

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialnachweis

Firma, Firmensitz; Vertrieb	Material
Biochrom, Berlin	Biocoll®
Bio-Rad, München	Ethidium Bromide Solution
	Standard Proteinmischung
Calbiochem, La Jolla, USA	Tween 20
Difco, MI, USA	Trypsin
Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, USA; Dianova, Hamburg	Ziege anti-Maus IgG (Fc)
	Ziege anti-Pferd IgG (Fc) alkalische Phosphatase markiert
	Ziege anti-Kaninchen IgG (Fc) alkalische Phosphatase markiert
Life Technologies (Gibco BRL), Gaithersburg, USA	TRIzol
	M-MLV Reverse Transkriptase
	RT-Puffer, Längenstandard $\Phi$ X174 RF DNA/Hae III Fragments
	Agarose Ultra Pure
MBI Fermentas, Vilnius, Litauen	dNTP Mix
Nunc, Wiesbaden	Maxisorp F8 Platten, 96-Loch Mikrotiterplatte (ELISA-Platte)
Perkin Elmer, Branchburg, USA	AmpliTaq® DNA Polymerase
	GenAmp® PCR Puffer
	BigDye® Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kit
Promega, Madison, USA	RNasin
	nucleasefreies Wasser
Qiagen, Hilden	QIA quick PCR Purification Kits
Roth, Karlsruhe	Primer
Sigma, Deisenhofen/St. Louis, MO, USA	Substrat p-Nitrophenylphosphat
	3-Amino 9-Ethylcarbazole
	Polaroidfilm (Black and White Print Film Type 667)

Projektgruppe Bornavirus-Infektion (PD Dr. Liv Bode), Robert Koch-Institut, Berlin	Gehirnmaterial und Blutproben BDV-positiver Pferde
	BDV-spezifische positive und negative Referenzseren (Pferd, Kaninchen)
Institut für Virologie (Prof. Dr. Hanns Ludwig), FU-Berlin	Monoklonale Antikörper gegen BDV-spezifische Proteine (KFu-2; W1H8)
	BDV-positive polyvalente und monospezifische Kaninchenserren
	BDV-positive Pferdeseren

Tabelle 4.1-1

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von der Firma Merck (Darmstadt) und der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

#### 4.2 Antigen, Antikörper und Kontrollen

Seit Jahren wird das von einem Pferd stammende und an Kaninchenhirn adaptierte Wildvirus als Laborstamm V (Zwick et al. 1927) im Institut für Virologie der Freien Universität Berlin für BDV-Untersuchungen als Referenzstamm genutzt. KFu-2, gegen das BDV-24 kDa Protein gerichtet und W1H8, gegen das BDV-38/40 kDa Protein gerichtet, dienen in den Tests als monoklonale Antikörper. Zur laborinternen Positiv-Kontrolle dienen Gehirnproben der Pferde „Schimmel“ und „Treptow“. Dies sind Tiere, die an der klassischen Bornaschen Krankheit erkrankt waren und zur Diagnosestellung über Antigen und PCR in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Liv Bode (RKI) bearbeitet wurden.

#### 4.3 Herkunft des Probenmaterials

Im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Virologie der FU-Berlin unter Leitung H. Ludwig und der Arbeitsgruppe L. Bode erhalten das RKI oder die FU-Berlin Blut- und Gewebeprobe von Pferden zur Überprüfung auf BDV-spezifische Marker zugesandt. Zur Einsendung kommen Citratblutproben, aber auch z. B. EDTA-Blutproben, Serum, Gehirnmaterial und andere Organmaterialien wie Niere, Auge etc.

Im Zuge dieses diagnostischen Forschungsprojektes wurden ab 2000 bis ins Jahr 2004 Pferdeproben in die Auswertung mit einbezogen. Das Untersuchungsmaterial stammt in unterschiedlichem Probenumfang aus den verschiedensten Bundesländern (siehe Abb. 5.1-1 und Tab. 5.1-4) der Bundesrepublik Deutschland, eingeschickt von

Landesuntersuchungsämtern, Pferdekliniken, Tierarztpraxen, Tierheilpraktikern und vereinzelt auch Pferdebesitzern.

### 4.3.1 ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay)

Alle folgend beschriebenen EIA<sup>53</sup>-Tests sind detailliert beschrieben (Bode et al. 2001).

#### 4.3.1.1 Lösungen und Reagenzien für ELISA

Bindungspuffer (0,1 M Natriumphosphat / 0,25 M NaCl pH 7,6) zur Bindung der IgG an die Mikrotiterplatte;

Stammlösungen für Bindungspuffer:

- A 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (MG = 138,0; primäres Na-Phosphat)  
= 2,76 g ad 1000 ml Aqua bidest.
- B 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (MG = 178,05; sekundäres Na-Phosphat)  
= 3,561 g ad 1000 ml Aqua bidest.

Puffergebrauchslösung (pH 7,6):

Lösung A	65 ml
Lösung B	435 ml
NaCl	14,6 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Waschpuffer (0,9% NaCl + 0,05% Tween 20 + 0,02% Na-Azid):

NaCl	45,0 g
Tween 20	2,5 g (ml)
Na-Azid	1,0 g
Aqua bidest.	ad 5000 ml

Verdünnungspuffer (PBS-Tween pH 7,2) für Maus monoklonale AK, AG, Seren:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	2,9 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 g (ml)
Na-Azid	0,2 g

---

<sup>53</sup> Enzyme Immuno Assay anderer Ausdruck für ELISA

Aqua bidest.                      ad 1000 ml

Konjugatverdünnungspuffer (TBS-Tween pH 7,2):

Tris                                      2,4 g

NaCl                                    8,0 g

KCl                                      0,2 g

Tween 20                            0,5 g

mit 900 ml Aqua bidest. lösen

mit HCl Konzentration auf pH 8,0 einstellen

Aqua bidest.                      ad 1000 ml

Substratverdünnungspuffer (Diäthanolaminpuffer pH 9,8; für p-NPP):

Diäthanolamin bei 37°C im Wasserbad schmelzen

MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O                      0,1 g

Na-Azid (NaN<sub>3</sub>)                    0,2 g

in 843 ml Aqua bidest. lösen

97 ml Diäthanolamin langsam zugeben (Rührer)

60 ml 1NHCl zugeben

pH 9,8 kontrollieren, ggf. mit HCl korrigieren (Lagerung bei 4°C)

Stopplösung (3 N NaOH):

NaOH Plättchen                    120g

Aqua bidest.                      ad 1000 ml

Beschichtung der ELISA-Platten:

Ziege anti-Maus IgG (Fc – Fragment spezifisch gegen murine Serumproteine)

Konjugat:

Ziege anti-Pferd IgG (Fc)-alkalische Phosphatase

Substrat in Tablettenform a 5 mg:

para – Nitrophenylphosphat (p-NPP)

#### 4.3.1.2 Zum Immunkomplexnachweis

Zum Nachweis von spezifischen BDV-Immunkomplexen wurden sowohl Blut- als auch Liquorproben verwendet und im Double-Sandwich ELISA getestet.

#### 4.3.1.2.1 Methodische Vorgehensweise beim CIC-ELISA

Schritt 1: 10 µl Ziege-anti-Maus IgG (Fc) wurden in 10 ml Bindungspuffer (=1:1000) verdünnt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit 100 µl dieser Verdünnung pro Kavität beschickt, wobei Reihe 1 für Blank und Kontrollen dient. Kavernen A1 und B1 blieben leer. Nun wurde die ELISA-Platte bei 37 °C für eine Stunde oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 Zyklen Waschen mit Waschpuffer (Ultrawash Plus Dynatech; 96er Waschkopf) durchgeführt.

Schritt 2: Danach wurde eine Verdünnung von 1:500 mit 20 µl spezifischen monoklonalen Maus anti-BDVp40 Antikörpern und mit 20 µl spezifischen monoklonalen Maus anti-BDVp24 Antikörpern mit PBS-Tween hergestellt.

Davon wurden je 100 µl pro Kavität pipettiert und entweder 1 Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Diese o. g. Arbeitsschritte konnten bis mindestens zwei Wochen im Voraus geleistet werden. Die so hergestellten, beschichteten ELISA-Platten wurden bei 4 °C bevorratet.

Im weiteren Verfahren wurden die Testplatten 3 Waschzyklen mit Waschpuffer unterzogen (96er Waschkopf).

Die nachfolgenden Schritte unterscheiden sich von denen bei den BDV-AG- und BDV-AK-Tests.

Schritt 3: Eine geometrische Verdünnungsreihe der zu testenden Pferdeproben wurde mit Probenverdünnungspuffer (PBS-Tween) ab einer Verdünnung von 1:20 bis zu 1:160 hergestellt. Dies geschah, indem auf die ELISA-Platte je 100 µl Verdünnungspuffer pro Kavität pipettiert wurde. In Reihen A2 bis A12 und in Reihen E2 bis E12 wurden weitere 90 µl gegeben. Pro Testprobe wurden ferner 10 µl in Reihen A2 bis A12 und in Reihen E2 bis E12 gegeben, folglich entstand eine Verdünnung von 1:20. Anschließend wurden daraus je 100 µl in die nächsten 3 Reihen (B, C, D bzw. F, G, H) übertragen (=Verdünnung von 1:40; 1:80 und 1:160 für jede Probe), wobei aus den beiden letzten Kavitätenreihen D und H je 100 µl verworfen wurden. Mit der Positiv- und Negativkontrolle wurde nach gleichem Schema in Reihe C1 bis H1 verfahren. Dabei handelte es sich bei der Positivkontrolle um eine Plasmaprobe des Pferdes „F.“, das eine asymptomatische BDV-Infektion gezeigt hat. Als Negativkontrolle diente PBS-Tween. Die so bereiteten Platten wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Nun wurden 3 Waschzyklen mit Waschpuffer (96er Waschkopf) durchgeführt.

Schritt 4: Im Anschluss wurden 4 µl mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiertem Ziege anti-Pferd IgG (Fc – fragmentspezifisch) in 12 ml TBS-Tween verdünnt und somit eine Verdünnung von 1:3000 hergestellt. Je 100 µl dieser Verdünnung wurde nun in jede Kavität der ELISA-Platte pipettiert und anschließend genau 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgten erneut 3 Waschzyklen mit Waschpuffer (96er Waschkopf).

Schritt 5: Nun wurden 2 Substrattabletten a 5 mg para-Nitrophenylphosphat in 10 ml Substratpuffer aufgelöst, so dass eine Substratgebrauchslösung von 1 mg p-NPP/ ml entstand. Davon wurden nun je 100 µl in jede Kavität der ELISA-Platte pipettiert, bei Raumtemperatur 5 min inkubiert.

Schritt 6: Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von je 50 µl Stoplösung in jede Kavität der ELISA-Platte, also auch in diejenige der ersten Reihe, gestoppt.

Schritt 7 aller drei ELISAs ist identisch: Die Extinktionswerte wurden bei 405 nm mittels Multikanal-Photometer (von Bio Rad oder Dynatech Laboratories) gegen einen Leerwert (Substrat- und Stoplösung) gemessen. Folgende Grenzwerte der Optischen Dichte (OD; Extinktion) wurden als Maßstab genommen:

$+\infty \geq +++++ \geq 1,0000 > +++ \geq 0,6000 > ++ \geq 0,3000 > + \geq 0,1500 > (+) \geq 0,1200 > ???$   
(fraglich)  $\geq 0,1000 > \text{negativ} \geq -\infty$ .

Ab einer OD von  $\geq 0,1200$  und einer deutlichen Abnahme der Verdünnungsreihe auf der ELISA-Platte wurde die Probe als positiv beurteilt.

#### **4.3.1.3 Zum Antigennachweis**

Zum Nachweis von spezifischem BDV-AG wurden sowohl Blut- wie auch Organproben (Gehirn, Auge) verwendet und mit einem Double-Sandwich ELISA getestet.

##### **4.3.1.3.1 Methodische Vorgehensweise beim pAG-ELISA**

BDV-spezifisches Plasma Antigen wurde mit folgender Methode detektiert:

Schritt 1 und 2 wurden genau so wie beim BDV-spezifischen Immunkomplex-ELISA durchgeführt.

Im weiteren Verfahren wurden die Testplatten 3 Waschzyklen mit Waschpuffer unterzogen (96er Waschkopf).

Schritt 3: Eine geometrische Verdünnungsreihe der zu testenden Pferdeproben wurde mit Probenverdünnungspuffer (PBS-Tween) ab einer Verdünnung von 1:2 bis zu 1:16 hergestellt. Dies geschah, indem zuerst auf die ELISA-Platte je 100 µl Verdünnungspuffer pro Kavität pipettiert und pro Testprobe 100 µl in Reihe A2 bis A12 und in Reihe E2 bis E12 gegeben wurden (=Verdünnung von 1:2). Anschließend wurden daraus je 100 µl in die nächsten 3 Reihen (B, C, D bzw. F, G, H) übertragen (=Verdünnung von 1:4; 1:8 und 1:16 für jede Probe), wobei aus den beiden letzten Kavitätenreihen D und H je 100 µl verworfen wurden. Mit der Positiv- und Negativkontrolle wurde nach gleichem Schema in Reihe C1 bis H1 verfahren. Positiv- und Negativkontrollen sind mit denen der CIC-ELISA identisch. Die so bereiteten Platten wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Nun wurden 3 Waschzyklen mit Waschpuffer (96er Waschkopf) durchgeführt.

Schritt 4: Im Anschluss wurden 10 µl Kaninchen Anti-BDV-Serum (eines infizierten Tieres) in 10 ml PBS-Tween verdünnt und somit eine Verdünnung von 1:1000 hergestellt. Je 100 µl dieser Verdünnung wurde nun in jede Kavität der ELISA-Platte pipettiert und anschließend 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgten erneut 3 Waschzyklen mit Waschpuffer (96er Waschkopf).

Schritt 5: Folgende Verdünnung von 1:3000 wurde nun hergestellt: 4 µl mit (Fc)-alkalische Phosphatase (AP) konjugiertem Ziege-Anti-Kaninchen IgG wurde in 12 ml TBS-Tween verdünnt. Wieder wurden 100 µl dieser Verdünnung in jede Kavität der ELISA-Platte pipettiert und genau für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Erneut wurden 3 Waschzyklen pro Platte mit Waschpuffer (96er Waschkopf) angeschlossen.

Schritt 5, 6 und 7 des CIC-ELISA schlossen sich an.

#### **4.3.1.4 Zum Antikörpernachweis**

Zum Nachweis von spezifischen BDV-Antikörpern wurden sowohl Blut- als auch Liquorproben verwendet und im Double-Sandwich ELISA getestet.

##### **4.3.1.4.1 Methodische Vorgehensweise beim AK-ELISA**

BDV-spezifische Plasma Antikörper wurden mit folgender Methode detektiert:

Schritt 1 und 2 wurden genau so wie beim BDV-spezifischen Immunkomplex-ELISA durchgeführt. Im weiteren Verfahren wurden die Testplatten 3 Waschzyklen mit Waschpuffer unterzogen (96er Waschkopf).

Schritt 3: Danach wurde eine Verdünnung von 1:500 mit 20 µl spezifischen monoklonalen anti-BDVp40 Antikörpern und mit 20 µl spezifischen monoklonalen anti-BDVp24 Antikörpern mit PBS-Tween hergestellt.

Davon wurden je 100 µl pro Kavität pipettiert und entweder 1 Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Pro Platte wurden im Anschluss 3 Waschzyklen mit Waschpuffer durchgeführt (96er Waschkopf).

Schritt 4: Später wurden 40 µl einer 20%igen Antigensuspension eines BDV – positiven Pferdegehirns oder aus Zellkultur gewonnenen Materials mit 12 ml PBS-Tween auf eine Verdünnungsstufe von 1:300 verdünnt. In jede ELISA-Platte wurden dann pro Kavität je 100 µl dieser Antigen-Verdünnung pipettiert und entweder 1 Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Diese Arbeitsschritte, entweder bis zu der Inkubation mit den monoklonalen BDV-Antikörpern oder bis hin zur Inkubation mit der Antigensuspension, konnten bis mindestens zwei Wochen

im Voraus geleistet werden. Die so hergestellten, beschichteten ELISA-Platten wurden bei 4 °C bevorratet.

Im weiteren Verfahren wurden die Testplatten 3 Waschzyklen mit Waschpuffer unterzogen (96er Waschkopf).

Schritt 5: Eine geometrische Verdünnungsreihe der zu testenden Pferdeproben wurde mit Probenverdünnungspuffer (PBS-Tween) ab einer Verdünnung von 1:100 bis zu 1:800 hergestellt. Dies geschah, indem zuerst auf jede ELISA-Platte nun je 100 µl Probenverdünnungspuffer PBS-Tween pro Kavität pipettiert wurden und in die Reihen A2 bis A12 und E2 bis E12 weitere 100 µl PBS-Tween pro Kavität gegeben wurden.

Pro Testprobe wurden ferner 2 µl in Reihen A2 bis A12 und in Reihen E2 bis E12 gegeben, folglich entstand eine Verdünnung von 1:100.

Mittels Multikanalpipette wurden die Kaverneninhalte nun durchmischt und daraus je 100 µl entnommen und in die nächsten 3 Querreihen B, C und D bzw. F, G und H übertragen, wobei aus den beiden letzten Kavitätenreihen D und H je 100 µl verworfen wurden. Dadurch entstanden Verdünnungsstufen von 1:100 über 1:200, 1:400 bis hin zu 1:800 für jede zu testende Probe. Mit der Positiv- und Negativkontrolle wurde nach gleichem Schema in Reihe C1 bis H1 verfahren. Die so bereiteten Platten wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Nun wurden 3 Waschzyklen mit Waschpuffer (96er Waschkopf) durchgeführt.

Schritt 4, 5, 6 und 7 des CIC-ELISA schlossen sich an.

## **4.4 Molekularbiologische Methoden**

### **4.4.1 RNA-Extraktion**

Nach der Methode von (Chomczynski und Sacchi 1987) erfolgte die RNA-Isolation. In leicht veränderter Form wurde das Protokoll der Firma GibcoBRL übernommen und durchgeführt. Mit diesem Verfahren wurde die gesamte zelluläre RNA aus dem eukaryotischem Material isoliert.

#### Lösungen zur RNA-Extraktion

TRIzol® Reagenz (Denaturierungslösung)

Monophasische Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung

Chloroform

Isopropanol

75%iger Ethanol

verdünnt in DEPC-Wasser

DEPC-Wasser (RNase freies Wasser; 0,01% (v/v))

Diethylpyrokarbonat 1 ml



#### 4.4.2.1 Konzentrationsbestimmung der RNA

$$c(\text{RNA}) = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g/ml}$$

#### 4.4.2.2 Konzentrationsbestimmung der Primer (Oligodesoxynukleotidsequenzen)

$$c(\text{DNA}) = (\text{OD}_{260} \times 100 \times \text{Verdünnungsfaktor}) / \text{Sequenzlänge (in Nukleotiden)} = \mu\text{mol}$$

#### 4.4.3 Primer der BDV-PCR

Für die beispielhafte Darstellung der PCR wurden folgende Primer für ORF II (p24-Gene) benutzt:

Primer	Sequenz	Nucleotid-position	Polarität	Amplikon
(A)P1249F	5' gct tga act agt cag gag gct ca 3'	1249-1270	sense	657 bp
(B)P1905R	5' ggt ttg aat tca tgg tga ttc g 3'	1905-1884	antisense	im ORF II

Tabelle 4.4-1

Hier angegeben sind die Sequenz, Polarität und die Größe des Amplifikats. Die Primer wurden kreiert mittels dem Programm: Lasergene v. 5 DNA-Star.

#### 4.4.4 Reverse Transkription (RT)-Polymerase Kettenreaktion (PCR) in einem Schritt (OneStep RT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem „OneStep RT-PCR Kit“ der Firma QIAGEN durchgeführt. Hiermit kann die Reverse Transkription und die PCR-Amplifikation in einem Schritt durchgeführt werden, d. h. , ohne Wechsel des Reaktionsgefäßes. Für den Nachweis von BDV-spezifischen Sequenzen in RNA-Isolaten müssen virusspezifische mRNA bzw. genomische Virus-RNA aus dem Gesamt-Isolat in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine reverse Transkriptase (Revertase) eingesetzt. Diese ist die Hauptkomponente des QIAGEN-Enzym-Mix. Durch den Einsatz des entsprechenden Primers (siehe 4. 8. 3 Primer), wurden vom 3'-Ende der mRNA-Matrize die cDNA-Moleküle der gewünschten Sequenz synthetisiert. Die Polymerase Kettenreaktion basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines vorgeschriebenen DNA-Bereiches, der von zwei Oligodesoxyribonukleotid-Startsequenzen (Primern) flankiert wurde, die sich jeweils an den Enden des zu amplifizierenden DNA-Bereiches befanden (Mullis et al. 1986; Mullis und Faloona 1987).

Im QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (100) sind die folgenden Materialien für 100 Reaktionen enthalten:

QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix:	200 µl
Omniscript™ Reverse Transkriptase	
Sensiscript™ Reverse Transkriptase	
HotStarTaq® DNA Polymerase	
QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer	1,0 ml
Q-Lösung, 5 x	2,0 ml
dNTP Mix, je 10 mmol	200 µl
RNase-freies Wasser	2 x 1,9 ml

Im einzelnen kamen pro Ansatz zur Herstellung des Mastermixes 22,5 µl RNase-freies Wasser, 10 µl Puffer, 2 µl dNTP, 1,5 µl Primer A, 1,5 µl Primer B (jeweiliger genspezifischer Primer (siehe 4. 4. 3) je 0,6 µmol, 2 µl Enzymmix und 0,5 µl (40 U/ µl) RNase-Inhibitor (RNase Out™ der Firma Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe) zur Anwendung. Der Mastermix wurde mit einigen Pipettehüben vorsichtig und gründlich gemischt. Anschließend wurden 10 µl RNA-Template in die einzelnen Eppendorfgefäße hinzugegeben. Dann wurden die Proben einer initialen Denaturierung, 45 Reaktionszyklen und einer finalen Extension im PCR-Automaten (Thermocycler 60; BIOMETRA, Göttingen) unterzogen. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

RT-Reaktion:	50°C, 30 min
Initiale Denaturierung:	95°C, 15 min

Reaktionszyklus (45 mal):

Denaturierung:	94°C, 1 min
Primer-Bindung (Annealing): (Primer-spezifische Temperatur)	54°C, 1 min
Synthese:	72°C, 1 ½ min

Finale Extension:	72°C, 10 min
-------------------	--------------

In diesem Schritt findet die reverse Transkription statt, bei der die RNA in cDNA umgeschrieben wird. Da die HotStarTaq DNA Polymerase durch Antikörper blockiert ist und erst bei einer Denaturierungs-Temperatur von 95 °C ihre Aktivität wiedererlangt, ist die initiale PCR-Aktivierung erforderlich.

Nach allen durchlaufenen Reaktionszyklen wurden die Proben entweder in einer „nested“-PCR weiter verarbeitet oder direkt mittels Gelelektrophorese auf ihre Amplifikate hin untersucht, und die entstandenen Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

#### 4.4.5 „Nested“ – Polymerase Kettenreaktion (n – PCR)

Durch den Einsatz von „nested“- Primern wurde in der n – PCR eine erhöhte Spezifität und auch Sensitivität gegenüber der vorgeschalteten PCR erreicht. Hierbei schloss sich an die vorangegangene PCR (1. PCR) eine erneute PCR (2. Runde) an, bei der Primer verwendet wurden, die ein kleineres, innerhalb des amplifizierten Bereiches der so genannten ersten Runde, nämlich das „nested“ – PCR - Amplifikat hergestellt haben. Die in der 1. PCR negativen Proben wurden in der 2. PCR im Falle der vorgestellten Proben ebenfalls negativ getestet.

#### 4.4.6 DNA-Gelelektrophorese

Lösungen und Reagenzien:

TAE-Puffer 50 x

Tris (hydroxymethyl) amoniomethan	242,5 g
Na-Azetat	20,65 g
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	18,5 g
auf pH 8,0 einstellen	
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Probenlaufpuffer 1:50 plus 80 µl Ethidiumbromid / ITyp II (Sambrook et al. 1989)

Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml
-----------------------	----------

Agarosegel (1%)

Agarose	1,0 g
1 x TAE	ad 100 ml

1 g Agarose wurde mit 1 x TAE Puffer auf ein Volumen von 100 ml gebracht, einmal aufgeköcht und im Wasserbad auf 65 °C zum Gießen des Gels temperiert. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden 2 µl der Ethidiumbromid-Lösung hinzupipettiert. Nun wurde die Lösung in das Gelbett einer vorbereiteten Horizontalgelapparatur gefüllt.

Die Auftrennung der aus der RT-PCR und „nested“-PCR gewonnenen Amplifikate erfolgten in Anlehnung an die Vorschriften von Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989).

Die DNA-Proben wurden mit  $\frac{1}{10}$  Volumen Probenladepuffer vermischt und jeweils vorsichtig in die Probenaschen der Horizontalgele überführt. Bei einer angelegten Spannung von  $U = 40 \text{ V}$ , erfolgte der Elektrophoreseverlauf bei einem angelegten Elektrischen Feld von  $E = 11,4 \text{ V/cm}$  und einer Stromdichte von  $I = 42,9 \text{ mA/cm}^2$  bei Raumtemperatur. Dies entsprach einer Einstellung am Elektrophorese-Netzgerät EPS 500/400 (PHARMACIA, Freiburg) von  $U(\text{fest}) = 80 \text{ V}$  und  $I(\text{Start}) = 120 \text{ mA}$ .

Die Auswertung der Gele erfolgte mittels eines Transilluminators (Uni Equip) bei  $302 \text{ nm}$ . Zur Dokumentation wurde eine Polaroidkamera (Biorad DS 34) und Polaroid-Film Type 667 genutzt.

#### 4.4.7 Reinigung von PCR-Produkten:

Die Reinigung der PCR-Produkte wurde mittels DNace Quick-Clean durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden mehr als 98 % (Herstellerangaben) der Enzyme, Primerdimere und dNTPs von der DNA-Präparation eliminiert.

Lösungen und Reagenzien:

DNace Quick-Clean	5 ml
Ethanol (70%)	

Zum PCR-Ansatz wurde 1:1 DNace Quick-Clean gegeben und anschließend gründlich gevortext<sup>54</sup>. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Proben bei Maximalgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Mit 70%igem Ethanol wurden die DNA-Fragmente nun gewaschen und zum Trocknen der DNA-Pellets umgekehrt in den Zentrifugehalter gestellt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die DNA-Pellets zur Direktsequenzierung in Wasser resuspendiert.

#### 4.4.8 Direktsequenzierung von PCR-Produkten

Nach der von SANGER et al. (Sanger et al. 1977) beschriebenen Methode wurde mit Hilfe des BigDye<sup>®</sup> Terminator v3. 1 Cycle Sequencing Kit eine Sequenzierung der gereinigten PCR-cDNA-Produkte durchgeführt. Dieser Kit enthielt die Reagenzien in einem sofort

---

<sup>54</sup> Vortexen: Mischvorgang mittels Vortex-gerät; etablierter Begriff; Herleitung vom Wortstamm der Herstellerfirma des Mischgerätes

einsetzbaren vorgefertigten Mix. Hinzugefügt wurden die Templates und die jeweiligen Template-spezifischen Vorwärtsprimer.

#### Enzyme und Reagenzien

BigDye 3. 1 - Ready Reaction Mix	4 µl
BigDye Terminator v1. 1/3. 1 Sequencing Buffer (5X)	
Primer (Vorwärtsprimer)	20 µmol
Probe	5 µl

Auf Eis wurde der Sequenzierungsmix wie folgt hergestellt: Nacheinander wurden die angegebenen Mengen an die Eppendorfgefäßwand pipettiert, wobei der Terminator-Mix vorgelegt war. Die Primer und die Templates wurden zuvor in Wasser gelöst.

Verdünnungspuffer	1 µl
Template	1 – 6 µl
Primer (10 pmol / µl)	1 µl
Dye-Terminator Mix	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Im Anschluss wurde dieser Mix 25 Zyklen im Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

96°C	10 sec
45-60°C	5 sec
60°C	4 min

Es folgte eine erneute Aufreinigung nach dem Schema aus Kapitel: 4. 4. 7.

Hiernach wurden die Proben zum Sequenzieren im entsprechenden Labor als Dienstleistungsauftrag abgegeben. Die Sequenzierung erfolgte mittels ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Zur Auswertung und Analyse der erhaltenen Sequenz kam folgendes Computerprogramm zum Einsatz: Lasergene v. 5 DNA-Star.

#### 4.5 Pferdepopulation in Deutschland

Nach Hochrechnungen der „Marktanalyse Pferdesportler in Deutschland 2001“<sup>55</sup> kann man davon ausgehen, dass es in Deutschland mehr als eine Million Pferde und Ponys gibt. Damit hat sich die Pferdepopulation in Deutschland in den vergangenen 35 Jahren mehr als verdreifacht.<sup>56</sup> Die FN<sup>57</sup> hat intern aus dieser Studie folgende Zahlen ermittelt:

<u>Bundesland:</u>	Abkürzung Bundesland	% - des Bundesdeutschen Gesamtanteiles	<u>Pferdepopulation:</u>
Schleswig-Holstein	(SH)	6,8	79. 857
Hamburg	(HH)	1,2	13. 310
Niedersachsen/Bremen	(NS/BRE)	19,3	226. 262
Nordrhein-Westfalen	(NRW)	23,6	277. 244
Hessen	(HES)	10,6	124. 147
Rheinland-Pfalz	(RP)	5,3	62. 074
Saarland	(SAR)	2,2	24. 829
Baden-Württemberg	(BW)	13,9	162. 478
Bayern	(BAY)	10,9	127. 501
Mecklenburg- Vorpommern	(MVP)	0,9	9. 670
Sachsen-Anhalt	(SA)	1,7	19. 341
Berlin/Brandenburg	(B/BRA)	1,7	19. 341
Thüringen	(THÜ)	0,9	9. 670
Sachsen	(SAC)	1,7	19. 341
<u>Total</u>		100	<u>1. 175. 065</u>

Tabelle 4.5-1

<sup>55</sup> Auftraggeber FN; Durchgeführt durch Firma IPSOS

<sup>56</sup> Daten der Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN) e.V.

<sup>57</sup> FN: Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN) e.V.

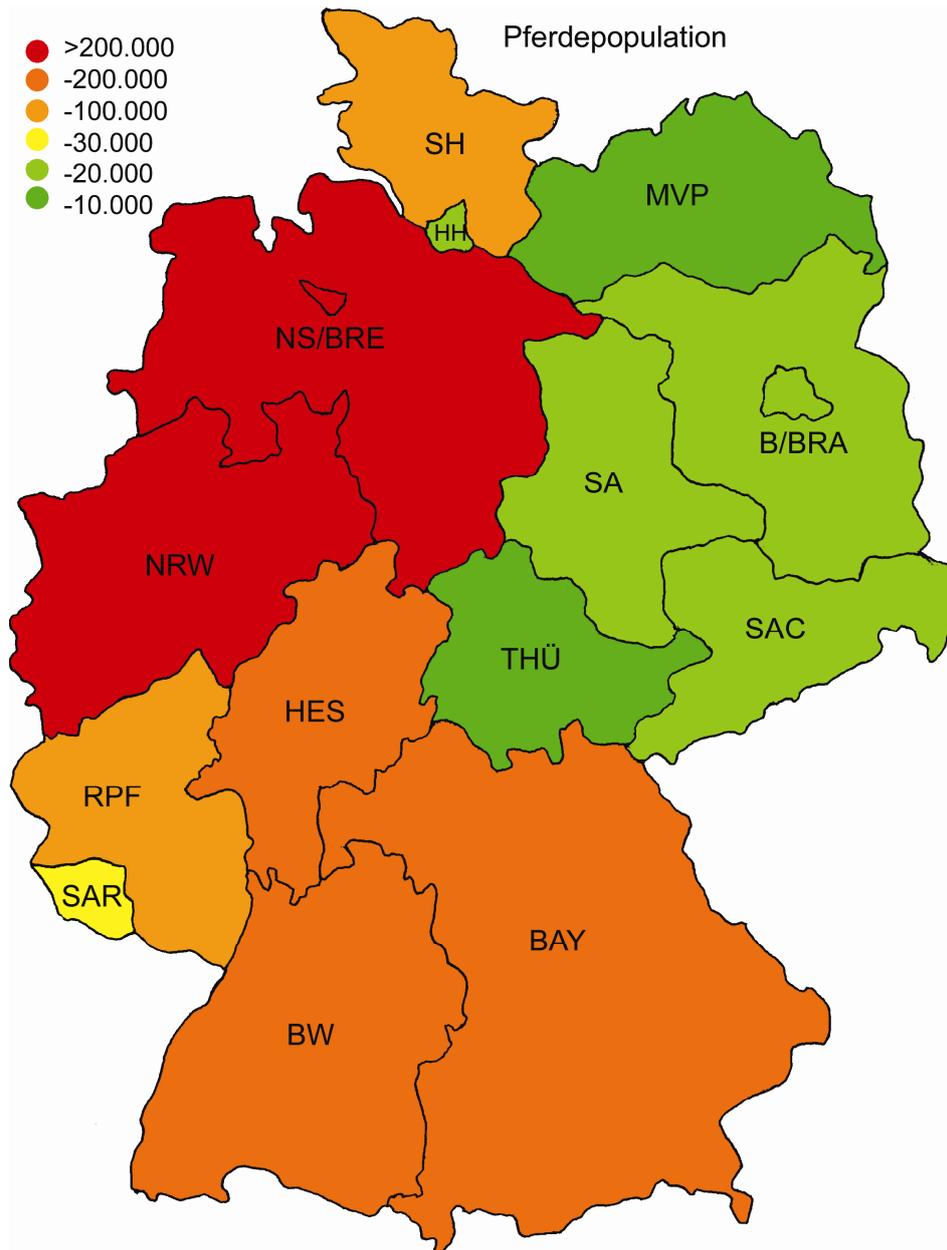


Abbildung 4.5-1

Aus dieser wachsenden Pferdepopulation stammt ein Grossteil der gesammelten Proben, nur wenige Proben stammen aus dem Ausland. Nach Angaben der FN wird der Bremer Pferdebestand bei dieser Schätzung zu Niedersachsen gerechnet und nicht separat beziffert.

#### 4.6 Labore, Tierärzte und Patientenbesitzer

Hinsichtlich der BDV-Diagnostik arbeiteten ca. 300 verschiedene Stellen im In- und Ausland mit der Berliner Gruppe (RKI; FU-Berlin), die als einzige Gruppe eine derartige ausgefeilte Bornavirus - Diagnostik betreibt, zusammen und schickten Blutproben ihrer Pferdepatienten ein.

#### 4.7 Probensammlung und Datensammlung

In der Arbeitsgruppe Bode (RKI) sind Daten und Ergebnisse in Form einer Microsoft Access Datenbank gesammelt worden. Diese Datenbank wurde laufend ergänzt und erweitert. Der Auswertungszeitraum der untersuchten Blutproben, die in meiner Arbeit zusammengefasst sind, beschränkt sich auf die Jahre **2000 bis einschließlich 2004**.

Zur Einsendung kamen 5140 Proben von Pferden, die sich wie folgt aufteilten: Citratblutproben 3731, EDTA - Blutproben 487, Blutserum 654, Blutplasma 3, Heparinblut 101, Liquor 42, Samen 11 und Organproben, wie Gehirn 39, Auge 18, Rückenmark 1, Urin 1. Der Rest fiel unter hämolytisch 20, geronnen 21 oder sonstiges 11. Ein Teil aller untersuchten Materialien wurden bei – 70 °C archiviert, sofern noch eine Restmenge nach den Untersuchungen vorhanden war.

Um diese großen Probenmengen sinnvoll zu verwerten, wurden Anforderungsscheine zur statistischen und epidemiologischen Erhebung eingesetzt, welche fortwährend in der Fragestellung präzisiert und weiterentwickelt wurden. Das z. Zt. jüngste Modell ist in Abbildung 4. 7. 1 und 4. 7. 2 wiedergegeben. Hier handelte es sich um vorberichtliche Erhebungen zu den eingesandten Proben. Die ausgefüllten Fragebögen flossen alle in die Auswertung mit ein, wobei zu bemerken ist, dass leider auch unter den Eingesandten viele Fragefelder unbeantwortet und leer zurückkamen. In solchen Fällen wurde das Antwortfeld mit -keine Angaben- in die Datenbank aufgenommen.

Die Fragebögen waren so strukturiert, dass bei einem gesunden Tier nur Seite eins ausgefüllt werden sollte und bei einer Erkrankung des Pferdes zusätzlich Seite zwei.

**Anforderungsschein für die Untersuchung auf Bornavirus-Infektion bei PFERDEN - Blatt 1**

**Zurück an:**

Priv.-Doz. Dr. Liv Bode  
 P24 – Bornavirus-Infektionen  
 Robert Koch - Institut  
 Nordufer 20, D-13353 Berlin  
 Tel. +49-1888-754-2451/-2580  
**AUSKUNFT: Tel: +49-1888-754-2580**  
 Fax: +49-1888-754-2611  
 E-mail: [bodel@rki.de](mailto:bodel@rki.de)

**Von:**

**Tierarzt/in - Tierklinik**

**Name:**

**Adresse:**

Tel:.....

**Fax:** .....

**E-mail**

**Angaben zum Pferd :**

**Tiername:**

**Tierhalter (Name und Adresse):**

Alter:             Hengst         Wallach         Stute

Rasse:

.....

.....

.....

Unterbringung:     mit anderen Pferden     Anzahl im Bestand:                     alleine  
                           Reitstall                     Weide

**Blutuntersuchung auf Bornavirus-Infektion (bitte 5 -10 ml Citratblut):**

**Datum der Blutentnahme:**

Erstuntersuchung:     ja     nein

Verlaufsuntersuchung:     ja     nein

**Aktueller Anlass zur Bornavirus-Untersuchung:**

**Pferd gesund:**

- Überwachung / Regelkontrolle in Reitbestand, Rennstall oder Zucht
- Kontrolle wegen Kontakt zu erkranktem Tier
- Regelkontrolle nach früherer Erkrankung mit Spontanheilung
  - Dauer Symptomfreiheit:     Monate             Jahre
- Regelkontrolle nach früherer Erkrankung und antiviraler Therapie
  - Dauer Symptomfreiheit:     Monate             Jahre

**Pferd erkrankt:**

seit (Zeitraum): .....

Datum (wenn bekannt): .....

**Angaben zur klinischen Symptomatik:**

[Bitte unbedingt auf Blatt 2](#)

**An gaben zur Behandlung:**

[Bitte unbedingt auf Blatt 2](#)

**Angaben zum Therapieverlauf:**

[Bitte unbedingt auf Blatt 2](#)

Mit der Blutuntersuchung auf Bornavirus-Infektion nutzen Sie neue Diagnostikmethoden und Behandlungsmöglichkeiten zur optimalen tierärztlichen Betreuung Ihrer Patienten. Bitte helfen Sie durch möglichst vollständige Angaben, die Infektionsverläufe, Ansteckungswege und Therapiemöglichkeiten dieser wichtigen und in der Pferdepopulation weit verbreiteten Virusinfektion weiter zu erforschen. Vielen Dank für Ihre Unterstützung.

Abbildung 4.7-1

**Fragebogen zur Erkrankung und Behandlung von PFERDEN  
mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion – Blatt 2**

**Zurück an:**

Priv.-Doz. Dr. Liv Bode  
P24 – Bornavirus-Infektionen  
Robert Koch - Institut  
Nordufer 20, D-13353 Berlin  
Tel. +49-1888-754-2451/-2580  
AUSKUNFT: Tel: +49-1888-754-2580  
Fax: +49-1888-754-2611  
E-mail: [bodel@rki.de](mailto:bodel@rki.de)

**Von:**

**Tierarzt/in - Tierklinik**

Name:

Adresse:

Tel:.....

Fax: .....

E-mail

**Basisangaben von Blatt 1 (bitte übertragen):**

**Name des Pferdes:**

**Name des Tierhalters:**

Bornavirus-Infektion nachgewiesen:  ja

nein, Erstuntersuchung

**Angaben zur klinischen Symptomatik:**

**Störung im:**

- |            |  |   |  |  |
|------------|--|---|--|--|
| Verhalten: | <input type="checkbox"/> Apathie                       | <input type="checkbox"/> Schläfrigkeit    | <input type="checkbox"/> Ängstlichkeit       | <input type="checkbox"/> Häufiges Gähnen |
| Bewegung:  | <input type="checkbox"/> Ataxie                        | <input type="checkbox"/> Gangunsicherheit | <input type="checkbox"/> Nachhandparese      | <input type="checkbox"/> Manegebewegung  |
| Fressen:   | <input type="checkbox"/> kein Appetit                  | <input type="checkbox"/> Schlingstörung   | <input type="checkbox"/> Kau-/Schluckkrämpfe |  |
| Darmtrakt: | <input type="checkbox"/> rezidivierende Koliken        |   |  |  |
| Befinden:  | <input type="checkbox"/> Leistungsschwäche (ungeklärt) | <input type="checkbox"/> Kopfschüttler    | <input type="checkbox"/> .....               |  |

Bei Mehrfachnennungen, bitte Hauptsymptomatik bezeichnen: .....

Ersterkrankung                       Rezidiv                       frühere Amantadintherapie:     ja     nein

Symptome seit (Zeitraum): .....                       Datum (wenn bekannt): .....

**Angaben zur Behandlung:**

**Mit Amantadin:**

nein

ja

Beginn.....

Ende .....

Dosis im Mittel /d.....

Körpergewicht Pferd .....

welche: .....

Sonstige Medikamente:

nein

ja

**Angaben zum Therapieverlauf mit Amantadin:**

**Erstbehandlung:**

**Klinische Besserung:**                       nein                       ja                       seit wann: .....

**Verschlechterung:**                       nein                       ja                       seit wann: .....

**Rezidiv-Behandlung:**

**Klinische Besserung:**                       nein                       ja                       seit wann: .....

**Verschlechterung:**                       nein                       ja                       seit wann: .....

**Besteht Beratungsbedarf?**     nein

ja

Mit der Blutuntersuchung auf Bornavirus-Infektion nutzen Sie neue Diagnostikmethoden und Behandlungsmöglichkeiten zur optimalen tierärztlichen Betreuung Ihrer Patienten. Bitte helfen Sie durch möglichst vollständige Angaben, die Infektionsverläufe, Ansteckungswege und Therapiemöglichkeiten dieser wichtigen und in der Pferdepopulation weit verbreiteten Virusinfektion weiter zu erforschen.  
Vielen Dank für Ihre Unterstützung.

Abbildung 4.7-2

#### 4.8 Proben-Beispiel im pAG-ELISA

Zur Veranschaulichung der ELISA-Tests wurden verschiedene Blutproben kranker und gesunder Pferde auf BDV-pAG untersucht.

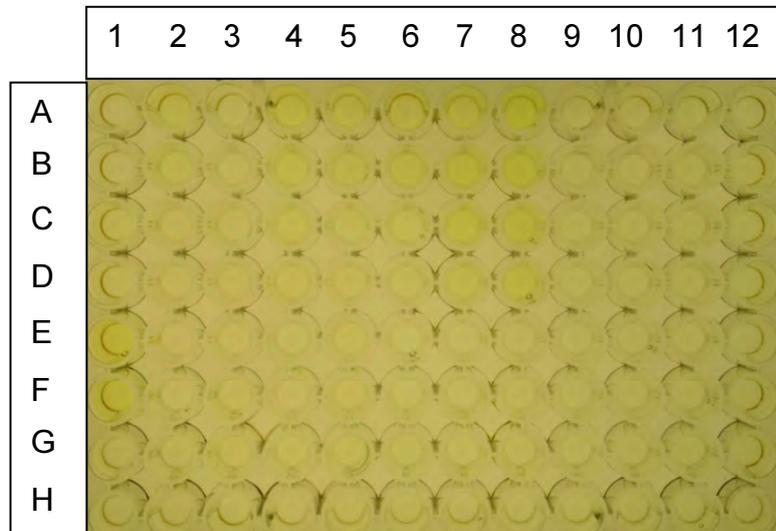


Abbildung 4.8-1 Mikrotiterplatte eines pAG-ELISA (Foto: Autor).

In diesem ELISA sind 22 Blutproben auf BDV-pAG getestet worden. Probe 1 bis 11 befinden sich jeweils in Spalte 2 bis 12 in Reihe A bis D und Proben 13 bis 22 jeweils in Spalte 2 bis 12 in Reihe E bis H. In Abschnitt 4.3.1.2.1 wird die Vorgehensweise in Schritt 7 erläutert. In Spalte 1 befinden sich zwei Leerwerte, zwei schwach positive-Pferdeblutproben, zwei Positiv- und zwei Negativkontrollen. Es folgt die photometrische Auswertung:

BDV-pAG- ELISA													
Messdaten Datei :		Kein Fehler aufgetreten										Datum der Messung :	
Parameter Datei : BDV-pAG.par												Zeit der Messung :	
		ProbenIDs / Verdünnung / ReaderWerte - BC / Ergebnisse											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Leerwert	0,095	1:2 0,361	1:2 0,077	1:2 0,526	1:2 0,348	1:2 0,256	1:2 0,698	1:2 0,793	1:2 0,061	1:2 0,080	1:2 0,099	1:2 0,045
		---	++	---	++	++	+	+++	+++	---	---	---	---
B	Leerwert	0,096	0,229	0,072	0,389	0,309	0,457	0,642	0,698	0,080	0,083	0,107	0,087
		---	+	---	++	++	++	+++	+++	---	---	???	---
C	SW-POS	0,130	0,122	0,113	0,316	0,189	0,224	0,621	0,643	0,098	0,081	0,121	0,096
		(+)	(+)	???	++	+	+	+++	+++	---	---	(+)	---
D	SW-POS	0,122	0,100	0,111	0,243	0,145	0,127	0,427	0,608	0,098	0,088	0,115	0,105
		(+)	---	???	+	(+)	(+)	++	+++	---	---	???	???
E	PosKon	0,742	1:2 0,024	1:2 0,066	1:2 0,026	1:2 0,110	1:2 0,061	1:2 0,063	1:2 0,076	1:2 0,050	1:2 0,056	1:2 0,063	1:2 0,041
		+++	---	---	---	???	---	---	---	---	---	---	---
F	PosKon	0,685	0,053	0,061	0,052	0,125	0,085	0,084	0,086	0,084	0,112	0,063	0,104
		+++	---	---	---	(+)	---	---	---	---	???	---	???
G	NegKon	0,071	0,076	0,107	0,100	0,145	0,105	0,094	0,122	0,106	0,101	0,102	0,112
		---	---	???	---	(+)	???	---	(+)	???	???	???	???
H	NegKon	0,041	0,041	0,054	0,024	0,074	0,066	0,044	0,058	0,081	0,084	0,052	0,068
		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Abbildung 4.8-2 Ergebnisprotokoll der photometrischen Auswertung eines pAG-ELISA (z.B. sind die Proben in Spalte 7 und 8: pAG +++ und in Spalte 4 und 5: pAG ++) Foto: (Autor).

#### 4.9 Proben-Beispiel in der RT-PCR

Hierbei wurden Gehirnproben von drei erkrankten Tieren untersucht. Gehirn A, B und C.



Abbildung 4.9-1 Gel unter UV-Licht (Foto: Autor).

Die Proben wurden aus Medianschnitten der Gehirne entnommen. Probe B1 wurde der Region Medulla oblongata, B2 der Region des Mittelhirns, B3 und B4 der Region des Großhirns auf medianer Seite und Probe B5 der Region Corpus callosum entnommen. Die Proben wurden nach dem gleichen Schema entnommen, wobei sich Regionen von B und C entsprechen. Proben A1-A4 entsprechen den Regionen B2/C2-B5/C5.

Proben A4, C1, C2, C4 und C5 zeigen deutlich in der Höhe des p24 Proteins (siehe weißer Pfeil in Abb. 4. 9-1) eine Bande, die auf das Vorhandensein des Phosphorproteins von BDV in den genannten Proben hinweist.

#### 4.10 Proben-Beispiel in der Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse wurde der komplette BDV-Leserahmen II (p24-Gen, Nukleotide 1272-1875) des Stamms V mit den Sequenzierungsrahmen der Proben verglichen. Dabei stellte sich bei dem Pferdegehirn aus Probengruppe A heraus, dass nur Probe A4 eine Veränderung, nämlich eine echte Mutation<sup>58</sup>, im Sequenzierungsrahmen von 1413-1877 in Position 1479 von tcg (Codon<sup>59</sup>, hier für die Aminosäure Serin stehend) nach acg (Codon, hier für die Aminosäure Threonin stehend) aufwies. Darüber hinaus konnten keine Sequenzabweichungen zum Referenzstamm V festgestellt werden. In Probengruppe C zeigte sich, dass Proben C1, C2, C4 und C5 unterschiedliche Veränderungen aufwiesen. C1 wurde mit einem Sequenzierahmen von 1365-1457 untersucht. Es wurde keine Mutation beobachtet. C2 wurde mit einem Sequenzierahmen von 1362-1877 untersucht. Hierbei

<sup>58</sup> Eine echte Mutation ist die Änderung eines Codons in ein nicht synonymes Codon, welches also eine andere Aminosäure in der Translation ergibt.

<sup>59</sup> Codon bezeichnet eines der 64 Wörter, bestehend aus drei (Basentriplett) der vier verwendeten Basen um aus der Nukleinsäure-Sprache in die 20 proteinogenen Aminosäuren zu übersetzen.

wurde in Position 1647 eine stille Mutation<sup>60</sup> vom Basentriplett gat (für Asparaginsäure) nach gac (ebenfalls für Asparaginsäure) beobachtet. C4 wurde mit einem Sequenzierahmen von 1342-1877 untersucht. Hierbei konnten stille Mutationen in Position 1344 von cga (für Arginin) nach cgg (ebenfalls für Arginin), in Position 1386 von ttg (für Leucin) nach ctg (ebenfalls für Leucin), in Position 1647 von gat (für Asparaginsäure) nach gac (ebenfalls für Asparaginsäure), in Position 1692 von cta (für Leucin) nach ctt (ebenfalls für Leucin) und in Position 1710 von aca (für Threonin) zu acg (ebenfalls für Threonin) festgestellt werden. Echte Mutationen wurden in Position 1347 von ccg (für Prolin) nach tcg (für Serin) und in Position 1371 von gtc (für Valin) nach atc (für Isoleucin) festgestellt. C5 wurde mit einem Sequenzierahmen von 1357-1877 untersucht, dabei ergaben sich stille Mutationen in Position 1626 von atc (für Isoleucin) nach att (ebenfalls für Isoleucin), in Position 1647 von gat (für Asparaginsäure) nach gac (ebenfalls für Asparaginsäure) und in Position 1692 von cta (für Leucin) nach ctt (ebenfalls für Leucin).

#### **4.11 Routinemäßige anamnestische Erhebungen von Pferdepatienteninformationen**

Nach diesen vorgestellten Beispielen, wird in den folgenden Abschnitten eine umfassende Aufschlüsselung der ermittelten Probenwerte zur BDV-Diagnostik gegeben. Diese seroepidemiologische Untersuchung umfasst Proben-Eingänge aus ganz Deutschland (Jahre 2000 bis 2004 einschließlich). Diese Probenbegleitscheine wurden von Tierärzten, Tierheilpraktikern, aber auch Pferdebesitzern eingeschickt. In die statistische Erhebung flossen nur Probenbegleitscheininformationen ein, die klar beantwortet wurden. Die Probenbegleitscheine wurden von den Einsendern unterschiedlich detailliert ausgefüllt.

Um das Eingesandte gut aufzuschlüsseln, habe ich es aufgeteilt in:

1. Gruppe: Überwachung / Regelkontrolle in Reitbestand, Rennstall oder Zucht
2. Gruppe: Kontrolle wegen Kontakt zu erkranktem Tier
3. Gruppe: Regelkontrolle nach früherer Erkrankung mit Spontanheilung
4. Gruppe: Regelkontrolle nach früherer Erkrankung und antiviraler Therapie
5. Gruppe: erkrankt
6. 872 Fragebögen (17,0%) umfassend, die gänzlich unbeantwortet blieben.

---

<sup>60</sup> Bei der stillen Mutation entsteht ein synonymes Codon, welches in der Translation (Übersetzung) für ein und dieselbe Aminosäure codiert.

**Untersuchungsgrund:**

	Häufigkeit	Prozent
Gültig		
Überwachung/Regelkontrolle. . .	1547	30,1
Kontrolle wegen Kontakt zu erkranktem Tier	312	6,1
Regelkontrolle nach früherer Erkrankung mit Spontanheilung	12	,2
Regelkontrolle nach früherer Erkrankung und antiviraler Therapie	101	2,0
Krankheit	2276	44,3
Rezidiv	20	,4
-keine Angabe-	872	17,0
Gesamt	5140	100,0

Tabelle 4.11-1

**4.11.1 1. Gruppe; Überwachung / Regelkontrolle in Reitbestand, Rennstall oder Zucht**

In diese Gruppe fielen ausschließlich gesunde Tiere, die zur Überwachung kontrolliert wurden: 1547 (30,1%) Pferde.

**4.11.2 2. Gruppe; Kontrolle wegen Kontakt zu erkranktem Tier**

In dieser Gruppe wurden diejenigen Pferde zusammengefasst, die gesund waren, jedoch Kontakt zu erkrankten Tieren hatten: 312 (6,1%) Pferde.

**4.11.3 3. Gruppe; Regelkontrolle nach früherer Erkrankung mit Spontanheilung**

In dieser Gruppe wurden die Pferde zusammengefasst, die eine frühere Erkrankung überstanden hatten und spontan, ohne Therapie genesen waren: 12 (0,2%) Pferde.

**4.11.4 4. Gruppe; Regelkontrolle nach früherer Erkrankung und antiviraler Therapie**

Bei dieser Gruppe handelt es sich um Tiere, die durch die antivirale Therapie mit Amantadinsulfat gesundet waren: 101 (2%) Pferde.

**4.11.5 5. Gruppe; erkrankt (inklusive 20 Rezidive)**

Insgesamt wurden 2276 (44,3%) Proben von erkrankten Pferden eingeschickt.

#### **4.12 Tierseuchenrechtliche Maßregelung der Bornaschen Krankheit**

Für die Zusammenstellung der Gesetzesentwicklung wurden Gesetzestexte aus dem Jahre 1880 bis heute gesichtet und die Stellen, die sich mit BDV befassen verarbeitet.