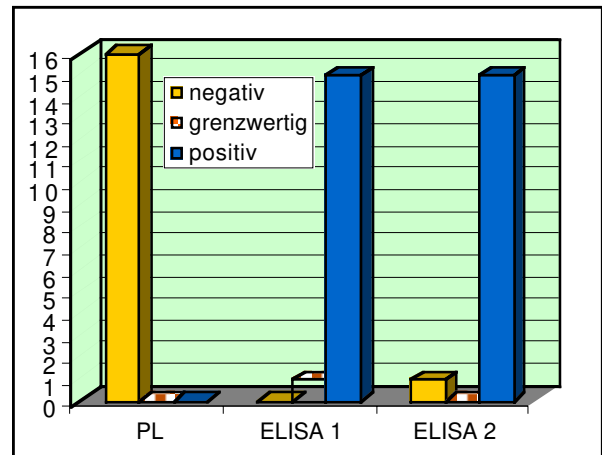


Abb. 20 Resultate chlamydien-immunisierter Tiere

6.5.2. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER ELISA-TESTSYSTEME IM VERGLEICH ZUM PLAQUEREDUKTIONSTEST

Die Sensitivität beschreibt die Fähigkeit eines Testsystems, ein Merkmal zu erkennen, wenn es vorhanden ist. Dieser Wert gibt den Anteil infizierter Tiere mit positivem Testergebnis an der Gesamtheit der getesteten infizierten Tiere an. Die Spezifität ist die Fähigkeit eines Tests, ein negatives Ergebnis zu liefern, wenn das gesuchte Merkmal nicht vorhanden ist.

Ist die Sensitivität ungenügend, liefert der Test falsch-negative Resultate. Eine ungenügende Spezifität führt zu falsch-positiven Resultaten. Sensitivität und Spezifität können genauer bestimmt werden, wenn die fraglichen Testsysteme mit einer Methode verglichen werden, deren Qualität bekannt ist und somit als Standard benutzt werden kann (Lorenz, 1990). In dieser Arbeit diente der Plaquereduktionstest als Referenztest. Grenzwertige Resultate von ELISA 1 sind in diesen Berechnungen nicht berücksichtigt.

Tab. 13 Vergleich der Feldseren in ELISA 1 und im Plaquereduktionstest

ELISA 1 \ PRT	PRT		Total ELISA 1
	positiv	negativ	
positiv	5	44	49
negativ	2	182	184
Total PL	7	226	233

ELISA 1 besitzt gegenüber dem Plaquereduktionstest eine Sensitivität von $5/7 \times 100 = 71\%$ und eine Spezifität von $182/226 \times 100 = 81\%$. Der positiv-prädikative Wert gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein im ELISA 1 positives Serum auch im Plaquereduktionstest positiv ist. Er betrug $5/49 \times 100 = 10\%$. Der negativ-prädikative Wert betrug $182/184 \times 100 = 99\%$. In Relation zum Plaquereduktionstest zeigte ELISA 1 eine diagnostische Effizienz von $(5+182) / 233 \times 100 = 80\%$.

Tab. 14 Vergleich der Feldseren in ELISA 2 und im Plaquereduktionstest

ELISA 2 \ PRT	PRT		Total ELISA 2
	positiv	negativ	
positiv	5	59	64
negativ	2	167	169
Total PL	7	226	233

Die relative Sensitivität des ELISA 2 im Vergleich zur Plaquereduktion betrug $5/7 \times 100 = 71\%$ und die Spezifität betrug $167/226 \times 100 = 74\%$. Der positiv-prädikative Wert betrug demnach $5/64 \times 100 = 4,5\%$ und der negativ-prädikative Wert $167/169 \times 100 = 99\%$. ELISA 2 zeigte in Relation zum PRT eine diagnostische Effizienz von $(5+167) / 233 = 74\%$.

6.5.3. ANHAND VON NEGATIV- UND POSITIVSEREN ERMITTELTE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Tab. 15 ELISA 1

Ergebnis	Positivkontrollseren	Negativkontrollseren
positiv	19	5
grenzwertig	0	14
negativ	0	23
Total	19	42

Die Sensitivität betrug $17/19 \times 100 = 89\%$ und die Spezifität $23/42 \times 100 = 54\%$. Grenzwertige Resultate von ELISA 1 wurden als falsch-positive Ergebnisse in die Berechnung eingeschlossen.

Bei Einbezug nur eindeutig positiver bzw. negativer Resultate erhält man für ELISA 1 eine Spezifität von $23/28 \times 100 = 82\%$.

Tab. 16 ELISA 2

Ergebnis	Positivkontrollseren	Negativkontrollseren
positiv	18	5
negativ	1	37
Total	19	42

Für ELISA 2 betrug die Sensitivität $18/19 \times 100 = 95\%$ und die Spezifität $37/42 \times 100 = 88\%$.

Tab. 17 Plaquereduktionstest

Ergebnis	Positivkontrollseren	Negativkontrollseren
positiv	16	0
negativ	3	42
Total	19	42

Der Plaquereduktionstest erreichte eine Sensitivität von $16/19 \times 100 = 84\%$ und eine Spezifität von $42/42 \times 100 = 100\%$.

6.5.4. VIERFELDER-TEST (McNEMAR)

Mit dem McNemar-Chi-Quadrat-Test liess sich zwischen ELISA 1 und ELISA 2 im Vergleich zum Plaquereduktionstest signifikante Unterschiede in der Nachweishäufigkeit myxomatose-positiver Proben feststellen ($p < 0,05$).

6.6. WESTERN BLOT

6.6.1. SPEZIFITÄTSKONTROLLE

Mit Hilfe des Western Blot-Assay wurden sämtliche Negativ- bzw. Positivkontrollseren getestet. Bei den Feldseren wurden stichprobenartig die Proben untersucht, die in der Plaquereduktion und in den beiden ELISA unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen. Die Seren der chlamydienimmunisierten Tiere wurden ebenfalls getestet.

Tab. 18 Zusammenfassung der Ergebnisse im Western Blot

	negativ	positiv
Negativkontrollseren	42	0
Positivkontrollseren		
Klinisch erkrankte, natürlich infizierte Tiere	0	3
Homolog immunisierte Tiere	3	3
Heterolog immunisierte Tiere	0	6
Feldseren (44 getestete Proben)	44	0
Seren chlamydienimmunisierter Tiere	16	0

6.6.2. VERGLEICH DETEKTIERTER PROTEINBANDEN

Seren natürlich infizierter Tiere und Seren homolog bzw. heterolog immunisierter Tiere wurden hinsichtlich ihres Proteinbandenmusters im Western Blot verglichen (Abb. 12 und 13).

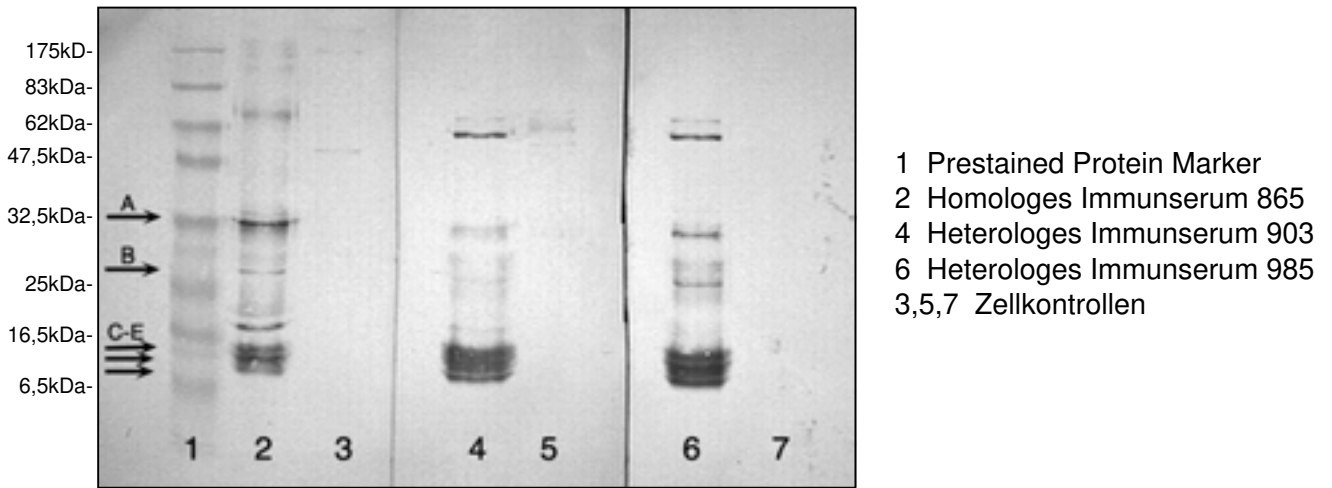


Abb. 21 Proteinbandenmuster homolog bzw. heterolog immunisierter Tiere

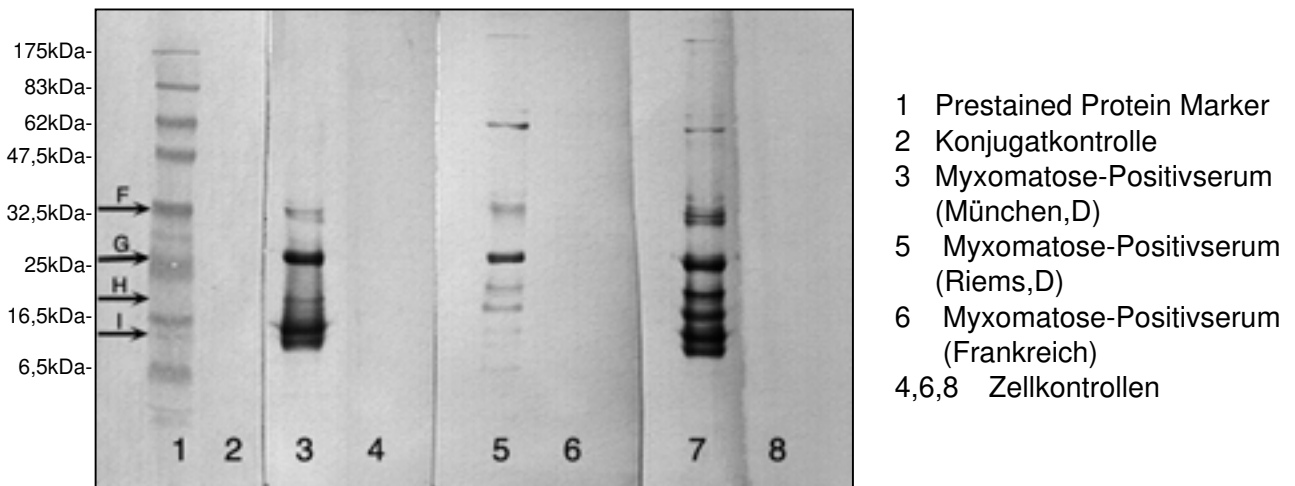


Abb. 22 Proteinbandenmuster natürlich infizierter Tiere

A/F ca. 32 kDa
B/G ca. 26 kDa
C/I ca. 13 kDa
H ca. 20 kDa
D ca. 11 kDa
E ca. 8 kDa

Die untersuchten Seren der homolog bzw. heterolog immunisierten Kaninchen wiesen fünf gemeinsame Banden auf, welche bei ca. 32, 26, 13, 11 und 8 kDa lagen. Letztere drei stellten sich am deutlichsten dar.

Bei den natürlich infizierten Tieren wurden vier gemeinsame Proteinbanden gefunden (32, 26, 20 und 13 kDa), wobei die, welche einem Molekulargewicht von ca. 26 kDa entsprach, die stärkste Reaktion zeigte.

Beim Vergleich aller Proben blieben drei gemeinsame Proteinbanden, welche sich bei Seren von homolog/heterolog immunisierten Tieren wie auch bei Seren von natürlich infizierten Tieren darstellten. Sie entsprechen drei Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 32, 26 und 13 kDa.

7. DISKUSSION

7.1. EPIDEMIOLOGISCHE SITUATION IN DER SCHWEIZ

Im Laufe der letzten zwanzig Jahre hat die Inzidenz der Myxomatose innerhalb der Hobby- und Rassekaninchenpopulationen kontinuierlich abgenommen. Während von 1980-1990 jährlich zwischen 10 und 50 Betriebe betroffen waren, wurden in den letzten zehn Jahren nur wenige Ausbrüche dokumentiert (Mitteilungen des BVET, 1980-2000). Die Hauptursache liegt in der Populationsdynamik der Wildkaninchen, die seit 1980 einen kontinuierlichen Rückgang zeigt (Abschusstatistik, BUWAL, 1980-2000). Seit 1995 konnten keine grösseren Populationen mehr gezählt werden; letzte Gruppen wurden in der Magadino-Ebene (Kt. Tessin), auf der St. Petersinsel (Kt. Bern) und im Gebiet von Basel-Land und Basel-Stadt gesichtet (T. Vanzetti, 2000; P. Gurdan, 2000; persönliche Mitteilung). Eine Untersuchung von Puech (1980) zeigte, dass Ausbrüche in der Wildkaninchenpopulation mit einer Verspätung von 6-8 Wochen in derselben Gegend Krankheitsfälle bei Hauskaninchen nach sich zogen. Dies zeigt eine enge Verknüpfung der Seuchenzüge bei Wild- und Hauskaninchen und weist auf ein endemisches Vorkommen der Myxomatose innerhalb der Wildpopulation hin. Die Beobachtung der Koninzenz von Ausbrüchen führte auch bei Arthur und Louzis (1988) zu der Vermutung, dass Insekten für die Übertragung verantwortlich sind und die Erkrankung bei Hauskaninchen das Resultat einer sylvatischen Myxomatose ist.

Die „Eintrittspforten“ der Myxomatose liegen in den Kantonen Basel-Stadt, Tessin, Waadt und Genf, wo insgesamt die meisten Fälle dokumentiert wurden. Das Auftreten regelmässiger Seuchenzüge in grenznahen Gebieten der Schweiz wird vor allem durch die in Frankreich, Deutschland und Italien existierenden Wildpopulationen beeinflusst. Während in Frankreich durch serologische Untersuchungen ca. 50% der Wildkaninchen als Antikörperträger identifiziert worden sind, werden in Deutschland hauptsächlich in den östlichen Bundesländern, aber auch in Bayern und in Gebieten entlang des Rheins regelmässig Seuchenzüge registriert. Aus Endemiegebieten in Frankreich wandern immer wieder Wildkaninchen in die Schweiz ein. Bis vor wenigen Jahren wurden im Raum Basel regelmässig Tiere entlang der Bahndämme an der deutsch-

schweizerischen Grenze gesichtet (P. Gurdan, 2000, persönliche Mitteilung). Der Rhein spielt in zweierlei Hinsicht eine Rolle: Er bildet eine Migrationsbarriere aus Deutschland, ist aber gleichzeitig ökologische Nische für Insekten. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die grosse Anzahl Hauskaninchen, die im Raum Basel in zahlreichen grenznah liegenden Familiengärten gehalten werden. Zudem muss mit einem geringfügigen Anteil an illegal importierten Tieren und mit grenzübergreifendem Handel gerechnet werden.

Demgegenüber wiesen die Kantone Wallis und Graubünden, ebenfalls grenz-anstossend, während der letzten zwanzig Jahre keine dokumentierten Fälle auf. Da die Grenzen beider Kantone grösstenteils durch voralpines und alpines Gebiet führen, findet keine Einwanderung von Wildkaninchen aus dem Ausland statt.

1999 wurde mit 37 betroffenen Beständen der grösste Seuchenzug der letzten zehn Jahre dokumentiert. Der grösste Teil der Fälle wurde aus dem Raum Basel und aus grenznahen Gemeinden der Kantone Solothurn und Zürich gemeldet. Zusätzlich traten vier Fälle im Zürcher Oberland auf, welche entweder auf den Zukauf bereits infizierter Tiere aus grenznahen Gebieten oder auf die Einschleppung virustragender Vektoren zurückzuführen sind.

Fast alle dokumentierten Fälle traten im Spätsommer und Herbst auf und folgten damit der saisonalen Verteilung, wie sie auch im übrigen Mitteleuropa vorkommt. Ausserhalb dieser Norm wurde im April 2000 ein an Myxomatose verendetes Wildkaninchen im Raum Basel gemeldet. Eine Übertragung durch Mücken ist abhängig von Wärme und Feuchtigkeit auch im Frühling möglich, jedoch seltener. Der zweite in Frage kommende Vektor, der Kaninchenfloh (*Spinopsyllus cuniculi*), zeigt eine saisonunabhängige Präsenz (Muirhead-Thomson, 1956; Service, 1971) und ist bei Wildkaninchen im benachbarten Ausland weit verbreitet (Hoop, persönliche Mitteilung). Bei Rasse- und Hobbytieren in der Schweiz wurden bisher kaum Flöhe gefunden (Sektionsstatistik, NRGK, 2000). Andrewes et al. (1956) und Arthur und Louzis (1988) vermuten, dass verschiedene Mückenspezies das Virus bei ihrer Überwinterung mittragen und im folgenden Frühjahr erneut Kaninchen infizieren können. Dies konnte bisher nur in

intensiven Kaninchenhaltungen beobachtet werden, wo sich ideale Temperaturbedingungen für Insekten bieten.

Die Entwicklung der epidemiologischen Situation in den kommenden Jahren ist von zwei Faktoren abhängig: Der Wildkaninchenzahl in der Schweiz und dem Angebot an ökologischen Nischen für blutsaugende Insekten. Aufgrund der engen Verknüpfung des Krankheitszyklus bei Haus- und Wildkaninchen wird es nur zu vermehrten Ausbrüchen kommen, wenn sich stabile Wildpopulationen in der Schweiz ansiedeln. Der Verlauf einzelner Seuchenzüge und ihre Jahresverteilung wird vor allem von der Vektorsituation abhängen. Durch die Klimaerwärmung und den langsamen Anstieg der Jahresdurchschnittstemperaturen könnten sich die Verbreitungsgebiete der Insekten in nördlichere Breitengrade ausdehnen (Epstein, 2001; Wittmann et al., 2001), und bestimmte Spezies werden vermehrt Überwinterungsmöglichkeiten finden.

Dies bedeutet, dass ein Anstieg der Seuchenzüge im Frühjahr erwartet werden muss, da verantwortliche Vektoren aufgrund des zunehmend wärmeren Klimas bereits in den Frühlingsmonaten aktiv sind.

7.2. MV-ISOLATE UND SHOPE FIBROMA-VIRUS IN DER ZELLKULTUR

In unseren Untersuchungen mit Zellkulturen haben wir zwei Fragestellungen betrachtet: Die Unterschiede der Myxoma-Virus-Isolate bis zur Ausbildung eines cytopathogenen Effektes und den Vergleich mit dem von Shope fibroma-Virus entwickelten CPE.

Alle drei MV-Isolate bildeten in MA 104-Zellen nach einer Bebrütungsdauer von 4-6 Tagen kleine, später konfluierende Plaques aus. Die Geschwindigkeit der Plaquebildung scheint vor allem von der Adaption an den Zelltyp abhängig zu sein. Durch mehrere Passagierungen wurde die Dauer bis zu den ersten Läsionen im Durchschnitt um einen Tag verkürzt. Ein Isolat, welches bereits auf Kaninchennierenzellen (RK13) gezüchtet wurde, produzierte in der ersten Passage bereits nach drei Tagen kleine Plaques.

Das Shope fibroma-Virus wurde ebenfalls in MA 104-Zellen vermehrt. Im Gegensatz zu MV-Isolaten produzierte SFV nach 3-4 Tagen Syncytien und massive Zelltrümmeransammlungen. Eine Plaquebildung konnte erst nach ca. 7-8 Tagen beobachtet werden. Woodroffe und Fenner (1964), sowie Padgett und Mitarbeiter

(1962) untersuchten das Verhalten der gleichen Viren auf verschiedenen Zelltypen. Verschiedene MV-Stämme produzierten auf allen Zelltypen kleine Plaques; Shope fibroma-Virus produzierte auf Kaninchenembryofibroblasten Plaques, auf Kaninchen-nierenzellen ausschliesslich proliferative Foci (Zelltrümmeransammlungen). Die Gründe, dass bei der Anzucht von Shope fibroma-Virus in MA104-Zellen beide beschriebenen Effekte ausgebildet wurden, kann von der Zellart oder von der Dauer der Bebrütung abhängig sein. Woodroffe und Fenner (1964) bebrüteten alle verwendeten Zelltypen während 6 Tagen; in unseren Untersuchungen wurde Shope fibroma-Virus über 7-8 Tage inkubiert, was die zusätzliche Bildung von Plaques erklären könnte.

Die Unterscheidung beider Virusspezies ist somit über die Vermehrung in Zellen möglich. Die Nutzung dieser Nachweismethode in der Routinediagnostik ist aber nur sinnvoll, wenn beide Erreger in der Wildpopulation verbreitet sind. Die Kaninchenfibromatose (Shope fibroma-Virus) wurde bisher nur beim Baumwollschwanzkaninchen in Südamerika und den USA beobachtet (Michigan Wildlife Diseases Manual, 2000).

7.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

7.3.1. CHARAKTERISIERUNG VON MV-ISOLATEN

Alle drei sequenzierten Gen-Bereiche der MV-Isolate (MV-H, MV-M, MV-R) wiesen die gleiche Basensequenzlänge auf wie die bereits publizierten Stämme Lausanne und Uriarra (Petit et al., 1996; Messud-Petit et al., 1998; Cameron et al., 1999; Best et al., 2000). Die abgeleitete Aminosäuresequenz entsprach einem Protein von 333 Aminosäuren. Die Isolate MV-R und MV-H zeigten mehrere Punktmutationen, die aber weder zu einer Verschiebung im offenen Leseraster (ORF) noch zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz führten. Diese Mutationen, auch stumme Mutationen genannt, blieben für die Struktur und Funktion des Proteins ohne Konsequenzen. Der hohe, fast 100%-ige Homologiegrad aller untersuchten Isolate mit Lausanne und Uriarra zeigt, dass der Genbereich, der für Serp2 codiert, nur wenigen Mutationen unterworfen und somit hochkonserviert ist. Dies gilt meist für Proteine, die für das Virus unentbehrlich sind: Serp2 bindet als Virulenzfaktor spezifisch an Interleukin-1 β und hemmt die Entzündungsantwort des Wirtes (Petit et al., 1996). Dieser Mechanismus fördert die Replikation des Virus im Organismus (Macen et al., 1993; Barret et al., 2001). Russel und Robbins wiesen bereits 1989 nach, dass die hohe Konservierung der Gene für das gesamte MV-Genom zutrifft.

Der Vergleich mit den von Willer und Mitarbeitern (1999) publizierten Aminosäuresequenzen des Shope fibroma-Virus ergab eine Homologie von 83%. Mit der von uns verwendeten PCR konnte bei SFV kein Amplifikat nachgewiesen werden.

7.3.2. DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION IN DER ROUTINEDIAGNOSTIK

Im Hinblick auf die Nutzung einer PCR in der Routinediagnostik wurden Haut- und Lungenproben von erkrankten und gesunden Tieren untersucht. In nur zwei von sechs histologisch bestätigten Hautproben konnte DNS nachgewiesen werden. Eine Isolierung aus der Lunge war nicht möglich. Marlier und Mitarbeiter (1999) versuchten, den Erreger im Gewebe experimentell infizierter Versuchstiere nachzuweisen. Trotz vorgängiger Anzucht in Zellkulturen zeigten nur ca. ein Drittel aller Proben ein positives Resultat in

der PCR. Die Wahrscheinlichkeit, aus natürlich oder experimentell infizierten Tieren DNS zu isolieren, scheint vor allem von Art und Zeitpunkt der Probengewinnung abhängig zu sein. In unseren Untersuchungen waren weder die primäre Inokulationsstelle noch das genaue Stadium der Erkrankung bekannt. Best und Kerr (2000) bewiesen, dass höchste Virustiter in der Haut ca. 6 Tage p.i. erreicht werden. Die besten Ergebnisse wurden bei Proben erzielt, die 1-2 Tage nach dem Auftreten klinischer Symptome genommen wurden. Im Gegensatz dazu ist der Nachweis im histologischen Schnitt zeitunabhängiger, da durch Virus verursachte Veränderungen bestehen bleiben.

Als eine weitere mögliche Fehlerquelle muss die Aufbereitung des Organmaterials betrachtet werden. Die vorhandene DNS-Menge kann zu gering sein, um zu einem gesicherten Nachweis zu führen. Andererseits kann ein zu hoher DNS-Gehalt der Probe zu falsch-negativen Ergebnissen führen, da mit der DNS möglicherweise Inhibitoren der PCR koextrahiert werden, welche die Amplifizierung hemmen (Syvanen et al., 1988). Von Higuchi (1989) wurde berichtet, dass einige Blutbestandteile, die mit der DNS zusammen aufgereinigt werden, die Taq-DNS-Polymerase inhibieren können. Deswegen wurden gleichzeitig die Proben der Lungen und dieselben Proben, versehen mit der Positivkontrolle, in der PCR untersucht, um sicherzustellen, dass ein negatives Ergebnis nicht durch Hemmstoffe im Ausgangsmaterial verursacht ist.

Aufgrund unserer Ergebnisse muss die PCR als mässig geeignetes Nachweisverfahren für die Diagnose der Myxomatose angesehen werden. Eine Eignung besteht vor allem bei Tieren, die eine klinische Symptomatik zeigen. In diesem Zeitabschnitt besteht die grösste Wahrscheinlichkeit für eine nachweisbare DNS-Menge in Haut oder nasokonjunktivalen Sekreten (Best und Kerr, 2000). Weniger zuverlässig scheint die Entnahme von Hautproben post mortem, da in diesen Fällen häufig keine Angaben über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung bekannt sind und der Erreger eventuell nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Eine weitere Validierung ist notwendig. Für die Prüfung der Sensitivität sollten definierte Virusmengen in der PCR untersucht werden, um die zum Nachweis notwendige DNS-Menge zu bestimmen. Gleichzeitig sollte die standardisiert Anzucht in der Zellkultur mit der PCR verglichen werden.

7.4. SEROLOGISCHE METHODEN

7.4.1. ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Zwei indirekte ELISA-Testsysteme wurden mit Hilfe eines standardisierten Plaquereduktionstestes (modifiziert nach Fenner, 1953) hinsichtlich Sensitivität und Spezifität beurteilt. Die Plaquereduktion, welche als Goldstandard gilt und zu den international anerkannten Methoden gehört (OIE Manual, 2000), wurde als 100% angenommen. Zur Verifikation abweichender Resultate wurden stichprobenartig ausgewählte Proben zusätzlich mit einem Western Blot-Assay (Lämmli, 1970) getestet. Der nach Herstellerangaben durchgeführte ELISA 1 wies gegenüber der Plaquereduktion eine Sensitivität und Spezifität von 71% bzw. 81% auf. Die Interpretation der Ergebnisse mittels Berechnung eines relativen Indexes ergaben einen grenzwertigen Bereich. Resultate innerhalb dieses Bereiches wurden nicht in die Auswertung miteingeschlossen. Der selbst evaluierte ELISA 2 erzielte eine Sensitivität von 71% und eine Spezifität von 74%. In dieser Berechnung, welche auf den Resultaten uncharakterisierter Feldseren aufbaute, zeigte ELISA 2 eine um 7% niedrigere Spezifität als ELISA 1. Da es sich bei den verwendeten Seren um Probenmaterial von Kaninchen mit unbekanntem Gesundheitsstatus handelte, konnten Kreuzreaktionen mit Antikörpern anderer Herkunft nicht ausgeschlossen werden.

Beide Parameter wurden zusätzlich anhand spezifizierter Negativ- und Positivseren berechnet. ELISA 1 erreichte 89% bzw. 54%; ELISA 2 95% bzw. 88%. Der Plaquereduktionstest zeigte eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 100%. Das ELISA-Testsystem zeigte in den Untersuchungen von Gelfi und Mitarbeitern (1999) auch gegenüber der Immunfluoreszenz und der KBR eine höhere Sensitivität. In ELISA-Testsystemen werden die Gesamtimmunglobulingehalte in einem Serum gemessen. Dies erhöht die Sensitivität, kann aber aufgrund von Kreuzreaktionen die Spezifität deutlich senken. Der Plaquereduktionstest weist nur den Anteil der neutralisierenden Antikörper nach, was die Spezifität erhöht. Die niedrigere Sensitivität des Testes könnte durch eine zu geringe Menge messbarer Immunglobuline oder durch biologische

Schwankungen im Zellwachstum zustande gekommen sein. Zusätzlich könnten toxische Substanzen im Serum zu Störungen der Plaquebildung geführt haben.

In unseren Untersuchungen wurden zusätzlich Proben chlamydienimmunisierter SPF-Tiere mitgeführt, um die mögliche Beeinflussung der Resultate durch hohe Immunglobulingehalte anderen Ursprungs abzuklären. In beiden ELISA-Systemen reagierten die Seren positiv, was durch eine mögliche Bindung von Fremdkörpern an Restvalenzen (freie Bindungsstellen) auf der Mikrotiterplatte erklärt werden könnte (K.Hölzle, 2002, persönliche Mitteilung). Antikörper gegen Myxoma- oder Shope fibroma-Virus konnten in keinem von uns getesteten Nachweisverfahren voneinander differenziert werden. Woodroffe und Fenner stellten bereits 1964 eine hohe Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Myxoma-Subtypen und Shope fibroma-Virus fest. Zu diesem Zweck wurden in unseren Untersuchungen verschiedene Präabsorptionsmethoden zur Minimierung von Kreuzreaktionen angewandt. Beide Methoden zeigten keine signifikanten Unterschiede. Es besteht die Möglichkeit, dass zuwenige oder falsche Epitope zur Bindung zur Verfügung standen (L.Hölzle, 2002, persönliche Mitteilung). In der Literatur sind bisher keine Versuche bekannt, Shope fibroma-Virus in ELISA-Testsystemen von Myxoma-Virus zu differenzieren. Kerr untersuchte 1997 mögliche Kreuzreaktionen mit Vacciniavirus und erhielt negative Ergebnisse. Allerdings wurden in diesen Versuchen insgesamt nur zwei Tiere immunisiert. Es besteht daher die Möglichkeit, dass keine nachweisbaren Titer erreicht wurden.

Resultate sind mittels ELISA innert weniger Stunden erhältlich und benötigen nur kleine Volumina (5-10 μ l), der Plaquereduktionstest dauert zwischen 5 und 7 Tagen und setzt eine Labor-Infrastruktur voraus, um Zellkulturen permanent zur Verfügung zu stellen. Die Möglichkeiten beider Nachweisverfahren sind in der Routinediagnostik begrenzt. Der Plaquereduktionstest kann im Anfangsstadium der Krankheit aufgrund der niedrigen Sensitivität zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Die ELISA-Testsysteme sind durch die noch bestehenden Kreuzreaktionen für eine Einzeltierdiagnostik nicht geeignet. Die Spezifität könnte durch die Herstellung geeigneter monoklonaler Antikörper erhöht werden. Beide ELISA-Testsysteme eignen sich trotzdem zum Screening ganzer

Bestände, in denen Einzeltiere bereits klinische Symptome zeigen. In Betrieben mit Verdachtsfällen könnten noch gesunde Tiere besser abgegrenzt werden. Zusätzlich könnte die Ausbreitung von Seuchenzügen durch eine Kontrolle umliegender Betriebe besser abgeschätzt werden.

7.4.2. WESTERN BLOT-ASSAY

Der Western Blot-Assay nach Lämmler (1970) wurde eingesetzt, um die Proteinbandenmuster der verwendeten Positivkontrollseren zu vergleichen. Bei allen Proben konnten drei gemeinsame Proteinbanden identifiziert werden, wobei die Banden mit 32 und 26 kDa die grösste Immunkompetenz aufwiesen. Die Proteinbande mit einer Grösse von 13 kDa zeigte ebenfalls eine deutliche Reaktion, konnte aber bei dem getesteten Serum aus Riems (Deutschland) nur schwach identifiziert werden. Dies könnte auf einer verminderten Immunantwort des erkrankten Tieres oder auf einer Infektion mit einem anderen MV-Stamm beruhen. Letzteres ist allerdings weniger wahrscheinlich, da wir mit unseren molekularbiologischen Untersuchungen belegen konnten, dass es sich bei beiden Virusisolaten aus Deutschland um denselben Stamm handelt.

Die Seren aller vakzinierten Tiere wiesen eine Bande bei 8 kDa auf, welche bei den natürlich infizierten Tieren nicht nachgewiesen werden konnte. Es könnte sich um eine unspezifische Reaktion gegen Zellanteile handeln, die durch Kontamination in das Gemisch gelangten und bei der anschliessenden Aufreinigung nicht komplett entfernt wurden. Um diesen Unterschied als Marker für die Differenzierung von vakzinierten und natürlich infizierten Tieren einzusetzen, wären zusätzliche Untersuchungen einer grösseren Probenzahl notwendig. Die Differenzierung zwischen Seren homolog und heterolog immunisierter Tiere ist nicht möglich. Die untersuchten Proben wiesen fünf gemeinsame Banden auf, welche in der Stärke der Reaktion nur minimale Unterschiede zeigten.

Neben einem möglichen Einsatz als Marker zur Abgrenzung geimpfter Tiere könnte der Western Blot-Assay aufgrund seiner höheren Spezifität gegenüber den ELISA-

Testmethoden als zusätzliches Nachweisverfahren bei bereits gescreenten Tieren eingesetzt werden.

7.5. MÖGLICHKEITEN DER BEKÄMPFUNG

Während der letzten zehn Jahre sind die Seuchenzüge in der Schweiz deutlich zurückgegangen. Zwischen 1980 und 1987 traten jährlich 5 bis 50 Fälle auf. Seit 1988 wurden mit Ausnahme von 1999 nur noch sporadisch Ausbrüche registriert. Verantwortlich für die sinkenden Zahlen scheint der stetige Rückgang der Wildkaninchenpopulation in der Schweiz zu sein. Mit den geltenden Bestimmungen zur Bekämpfung der Myxomatose kann die Ausbreitung der Erkrankung kontrolliert werden.

Folgende Punkte sind für die Häufigkeit von Seuchenzügen verantwortlich:

- Im angrenzenden Ausland ist die Myxomatose in der Wildpopulation nach wie vor endemisch (Göhringer, persönliche Mitteilung, 2001; Office national de la chasse, Frankreich, 2001). Es findet eine sporadische Einwanderung von Tieren in die Schweiz statt.
- Es muss mit illegalem Import und Handel von Tieren aus dem Ausland gerechnet werden. Trotz herrschendem Impfverbot werden Kaninchen mit nicht zugelassenen Impfstoffen vakziniert.
- Mit der in den folgenden Jahren zunehmenden Aktivität von Insekten aufgrund der Klimaerwärmung (Wittmann et al., 2001) könnten Ausbrüche von Myxomatose ohne jahreszeitlichen Bezug zunehmen.

7.5.1. PROPHYLAXE DURCH IMPFUNG ?

Durch die Zulassung eines Myxomatose-Lebendimpfstoffes in der Schweiz könnten vor allem Tiere in grenznahen Gebieten aktiv vor einer Infektion geschützt werden. Impfstoffbedingte Nebenwirkungen wie Myxome an der Impfstelle und Fieber seien als

gering einzustufen, wenn die Tiere zum Impfzeitpunkt gesund sind (Holubek, 1999). Dem entgegen steht die Frage nach der Dauer der ausgebildeten Immunität, der möglichen Virusausscheidung geimpfter Tiere und den entstehenden Kosten für den Halter.

Die einzig relevante Methode, um die Effizienz und Sicherheit eines Impfstoffes zu beurteilen sind Belastungsinfektionen mit pathogenen Virus-Stämmen (Desmettre und Martinod, 1997). Anfragen bei Impfstoffherstellern in Europa ergaben, dass nach Belastungsinfektionen ausschliesslich das Auftreten lokaler oder generalisierter Myxome dokumentiert wurde. Die Ausscheidung von Virusmaterial in Körpersekreten wurde nicht überprüft. In Versuchen mit hochpathogenen nodulären und amyomatösen Virusstämmen wurde belegt, dass durch heterologe Immunisierung mit dem Shope fibroma-Virus ein relativ geringer Immunschutz von 30-40% (Fenner und Woodroffe, 1954; Jacotot et al., 1955; Barcena et al., 2000) und bei Verwendung eines attenuierten MV-Stammes eine Schutzwirkung von über 70% ausgebildet wird (Marlier et al., 2000). Die besten Ergebnisse brachte die Kombination homologer und heterologer Impfstoffe (Picavet et al., 1989, 1992; Bertagnoli et al., 1996). Die Ausscheidung von „Challenge“-Virus in Augen- und Nasensekreten, das bei 50% der vakzinierten Tiere isoliert werden konnte, reduzierte sich durch die kombinierte Anwendung um 40% (Marlier et al., 2000). Impfvirus konnte nicht nachgewiesen werden.

Da ca. 20% der vakzinierten Tiere durch Virusausscheidung Ansteckungsherde bleiben, wäre die Einführung einer Impfpflicht unerlässlich, um einen flächenhaften Schutz der Zucht- und Mastpopulationen in der Schweiz zu gewährleisten. Ausserdem ist nur die Anwendung homologer Impfstoffe oder eine kombinierte Impfung zu empfehlen. Die Diskussion um die Zulassung von Impfstoffen ist damit zusätzlich von einer Kosten-Nutzen-Analyse abhängig. Geschätzte jährliche Impfkosten von 30-40 Fr./Tier übersteigen die finanziellen Verluste - trotz geleisteter Entschädigungszahlungen (80%) bei Zuchttieren - deutlich.

7.5.2. EFFIZIENTERE BEKÄMPFUNG DURCH SEROLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Mit dem Einsatz eines Antikörper-ELISA's und des Western Blots stehen serologische Testmethoden zur Verfügung, die bei Verdachtsfällen eine rasche Diagnose ermöglichen. Auf diese Weise könnten nicht nur erkrankte Tiere, sondern auch klinisch unverdächtige Tiere des gleichen Bestandes untersucht werden. Zusätzlich wären stichprobenartige Kontrollen von Haltungen in der weiteren Umgebung möglich, um die Verbreitung eines Seuchenzuges genauer verfolgen zu können. Die Unterscheidung von geimpften und natürlich infizierten Tieren ist dabei nicht möglich. Die Anzeigepflicht mit der Anordnung der einfachen Sperre 1. Grades sollte bestehen bleiben. Die genannten serologischen Testmethoden und die PCR erlauben es aber, Ausbrüche in Betrieben differenzierter zu behandeln. Neben der Ausmerzungen eines Bestandes kann auch eine mehrwöchige Quarantäne mit entsprechenden Sicherheitsmassnahmen in Betracht gezogen werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- **Andrewes, C.H.; Muirhead-Thomson, R.C.; Stevenson, J.P. (1956):**
Laboratory studies of *Anopheles atroparvus* in relation to myxomatosis.
Journal of Hygiene 54, 478 – 486
- **Andrewes, C.H.; Thompson, H.V.; Mansi, W. (1959):**
Myxomatosis: present position and future prospects in Great Britain.
Nature 184, 1179 – 1180
- **Arthur, C.P.; Louzis, C. (1988):**
A review of myxomatosis among rabbits in France.
Revue scientifique technique des Office international des epizooties
7 (4), 959 - 976
- **Barcena, J.; Pagès-Manté, A.; March, R.; Morales, M.; Ramirez, M.A.; Sánchez-Vizcaino, J.M.; Torres, J.M. (2000) :**
Isolation of an attenuated myxoma virus field strain that can confer protection against myxomatosis on contacts of vaccinates.
Archives of Virology 145, 759-771
- **Baroudy, B.M.; Venkatesan, S.; Moss, B. (1982):**
Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotid chain.
Cell 28, 315-324
- **Barrett, J.W.; Cao, J.; Hota-Mitchell, S.; McFadden, G. (2001):**
Immunomodulatory proteins of myxoma virus.
Seminars in Immunology 13, 73-84
- **Bertagnoli, S.; Gelfi, J.; Le Gall, G.; Boilletot, E.; Vautherot, J.-F.; Rasschaert, D.; Laurent, S.; Petit, F.; Boucraut-Baralon, C.; Milon, A. (1996):**
Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein.
Journal of virology, 5061-5066
- **Best, S.M.; Collins, S.V.; Kerr, P.J. (2000):**
Coevolution of Host and Virus: Cellular Localization of Virus in Myxoma Virus Infection of Resistant and Susceptible European Rabbits.
Virology 277, 76-91
- **Best, S.M.; Kerr, P.J. (2000):**
Coevolution of Host and Virus: The Pathogenesis of Virulent and Attenuated Strains of Myxoma Virus in Resistant and Susceptible European Rabbits.
Virology 267, 36-48

- **Brun, A.; Saurat, P.; Gilbert, Y.; Godart, A.; bouquet, J.F. (1981):**
Données actuelles sur l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la myxomatose.
Revue de Médecine Vétérinaire 132, 585-590
- **Cabirac, G.F.; Strayer, D.S., Sell, S., Leibowitz, J.L. (1985):**
Characterization, molecular cloning and physical mapping of the Shope fibroma virus genome.
Virology 143, 663-670
- **Cameron, C.; Hota-Mitchell, S.; Chen, L.; Barrett, J.; Cao, J.; Macaulay, C.; Willer, D.; Evans, D.; McFadden, G. (1999):**
The Complete DNA Sequence of Myxoma Virus.
Virology 264, 298-318
- **Chantal, J.; Boucraut-Baralon, C.; Ganière, J.-P.; Petit, F.; Py, R.; Picavet, D.-P. (1993):**
Réaction de fixation du complément en plaques de microtitration: application à la sérologie de la myxomatose. Etude comparative des résultats avec la réaction d'immunofluorescence indirecte.
Revue scientifique technique des Offices internationales des epizooties 12, 895-907
- **Czerny, C.-P.; Mahnel, H. (1990):**
Structural and functional analysis of orthopoxvirus epitopes with neutralizing monoclonal antibodies.
Journal of Genetic Virology, 71, 2341 - 2352
- **Desmettre, P.; Martinod, S. (1997):**
Research and development.
In Veterinary Vaccinology (P.P. Pastoret, J. Blancou, P. Vannier and C. Verschueren, Eds.), Elsevier Science, Amsterdam, pp. 175-195
- **Epstein, M.A. (1958):**
Structural differentiation in the nucleoid of mature vaccinia virus.
Nature, 181, 784
- **Epstein, P.R. (2001):**
West Nile virus and the climate.
Journal of Urban Health 78, 367-371
- **Esposito, J.J., Knight, J.C. (1985):**
Orthopoxvirus DNA: A Comparison of Restriction Profiles and Maps.
Virology, 143, 230-251

- **Fenner, F.; Woodroffe, G.M. (1953):**
The pathogenesis of infectious myxomatosis: the mechanism of infection and the immunological response in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).
British Journal of Experimental Pathology 34, 400-410
- **Fenner, F.; Marshall, I.D.; Woodroffe, G.M. (1953):**
Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits: 1. Recovery of Australian wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from myxomatosis under field conditions.
Journal of Hygiene (Cambridge) 51, 225-244
- **Fenner, F.; Woodroffe, G.M. (1954):**
Protection of laboratory rabbits against myxomatosis by vaccination with fibroma virus.
Australian Journal of Experimental Biological Medical Science 32, 653
- **Fenner, F.; Ross, J. (1994):**
„Myxomatosis“ in „The European rabbit, The history and biology of a successful colonizer.“
edited by Harry V. Thompson and Carolyn m. King, Oxford Science Publications
- **Fountain, S.; Holland, M.K.; Hinds, L.A.; Janssens, P.A.; Kerr, P.J. (1997):**
Interstitial orchitis with impaired steroidogenesis and spermatogenesis in the testes of rabbits infected with an attenuated strain of myxoma virus.
Journal of reproductive fertility 110, 161-169
- **Francki, R.I.B.; Fauquet, L.M., Knudson, D.L., Brown, F. (1991):**
Classification and nomenclature of viruses.
Archives of Virology, Supplementum 2
- **Garon, C.F., Barbosa, E., Moss, B. (1978):**
Visualization of an inverted terminal repetition in vaccinia virus DNA.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 75, 4863-4867
- **Gelfi, J.; Chantal, J.; Thanh Phong, T.; Py, R.; Boucraut-Baralon, C. (1999):**
Development of an ELISA for detection of myxoma virus-specific rabbit antibodies: test evaluation for diagnostic applications on vaccinated and wild rabbit sera.
J. Vet. Diagn. Invest. 11, 240-245
- **Goebel, S.J., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P., Paoletti, E. (1990):**
The complete DNA sequence of vaccinia virus.
Virology 179, 247-266

- **Graham, K.A.; Ogenorth, A.; Upton, C.; McFadden, G. (1992):**
Myxoma virus M11L ORF encodes a protein for which cell surface localization is critical in manifestation of viral virulence.
Virology 191, 112-124
- **Guerin, J.-L.; Gelfi, J.; Camus, C.; Delverdier, M.; Whisstock, J.C.; Amardeihl, M.-F.; Py, R.; Bertagnoli, S.; Messud-Petit, F. (2001):**
Characterization and functional analysis of Serp3: a novel myxoma virus-encoded serpin involved in virulence.
Journal of General Virology 82, 1407 – 1417
- **Hattori, M.; Sakaky, Y. (1986):**
Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates.
Analytical Biochemistry 152, 232-238
- **Higuchi, R. (1989):**
Rapid, efficient extraction for PCR from cells or blood.
Amplifications (Perkin-Elmer Cetus Newsletter) 2, 1-3
- **Hobbs, J.R. (1928):**
Studies of the nature of infectious myxoma of rabbits.
American Journal of Hygiene 8, 800-839
- **Holubek, R. (1999):**
Impfreport 1998: Umfang und Effektivität von Schutzimpfungen gegen Myxomatose, RHD und Kaninchenschnupfen.
Sonderdruck aus der Zeitschrift „Kaninchen“ Nr. 3, 1999, Deutscher Bauernverlag, Berlin
- **Hurst, E.W. (1937):**
Myxoma and the Shope fibroma. I. The histology of myxoma.
British Journal of Experimental Pathology 18, 1-15
- **Jacotot, H.; Vallée, A.; Virat, B. (1955) :**
Considérations sur la durée et le mécanisme de l'immunité engendrée par le virus du fibrome de Shope contre le virus du myxoma de Sanarelli.
Annuel Institut de Pasteur 88, 381
- **Joklik, W.K. (1962):**
Purification of four strains of poxviruses.
Virology 18, 9 -18
- **Joubert, L.; Duclos, P.H.; Tuailon, P. (1982):**
La myxomatose des garennes dans le Sud-Est: la myxomatose amyxomateuse.
Revue de Médecine Vétérinaire 133, 739-753

- **Kaaden, O.-R. (2002):**
Erkrankungen durch Leporipoxviren.
In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage, Mayr A. (Ed.), Enke Verlag, Stuttgart, 167-169

Kaninchen nach künstlicher Infektion.
Archiv der Experimentellen Veterinärmedizin 8, 675
- **Kerr, P.J. (1997):**
An ELISA for epidemiological studies of myxomatosis: persistence of antibodies to myxoma virus in european rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).
Wildlife Research 24, 53-65
- **Knorr, F. (1978):**
Kaninchenkrankheiten, 4. Auflage, Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin
- **Kötsche, W. (1954):**
Beitrag zur pathologischen Anatomie und Histologie der Myxomatose des Kaninchens nach künstlicher Infektion.
Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin, Band 8, H.6
- **Kötsche, W.; Gottschalk, C. (1990):**
Krankheiten der Kaninchen und Hasen. Tierärztliche Praxis, 4. Auflage, Verlag Gustav Fischer, Jena
- **LaColla, P., Weissbach, A. (1975):**
Vaccinia virus infection of HeLa cells. I. Synthesis of vaccinia DNA in host cell nuclei.
Journal of Virology 15, 305-315
- **Laemmli, U.K. (1970):**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685
- **Lomas, D.A.; Evans, D.L.; Upton, C.; McFadden, G.; Carrell, R.W. (1993):**
Inhibition of plasmin, urokinase, tissue plasminogen activator, and C1S by a myxoma virus serine proteinase inhibitor.
Journal of Biological Chemistry 268, 516 – 521
- **Lorenz, J. (1990):**
Krankheitsüberwachung in Tierbeständen. Ein Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen.
Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (AID) e. V. (Ed.), D-5300 Bonn 2

- **Lowry, O.N.; Rosebrough, N.J., Farr, L. Randall, R.J. (1951):**
Protein measurement with the folin phenol reagent.
Journal of Biological Chemistry 193, 265 - 278
- **Macen, J.L.; Graham, K.A.; Lee, S.F.; Schreiber, M.; Boshkov, L.K.; McFadden, G. (1996):**
Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T- lymphocytes.
Virology 1, 232-237
- **Macen, J.L.; Upton, C.; Nation, N.; McFadden, G. (1993):**
Serp 1, a serine proteinase inhibitor encoded by myxoma virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation.
Virology 195, 348-363
- **Marlier, D.; Cassart, D.; Boucraut- Baralon, C.; Coignoul, F.; Vindevogel, H. (1999):**
Experimental Infection of Specific Pathogen-free New Zealand White Rabbits with Five Strains of Amyxomatous Myxoma Virus.
Journal of Comparative Pathology 121, 369-384
- **Marlier, D.; Mainil, J.; Boucraut-Baralon, C.; Linden, A.; Vindevogel, H. (2000):**
The efficacy of two vaccination schemes against experimental infection with a virulent amyxomatous or a virulent nodular myxoma virus strain.
Journal of comparative pathology 122, 115-122
- **Marlier, D.; Mainil, J.; Linden, A.; Vindevogel, H. (2000a):**
Infectious Agents Associated with Rabbit Pneumonia: Isolation of Amyxomatous Myxoma Virus Strains.
Veterinary Journal 159, 171-178
- **Marlier, D.; Mainil, J.; Sulon, J.; Beckers, J.F.; Linden, A.; Vindevogel, H. (2000b):**
Study of the Virulence of Five Strains of Amyxomatous Myxoma Virus in Crossbred New Zealand White/Californian Conventional Rabbits, with Evidence of Long-term Testicular Infection in Recovered Animals.
Journal of Comparative Pathology 122, 101-113
- **Marlier, D.; Vindevogel, H. (1996):**
La myxomatose amyxomateuse: isolement de trois souches en Belgique.
Annales de Médecine Vétérinaire 140, 343-346

- **Martinez-Pomares, L., Stern, R.J., Moyer, R.W. (1993):**
The ps/hr Gene (B5R Open Reading Frame Homolog) of Rabbitpox Virus Controls Pock Color, is a Component of Extracellular Enveloped Virus, and is Secreted into the Medium.
Journal of Virology, 67, 5450-5462
- **Mayr, A.; Bachmann, P.A.; Bibrack, B.; Wittmann, G. (1977):**
Virologische Arbeitsmethoden Band II: Serologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- **McFadden, G.; Graham, K. (1994):**
Modulation of cytokine networks by poxvirus: the myxoma virus model.
Seminars in Virology 5, 421-429
- **McFadden, G.; Graham, K.; Ellison, K.; Barry, M.; Macen, J.; Schreiber, M.; Mossman, K.; Nash, P.; Lalani, A.; Everett, H. (1995):**
Interruption of cytokine networks by poxviruses: lessons from myxoma virus.
Journal of Leukocyte Biology 57, 731-738
- **Mead-Briggs, A.R.; Vaughan, J.A. (1975):**
The differential transmissibility of myxoma virus strains of differing virulence grades by the rabbit flea *Spilophyllus cuniculi* (Dale).
Journal of Hygiene, Cambridge 75, 237
- **Messud-Petit, F.; Gelfi, J.; Delverdier, M.; Amardeilh, M.-F.; Py, R.; Sutter, G.; Bertagnoli, S. (1998):**
Serp2, an Inhibitor of the Interleukin-1 β -Converting Enzyme, is critical in the Pathobiology of Myxoma Virus.
Journal of Virology 72, 7830 - 7839
- **Michigan Wildlife Diseases Manual: Rabbit Fibromatosis (2000):**
http://www.dnr.state.mi.us/Wildlilfe/Divison/RoseLake/Publications/Disease_Manual/rabfibro.html
- **Mims, C. (1964):**
Aspects of the pathogenesis of viral diseases.
Bacteriological Review 28, 30-71
- **Minnegan, H., Moyer, R.W. (1985):**
Intracellular location of rabbit poxvirus nucleic acid within infected cells as determined by in situ hybridization.
Journal of Virology 55, 634-643
- **Moss, B. (1996):**
Poxviridae: The viruses and their replication.
In: Fundamental Virology; B.N. Fields et al. (Eds.), 3th Edition,
Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1163-1197

- **Moss, B. (1990):**
Regulation of Vaccinia Virus Transcription.
Annual Review of Biochemistry 59, 661-688
- **Muirhead-Thomson, R.C. (1956):**
The part played by woodland mosquitoes of the genus Aedes in the transmission of myxomatosis in England.
Journal of Hygiene 54, 461 – 471
- **Müller-Using (1953):**
Gedanken zum Auftreten der Myxomatose in Deutschland.
Tierärztliche Umschau 8, 398-400
- **Nash, P.; Barrett, J.; Cao, J.X.; Hota-Mitchell, S.; Lalani, A.S.; Everett, H.; Xu, X.M.; Robichaud, J.; Hnatiuk, S.; Ainslie, C.; Seet, B.T.; McFadden, G. (1999):**
Immunomodulation by viruses: the myxoma virus story.
Immunology Review 168, 103-120
- **OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines (2000):**
Myxomatosis.
OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE Standards Commission (Ed.), 4th Edition, 748-751
- **Opgenorth, A.; Graham, K.; Nation, N.; Strayer, D.; McFadden, G. (1992):**
Deletion analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, M11L and myxoma growth factor.
Journal of Virology 66, 4720 – 4731
- **Padgett, B.L.; Moore, M.S., Walker, D.L. (1962):**
Plaque assays for myxoma and fibroma viruses and differentiation of the viruses by plaque form.
Virology 17, 462
- **Paez, E.; Dallo, S.; Esteban, M. (1987):**
Virus Attenuation and Identification of Structural Proteins of Vaccinia Virus that are Selectively Modified during Virus Persistence.
Journal of Virology, 61, 2642, 2647
- **Parer, I.; Sobey, W.R.; Conolly, D.; Morton, R. (1995):**
Sire Transmission of Acquired Resistance to Myxomatosis.
Australian Journal of Zoology 43, 459 – 465

- **Payne, L.G.; Kristensson, K. (1985):**
Extracellular Release of Enveloped Vaccinia Virus from Mouse Nasal Epithelial Cells in vivo.
Journal of Genetic Virology 66, 643-646
- **Pennington, T.H.; Follett, E.A. (1974):**
Vaccinia virus replication in enucleated BSC-1 cells: particle production and synthesis of viral DNA and proteins.
Journal of Virology 13, 488-493
- **Petit, F.; Bertagnoli, S.; Gelf, J.; Fassy, F.; Boucraut-Baralon, C.; Milon, A. (1996):**
Characterization of a Myxoma Virus-Encoded Serpin-Like Protein with Activity against Interleukin-1 β -Converting Enzyme.
Journal of Virology 70, 5860 – 5866
- **Picavet, D.P.; Lebas, F.; Gilbert, Y.; Brignol, E. (1989):**
Immunisation du lapereau contre la myxomatose à l'aide d'un vaccin homologue.
Revue médecine vétérinaire 140, 823-827
- **Picavet, D.P.; Lebas, F.; Gilbert, Y.; Chantal, J.; Py, R.; Peulet, M.J.; Brignol, E. (1992):**
Essais d'immunisation du lapereau de chair contre la myxomatose à l'aide d'un vaccin homologue atténué.
Revue médecine vétérinaire 143, 267-271
- **Pickup, D.J., Ink, B.S., Hu, W., Ray, C.A., Joklik, W.K. (1986):**
Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases.
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 83, 7698-7702
- **Pickup, D.J.; Bastia, D.; Stone, H.O.; Joklik, W.K. (1982):**
Sequence of terminal regions of cowpox virus DNA: arrangement of repeated and unique sequence elements.
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 79, 7112-7116
- **Prescott, D.M.; Kates, J.; Kirkpatrick, J.B. (1971):**
Replication of vaccinia virus DNA in enucleated 1-cells.
Journal of Molecular Biology 59, 505-508
- **Puech, M. (1980):**
Contribution aux recherches de cartographie épidémiologique: étude écologique des populations de Culicidés adultes en rapport avec la myxomatose dans la Région Rhône-Alpes.
Thèse 3^e cycle, Université de Grenoble, 210

- **Rieck, W. (1953):**
Die infektiöse Myxomatose der Kaninchen.
Berliner Münchner Tierärztliche Wochenschrift 66, 365-368
- **Rosell, J.M.; Gonzales, J.L.; Rueda, A.; Gallego, E.; Flores, J.M. (1984):**
Mixomatosis atípica en España.
Medicina Veterinaria 1, 401-412
- **Rothschild, M. (1953):**
Notes on the European rabbit flea.
Report to the Myxomatosis Advisory Committee, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, United Kingdom
- **Russell, R.J.; Robbins, S.J. (1989):**
Cloning and molecular characterization of the myxoma virus genome.
Virology 170, 147-159
- **Schoop, G. (1954):**
Die Myxomatose der Kaninchen.
Monatshefte Tierheilkunde 6, 53-57
- **Schulte, F.; Scholz, H.D. (1954):**
Über die Myxomatose der Kaninchen.
Monatshefte Tierheilkunde 6, 98-108
- **Schultze-Petzold, H. (1953):**
Die Myxomatose des Kaninchens.
Tierärztliche Umschau 8, 425-427
- **Schulz, O.; Völker, H. (1962):**
Zu Verlauf und Erscheinungsformen der Myxomatose.
Monatshefte für Veterinärmedizin, 11, 441-445
- **Service, M.W. (1971):**
A reappraisal of the role of mosquitoes in the transmission of myxomatosis.
Journal of Hygiene 69, 105 – 111
- **Sobey, W.R.; Conolly, D. (1986):**
Myxomatosis: Non-Genetic Aspects of Resistance to Myxomatosis in Rabbits, *Oryctolagus cuniculus*.
Australian Wildlife Research 13, 177 – 187
- **Sobey, W.R.; Conolly, D.; Adams, K.M. (1966):**
Myxomatosis. A simple method of symling blood and testing for circulating soluble antigens or antibodies to them.
Australian Journal of Science 28, 354-355

- **Syvanen, A.C.; Bengtstrom, M.; Tenhunen, J.; Soderlund, H. (1988):**
Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection.
Nucleic Acids Research 16, 11327-11338
- **Upton, C., DeLange, A.M., McFadden, G. (1987):**
Tumorigenic poxviruses: Genomic organization and DNA sequence of the telomeric region of the Shope fibroma virus genome.
Virology 160, 20-30
- **Upton, C.; Machen, J.L.; Wishart, D.S.; McFadden, G. (1990):**
Myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus encode a serpin-like protein important for virus virulence.
Virology 179, 618 – 631
- **Upton, C.; Mossman, K.; McFadden, G. (1992):**
Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus.
Science 20; 258, 1369-1372
- **von Sandersleben, J.; Dämmrich, K.; Dahme, E. (1989):**
Pathologische Histologie der Haustiere.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- **Werffeli, F. (1967):**
Observations on the appearance of a clinically atypical manifestation of myxomatosis in wild and domestic rabbits.
Schweizerisches Archiv für Tierheilkunde 109, 9 -16
- **Wetherall, J.D.; Clay, D.E.; King, D.R. (1983):**
Humoral immunity to myxoma virus in wild rabbits.
Australian Wildlife Research 10, 277-285
- **Willer, D.O.; McFadden, G.; Evans, D.H. (1999):**
The complete genome sequence of Shope (rabbit) fibroma virus.
Virology 264, 319-343
- **Williams, C.K., Moore, R.J. (1991):**
Inheritance of acquired immunity to myxomatosis.
Australian Journal of Zoology 39, 307 – 311
- **Williams, R.T.; Dunsmore, J.D.; Parer, I. (1972):**
Evidence for the existence of latent Myxoma Virus in Rabbits (*Oryctolagus cuniculi*).
Nature 238, 99-101

- **Wittek, R. (1982):**
Organization and expression of the poxvirus genome.
Experientia 38, 285-297
- **Wittmann, E.J.; Mellor, PS; Baylis, M. (2001):**
Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola*
(Diptera: Ceratopogonidae) in Europe.
Review of Science Technique 20, 731-740
- **Woodroffe, G.M.; Fenner, F. (1964):**
Viruses of the myxoma-fibroma subgroup of the poxviruses.
1. Plaque production in cultured cells, plaquereduction tests, and
crossprotection tests in rabbits.
Australian Journal of experimental Biology and medical Science 43, 123-142

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- A Adenin
- ABTS 2,2'-Azino-di (3-ethylbenzthiazolin) Sulfonsäure-6
- AGP Agargelpräzipitation
- BFAV Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten (Riems, Deutschland)
- BKZV Badischer Kaninchenzüchterverband (Deutschland)
- bp Basenpaar
- BUWAL Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (Bern)
- C Cytosin
- CAM Chorioallantoismembran
- CPE Cytopathogener Effekt
- DNS Desoxyribonukleinsäure
- EEV extracellular enveloped virus
- EEV extracellular enveloped virus
- EGF epidermal growth factor
- ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay
- EM Elektronenmikroskop
- EMEM Eagle's Minimum Essential Medium
- FKS Fetales Kälberserum
- G Guanin
- h Stunde
- HRPO Horseradish peroxidase
- ID Infektiöse Dosis
- IEV intracellular enveloped virus
- IEV intracellular enveloped virus
- IF Immunfluoreszenz
- IP Immunperoxidase
- ITR inverted terminal repeats
- IVI Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe in Mittelhäusern (Schweiz)

- IVPZ Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich
- kb Kilobase
- kbp Kilobasenpaar
- KBR Komplementbindungsreaktion
- kDa Kilodalton
- KID Kulturinfektiöse Dosis
- LTK Institut für Labortierkunde der Universität Zürich
- m milli
- min Minute
- MV Myxoma-Virus
- nm Nanometer
- NRGK Nationales Referenzzentrum für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten der Universität Zürich
- OD Optische Dichte
- ORF open reading frame
- p.i. post infectionem
- pfu plaque forming units
- PN Plaqueneutralisation (Plaquereduktionstest)
- RT Raumtemperatur
- SFV Shope fibroma-Virus
- T Tyrosin
- TEMED N,N,N,N'-Tetra-methylethylendiamin
- TGD Tiergesundheitsdienst (Bayern, Deutschland)
- TSV Tierseuchenverordnung
- U/min Umdrehungen pro Minute
- v/v Volumeneinheit pro Volumeneinheit
- w/v Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
- w/w Gewichtseinheit pro Gewichtseinheit

10. VERDANKUNGEN

Allen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Besonderer Dank gilt:

PD Dr. Richard Hoop für die Überlassung des Themas und die Überarbeitung des Manuskripts.

PD Dr. Monika Engels für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Barbara Litzenberger für die Durchsicht des Manuskripts.

Dr. Katharina Hölzle, Dr. Ludwig E. Hölzle, Prof. Max. M. Wittenbrink und Dr. Louis Corboz für die fachliche Beratung.

Dr. Cordia Wunderwald für die geleistete Vorarbeit zu diesem Projekt.

Dr. Christine Sudler für allzeit computertechnischen und psychologischen Rat.

Dr. Peter Gurdan und Dr. Regula Vogel, Prof. Dr. Dr. Claus-Peter Czerny

Priska Affolter für die fachliche Unterstützung bei den serologischen Untersuchungen.

Michaela Alex für die ersten Schritte in der Zellkulturtechnik.

Margrit Kreienbühl, Vreni Mrosek, Bea Zimmermann, Roswitha Keller

Lukas Baumann für die Mithilfe bei den praktischen Arbeiten.

Claudio Zweifel für die gemeinsame Diskussion zum Thema Statistik.

Elisabeth Schraner für die Untersuchungen im EM.

Pete Ossent für die prompte Hilfe in Sachen Englisch.

11. LEBENS LAUF

Name	Corinne Rutz
Geburtsdatum	28. September 1970
Geburtsort	Zürich
Nationalität	CH
Heimatort	Krummenau / SG
1977 - 1983	Primarschule Adliswil / ZH
1983 - 1986	Sekundarschule Adliswil / ZH
1986 - 1987	10. Schuljahr in Zürich
1987 - 1990	Lehre als Fotofachangestellte in Zürich
1990 - 1991	Anstellung als Fotofachangestellte in Zürich
1991 - 1994	Kantonale Maturitätsschule für Erwachsene
1994	Mittelschulabschluss, Maturität Typ B
1994 - 2000	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich
2000	Staatsexamen an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich
2000 - 2003	Dissertation am Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich
8.7.2003	

