

**Aus dem Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Insel Riems**

**Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. M. G. Beer,
Institutsleiter
des Instituts für Virusdiagnostik**

**Eingereicht über das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Homologe und heterologe Schutzwirkung von MKS-Serotyp-A-
Vakzinen und Etablierung der fetalen Ziegenzungenzelllinie
(ZZ-R127) zur Isolation von MKSV**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Katharina Erika Gerda Brehm
Tierärztin
aus Berlin**

Berlin 2010

Journal-Nummer: 3410

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: PD Dr. Martin G. Beer
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

foot and mouth disease, serology, vaccines, potency, virus neutralization,
isolation, diagnostic techniques, cell culture

Tag der Promotion: 29.11.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-931-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Wir befinden uns den Kreaturen gegenüber unaufhörlich in Situationen, die uns dazu zwingen, Leiden zu verursachen und Leben zu beeinträchtigen. Es ist an uns, zu urteilen, wann wir in der unvermeidlichen Lage sind, Leiden zu verursachen und zu töten und uns damit abzufinden, aus Zwang schuldig zu werden. Albert Schweitzer

Das Wenige, was du tun kannst, ist viel, wenn du nur Schmerz und Leid und Angst von einem Wesen nehmen kannst. Albert Schweitzer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
2 Die Maul- und Klauenseuche.....	2
2.1 Allgemeines.....	2
2.2 Ätiologie.....	3
2.2.1 Struktur.....	3
2.2.2 Genom.....	4
2.2.3 Physikalische Eigenschaften.....	4
2.3 Klinik.....	5
2.4 Pathologie.....	6
2.5 Epidemiologie.....	7
2.6 Immunologie.....	11
2.7 Labordiagnostik.....	13
2.7.1 Probennahme.....	13
2.7.2 Erregernachweis.....	14
2.7.2.1 ELISA zum Nachweis von MKS-Antigen.....	15
2.7.2.2 Virusnachweis in der Zellkultur.....	15
2.7.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	15
2.7.3 Serologie.....	16
2.7.3.1 Nachweis von Antikörpern gegen Strukturproteine.....	16
2.7.3.2 Nachweis von Antikörpern gegen Nicht-Strukturproteine (NSP).....	17
2.8 Bekämpfung der MKS.....	18
2.8.1 Bekämpfungsmaßnahmen und OIE-Regelungen.....	18
2.8.2 MKS-Impfung.....	21
2.8.2.1 Geschichtlicher Überblick.....	21
2.8.2.2 Impfstrategien.....	22
2.8.2.3 Heutige Impfstoffe.....	23
2.8.2.3.1 Herstellung.....	23
2.8.2.3.2 Wirksamkeit heutiger Impfstoffe.....	24
2.8.2.3.3 Einsatz im Rahmen von DIVA-Strategien.....	24
2.8.2.3.4 Grenzen heutiger Impfstoffe.....	26
2.8.2.4 Ansätze für neuartige Impfstoffe.....	26
2.8.2.4.1 Gentechnisch verbesserte MKSV-Lebendvakzinen.....	26
2.8.2.4.2 Gentechnisch verbesserte inaktivierte MKSV-Vakzinen.....	27
2.8.2.4.3 Empty capsid-Vakzinen.....	27
2.8.2.4.4 Protein-Vakzinen.....	28
2.8.2.4.5 Peptid-Vakzinen.....	28
2.8.2.4.6 DNS-Vakzinen.....	29
2.8.2.4.7 Rekominante Vektorvakzinen.....	29
2.8.2.4.8 Ausblick.....	30

3	Zielsetzung der experimentellen Arbeiten	32
4	Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der Ergebnisse.....	34
4.1	Zusammenfassung der experimentellen Untersuchungen.....	34
4.2	Diskussion der Ergebnisse	35
5	Literaturverzeichnis.....	41
6	High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus	62
7	Highly sensitive fetal goat tongue cell line for detection and isolation of foot and-mouth disease virus	77
	Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus.....	77
8	Zusammenfassung.....	93
9	Summary	94
10	Anhang	95
10.1	Abkürzungsverzeichnis	95
10.2	Veröffentlichungen.....	97
10.3	Tagungsbeiträge	97
10.4	Danksagung	98
10.5	Eidesstattliche Erklärung	99

1 Einleitung

Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine fieberhafte, hochansteckende, virusbedingte Allgemeinerkrankung der Klautiere, die in der *Europäischen Union (EU)* der Anzeigepflicht unterliegt. Der Erreger, das Maul- und Klauenseuchevirus (MKSV), ist ein kleines, unbehülltes *RNS-Virus* aus der Familie der *Picornaviridae*, das sich durch seine außerordentlich große Kontagiosität auszeichnet.

Von immenser Bedeutung sind die weitreichenden sozioökonomischen Konsequenzen eines Seuchenausbruchs. In der EU müssen nach der Richtlinie 2003/85 des Rates alle betroffenen Bestände getötet werden. Im Falle eines Ausbruchs werden drastische Sperr- und Kontrollmaßnahmen notwendig. Tierverluste sowie langwierige Handelsrestriktionen resultieren in hohen wirtschaftlichen Verlusten. Eine prophylaktische Impfung ist verboten. Abweichend vom generellen Impfverbot sieht die Richtlinie 2003/85 des Rates die Möglichkeit einer Notimpfung vor, die einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung der MKS leisten kann. Die Notimpfung muss auf Grundlage eines durch die EU genehmigten Impfplans durchgeführt werden, der auf einer Bewertung der epidemiologischen Situation sowie einer ausführlichen Risikoabwägung basiert. Zu diesem Zweck unterhalten sowohl Deutschland als auch die EU eine Vakzinebank, die unterschiedliche Antigene für die Impfstoffproduktion enthalten.

Voraussetzung für eine Notimpfung im Tierseuchenkrisenfall ist die schnelle Bereitstellung eines der Ausbruchssituation entsprechenden Impfstoffes. Die hohe Variabilität des MKSV, insbesondere des Serotyps A, erschwert die zeitnahe Bereitstellung eines geeigneten, das Feldvirus abdeckenden entsprechenden Impfstoffes.

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit den folgenden Fragen:

- 1) Würden die Impfstoffe aus der deutschen oder der EU-Vakzinebank auch vor einer Infektion mit MKS-Viren des Serotyps A schützen, die sich antigenetisch deutlich vom Impfstamm unterscheiden?
- 2) Wie kann man nach einer Einschleppung möglichst unmittelbar abschätzen, ob ein in der Impfstoffbank vorhandener Vakzinestamm einen Schutz gegen den Feldstamm vermitteln würde?
- 3) Kann die MKS-Diagnostik durch die Etablierung einer neuen permanenten Zelllinie optimiert werden?

2 Die Maul- und Klauenseuche

2.1 Allgemeines

Die Maul- und Klauenseuche (MKS), engl. *Foot- and-mouth disease* (FMD), ist eine virusbedingte fieberhafte Allgemeinerkrankung der Klauentiere, d.h. unter anderem der Rinder, Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer sowie der Haus- und Wildschweine. Hervorgerufen wird die Krankheit durch Viren des Genus *Aphthovirus* der Familie *Picornaviridae* (Belsham, 1993). Das typische klinische Bild der MKS ist geprägt durch die Bildung von Bläschen (Aphthen) und Erosionen an Schleimhäuten und unbehaarten Teilen der Haut im Bereich des Mauls und der Klauen.

Obwohl die MKS in Europa in den 60iger bis 80iger Jahren des 20. Jahrhunderts getilgt wurde, gehört sie wegen ihrer potentiell katastrophalen Auswirkungen auch heute noch zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Tierseuchen. Die MKS ist nicht zuletzt deswegen gefürchtet, weil zu ihrer Bekämpfung die befallenen Bestände getötet werden müssen und drastische Beschränkungen im Handel mit Tieren und tierischen Produkten erforderlich sind. Obwohl es derzeit keine Hinweise darauf gibt, dass die MKS-Ausbrüche der jüngeren Vergangenheit durch Bioterrorismus verursacht wurden, zeigen die verheerenden Auswirkungen größerer Ausbrüche, wie 2001 im Vereinigten Königreich, dass MKS eine schlagkräftige Waffe in den Händen von Terroristen sein könnte, deren Ziel es ist, die Wirtschaft eines Landes zu schwächen (Gibbs, 2003).

Deutschland ist zurzeit amtlich anerkannt frei von MKS, der letzte Fall trat hier 1988 auf. Die Maul- und Klauenseuche (MKS) ist eine anzeigepflichtige Tierseuche.

2.2 Ätiologie

Der Erreger, das Maul- und Klauenseuchevirus (MKS), gehört zu der Familie *Picornaviridae* (King et al., 2000), Genus *Aphthovirus*. Die einzelnen Genera *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* und *Teschovirus* lassen sich nicht anhand der Morphologie, wohl aber aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften (2.2.3 Verweis zu physikalische Eigenschaften) wie Säureempfindlichkeit und Dichte unterscheiden (Rueckert, 1996). Es gibt 7 Serotypen des MKS (O, A, C, ASIA, SAT 1, SAT 2, SAT 3), die noch weiter in über 65 Subtypen unterteilt werden (Murphy, 1999; Domingo, 2002). Serotyp O wurde nach *Oise* in Frankreich, und Serotyp A nach *Allemagne* (Deutschland) benannt (Vallee und Carrel, 1922). Ergänzend wurde Serotyp C von Waldmann und Trautwein 1926 beschrieben. Brooksby beschrieb 1958 Isolate aus südafrikanischen Ausbrüchen als SAT 1, SAT 2, SAT 3 (= *South African Territories*). Der zuletzt beschriebene Serotyp ist ASIA. Er wurde nach einem pakistanischen Isolat definiert (Brooksby und Roger, 1957). Eine weiterführende, umfangreiche Darstellung der MKS findet sich bei Röhrer und Olechnowitz, 1980 sowie im Sonderheft S1 Virus Research 2003 (Foot-and-Mouth Disease, Rowlands). Zwischen den o.g. Serotypen der MKS bestehen serologische Kreuzreaktionen, aber keine Kreuzimmunität (2.6 Verweis zu Immunologie).

2.2.1 Struktur

Das Aphthovirus ist ein kleines, unbehüllte Ribonukleinsäure (*RNS*) Virus mit einem Molekulargewicht von $6,9 \times 10^6$ D (Seifert, 1992). Das Virus wird von einer linearen, einzelsträngigen, unbehüllten *RNS* gebildet (Belsham, 1993). Die Virionengröße beträgt 20 bis 30 nm (Röhrer und Olechnowitz, 1980). Das ikosaedrische Kapsid setzt sich aus 60 symmetrisch angeordneten Untereinheiten (sogenannten Protomeren) zusammen. Ein Protomer wird aus den vier viralen Strukturproteine (VP 1-4) gebildet (Domingo et al., 1990, Sobrino et al., 2001). Dabei befindet sich jeweils ein strukturelles Virionprotein des *VP1* bis 3 mit einem Molekulargewicht von $27-30 \times 10^3$ D an der Kapsidoberfläche und ein *VP4* mit einem Molekulargewicht $9-10 \times 10^3$ D im Inneren des Kapsides. Das antigenetisch wichtigste Protein ist das *VP1* (2.6 Verweis zu Immunologie und 2.8.2 MKS-Impfung).

Fünf dieser Protomere bilden ein Pentamer. Das vollständige Kapsid wird aus insgesamt zwölf dieser Pentamere gebildet (Domingo et al., 2002). Zu erwähnen sind auch die acht Nicht-Strukturproteine (L, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C und 3D), die für die Virusvermehrung

wichtig sind. Eine grafische Darstellung (Abb.3) befindet sich im Kapitel 0 „Einsatz im Rahmen von *DIVA*-Strategien“.

2.2.2 Genom

Das MKSV Genom aus linearer einsträngiger (ss) *RNS* hat positive (+) Polarität. Die Genomgröße beträgt ca 8500 Nukleotide (Belsham, 1993) bei einem Molekulargewicht von $2,6 \times 10^6$ D (Minor, 1998). Die drei funktionalen Hauptregionen sind - der nichttranslatierte 5' Bereich (5'untranslated region, 5' UTR), der proteinkodierende Bereich, „*single open reading frame*“ (*ORF*) und der polyadenylierte, nichttranslatierte 3' Bereich (3' UTR) (Belsham, 1993; Sobrino et al., 2001). Eine wichtige funktionelle Struktur ist die 5' UTR. Sie bildet die Initiationsstelle („*internal ribosomal entry site*“, *IRES*) für die Bindung eukaryotischer Ribosomen für die spätere *RNS*- und Proteinsynthese (Rueckert, 1996). Eine andere strukturell wichtige Region ist die 3' UTR. Sie ist an der Interaktion zwischen den viralen Proteinen und den Wirtszellproteinen für die *RNS*-Synthese beteiligt (Domingo et al., 2002).

Die Virusreplikation findet im Zytoplasma statt. Die virale *RNS* kann direkt als (+)-Strang als *messenger-RNS* (*mRNS*) genutzt werden (Murphy, 1999). Nach der Translation eines $2,93 \times 10^6$ D großen Polyproteins (Rueckert, 1996) erfolgt ein schrittweiser Abbau mittels viraler Proteasen. Die Freisetzung der fertig zusammengesetzten Viruspartikel erfolgt durch Zelllyse (Belsham, 1993).

2.2.3 Physikalische Eigenschaften

Anhand der materiellen Eigenschaft der Schwebedichte in Caesiumchlorid, die für MKSV 1,43 g/ml (Rowlands et al., 1971) beträgt, kann man Picornaviridae trotz ähnlicher Virionengröße und Virusaufbau voneinander differenzieren.

Besonders hervorzuheben ist die hohe Tenazität des MKSV. Körpereigene, eiweißhaltige Substanzen wie Epithelgewebe, Speichel, aber auch Kot oder Hautpartikel wirken wie ein Schutzschild um die Viruspartikel. Auch haben Minustemperaturen (Frost) sowie hohe NaCl-Konzentrationen (Bsp. Pökelservierung) sowie Austrocknung bei pH-Werten über 6,5 eher konservierende Effekte (Roux et al., 1921; Burbury 1928).

Von einer Virusinaktivierung ist bei sauren pH-Werten (< 6) und starkbasischen pH-Werten (> 9) auszugehen (Bachrach, 1957 und 1959; Müller, 2001; Wijnker et al., 2007).

Tierische Produkte und Nebenprodukte infizierter Tieren sind z.T. über Monate infektiös (Ryan et al., 2008; USDA-APHIS-VS, 1994). Pasteurisieren bei Temperaturen zwischen 72°C und 95°C für 15 bis 20 Sekunden bewirkt kein vollständiges Abtöten des MKSV (Haas; 2004; Alexandersen et al., 2003). Die natürliche pH-Wertsenkung im Muskelfleisch (nicht aber in Lymphknoten, Knochenmark, Fettgewebe und Blut), während der Fleischreifung und die physiologischen pH-Werte in sauren Milchprodukten inaktivieren das Virus (Alexandersen et al., 2003; Rolle und Mayr, 2007).

In Studien mit Salamiprodukten aus kontaminiertem Fleisch aus experimentell infizierten Schweinen konnte das Virus der Maul- und Klauenseuche 7 Tage nach Herstellung nicht mehr gewiesen werden (McKercher et al., 1978; Panina et al., 1989).

Unter widrigen Bedingungen wie Dunkelheit, Feuchtigkeit und niedrige Temperaturen ist MKSV relativ lange umweltstabil. Beispielsweise beträgt die Tenazität in Erde (Sommer) bis zu 3 Tage, in getrocknetem Kot bis zu 14 Tage, in Gülle (Winter) bis zu 6 Monate, in Milch bei 4 °C bis 6 Tage (Müller, 2001).

2.3 Klinik

Die MKS ist eine fieberhafte Allgemeinerkrankung der Klautiere (Rind, Schaf, Ziege, Büffel, Wildwiederkäuer und Schwein). Das typische klinische Bild ist geprägt durch die Bildung von Bläschen (Aphthen) und Erosionen an kutanen Schleimhäuten und unbehaarten Teilen der Haut. Die Inkubationszeit beträgt 2 bis 14 Tage. Die Krankheit verläuft bei erwachsenen Tieren meist nicht letal, führt aber zu einem lang anhaltenden Leistungsabfall (Haas, 2004). Bei Jungtieren können hohe Verluste durch Schädigung des Herzmuskels auftreten (Donaldson et al., 1984; Brown et al., 1995).

Beim Rind ist Fieber, i. d. R. nur 1 - 3 Tage, das erste Krankheitszeichen. Es kann später aufgrund von Sekundärinfektionen wieder ansteigen. Der Abfall der Milchleistung kann ein weiteres Frühsymptom sein (Haas, 2004). Die Tiere speicheln und schmatzen („MKS-Bart“) und die Futteraufnahme geht zurück. Dann treten auf der Maulschleimhaut und den Klauen, u. U. auch am Euter, z.T. großflächige Aphthen auf, die nach dem Platzen rasch abheilen.

Beim Schaf zeigen sich Lahmheiten, Bläschen im Maulbereich, insbesondere am Gaumen, sowie Fieber, Inappetenz, ggf. Aborte und Lämmerverluste.

Bei der Ziege verläuft die MKS meist gutartig und ohne Allgemeinstörungen. Die Klauen sind nur selten betroffen. Auch Rhinitis, Milchrückgang und das Bild eines „dicken Kopfes“

durch aufgestellte Haare können auf MKS hinweisen. Sowohl beim Schaf wie bei der Ziege fehlt das beim Rind zu beobachtende Speicheln und Schmatzen.

Beim Schwein treten Aphthen vorwiegend an den Sohlenballen, im Klauenspalt und am Kronsaum sowie z.T. an der Rüsselscheibe oder an der Gesäugeleiste säugender Sauen auf. Die Tiere zeigen, begleitet von Fieber zwischen 40 - 41 °C, einen „klammen Gang“ oder rutschen nur noch auf den Karpalgelenken (Haas, 2001a).

Differenzialdiagnostisch sind je nach Tierart folgende Krankheiten auszuschliessen:

Beim Schwein: Vesikuläre Schweine Krankheit (SVD), und Selenvergiftung (Heinritzi et al., 2001). Beim Rind: Blauzungenkrankheit (BT), Bösartiges Katarrhalfieber (BKF), Stomatitis papulosa, Mucosal Disease, Bovine Herpes Virus Erkrankung (BHV1)/Infektiöse Bovine Rhinotracheitis (IBR), Mortelaro und Panaritium. Bei Schaf und Ziege: Blauzungenkrankheit (BT), Lippengrind (Orf), Ziegenpocken, Moderhinke. Außerdem sind mechanische Verletzungen (Trauma) bzw. Verletzungen durch ätzende Substanzen und Photosensibilitätsreaktion wichtige Differenzialdiagnosen.

2.4 Pathologie

Als primäre Virusreplikationsorte gelten der Nasen- und Pharyngealraum und die Lungen (Prato Murphy et al., 1994; Burrows et al., 1981; Suttmoller und Mc Vicar, 1976; Eskildsen, 1969).

Alternativ kann sich auch durch eine kleine Verletzung oder durch gezielte Infektion an entsprechenden Stellen eine Primäraphthe bilden. Aphthen (griechisch Mundausschlag) sind flüssigkeitsgefüllte Blasen, die sich nach dem Platzen in Erosionen mit einem entzündlichen Randsaum und einem gelb-weißlichem Fibrinbelag verwandeln.

Die Infektion breitet sich über das Blut im ganzen Körper aus. Die weitere Virusreplikation erfolgt im lymphoretikulären System, im Epithelgewebe der Haut und in den Herzmuskelzellen (myotrophe Form bei Jungtieren). Die Generalisierung zeigt sich äußerlich durch Aphthen an der Maul- bzw. Genitalschleimhaut, im Klauenspalt sowie an der haarlosen Haut (Euter) (adaptiert nach Rolle und Mayr; 2007). In der den Epithelien kommt es zu einer ballonierenden Degeneration im Stratum spinosum. Bei einer starken Virusvermehrung sind Kolloquationsnekrosen an den Aphthen sichtbar. Mögliche, aber seltene Fundstellen von Aphthen im Schlachttierkörper sind auch der Pansenpfeiler und die Schleimhaut des Rachens (Pharynx) und der Speiseröhre (Ösophagus) (Rolle und Mayr; 2007).

Persistierende Infektion

Trotz der Anwesenheit neutralisierender Antikörper kann das MKS-Virus nach einer Infektion bei vielen Wiederkäuern über Wochen oder gar Monate insbesondere in Rachenschleimproben (Probangproben) nachgewiesen werden (Moonen et al., 2000). Nach der Definition des Weltreferenzlabors für MKS sind Dauerausscheider bzw. „Carrier“ solche Tiere, aus denen 28 Tage nach der MKS-Infektion oder später noch infektiöses Virus isoliert werden kann.

Das MKS-Virus kann beim Rind über 2 Jahre und im Büffel bis 5 Jahre (Salt, 1993), beim kleinen Wiederkäuer (Schaf, Ziege) bis zu 9 Monaten (Röhler und Olechnowitz, 1980; Cottral, 1969) in infektiöser Form persistieren (Terpstra, 1972; Dawe et al, 1994; Vosloo et al, 1996; Müller, 2001; Alexandersen und Donaldson, 2002). Ein Carrierstatus beim Schwein konnte bisher nicht sicher nachgewiesen werden. Der Ort der Persistenz ist der weiche Gaumen. Der Mechanismus der Persistenz ist noch unbekannt (Salt, 1993). Da die Ausscheidung intermittierend erfolgt, ist ein sicherer Ausschluss der Persistenz auf der Ebene des Einzeltieres ist nicht möglich. Daher können Tiere aus infizierten oder ehemals infizierten Populationen für lange Zeit nicht frei gehandelt werden, was die wirtschaftlichen Schäden durch einen Ausbruch erheblich vergrößert.

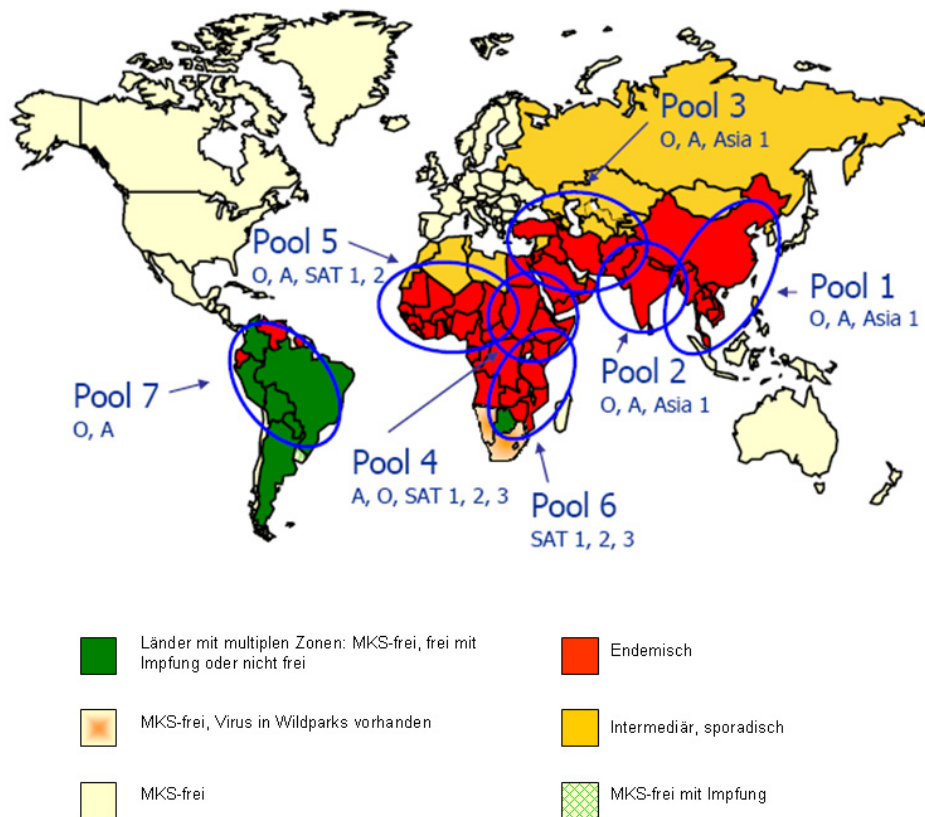
2.5 Epidemiologie

Die MKS kommt in vielen Ländern des Nahen Ostens (u. a. in der Türkei), Asiens, Afrikas und Südamerikas nach wie vor endemisch vor. Der verheerende Seuchenzug Anfang 2001 im Vereinigten Königreich mit Folgeausbrüchen in Frankreich, den Niederlanden und der Republik Irland sowie Ausbrüche in Taiwan, Südkorea und Japan zeigen, dass die Seuche auch in seit Jahrzehnten MKS-freie Länder jederzeit wieder eingeschleppt werden kann.

Obwohl die Möglichkeit besteht, dass sich Virusstämme in neue Regionen verbeiten (z.B. O Panasia Seuchenzug 2001), zeigte sich anhand von *VPI* Gensequenzvergleichen von MKSV über mehrere Jahre hinweg eine Tendenz zum Wiederauftreten ähnlicher Viren in gleichen Gebieten der Welt (Knowles und Samuel, 2003; Rweyemamu et al., 2008). Weil die genetisch und antigenetisch unterschiedlichen Virusstämme dazu neigen, immer wieder innerhalb bestimmter Regionen aufzutreten kann man den globalen Viruspool des MKSV in sieben "regionale Pools" unterteilen (Abb.1). Diese Verteilung spiegelt möglicherweise ein gewisses Maß an Anpassung an die Umwelt wieder. Aus dem regional unterschiedlichen Vorkommen

der Virusstämme folgen die regionalen Prioritäten für die entsprechenden Impfstoffe (Anonymous, Annual OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Report 2008a).

Abb.1 Regionale Virus Pools



Quelle:

Annual OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Report, Jan – Dec 2008, <http://www.foot-and-mouth.org/>

Legende:

Pool 1 – Ostasien, Pool 2 – Südasien, Pool 3 – Eurasien, Pool 4 – Ostafrika, Pool 5 – Westafrika, Pool 6 – Südafrika, Pool 7 – Südamerika

Das Wirtsspektrum für die natürliche MKSV-Infektion umfasst neben den in Europa landwirtschaftlich genutzten Klautieren wie Rinder, Schaf, Ziege und Schwein (Coetzer et al., 1994) auch andere, nicht intensiv gehaltene bzw. wildlebende Spezies folgender Familien: Rinderartige (*Bovidae*), Hirsche (*Cervidae*), (Wild)schweine (*Suidae*), Kamele (*Camelidae*), Giraffen (*Giraffidae*), Igel (*Erinaceidae*), Mäuse (*Muridae*), Meerschweinchen (*Caviidae*), Agutis (*Dasyproctae*), Elefanten (*Elephantidae*), Tapire (*Tapiridae*), Kängurus (*Macropodidae*) und Bären (*Ursidae*) (Federer, 1969; Hedger, 1969; Hedger, 1972; Hedger,

1981; Thomson et al., 2001; Waldmann und Pape, 1920 und 1921). Ausnahmsweise können sich auch Menschen mit dem MKS Virus infizieren. Unter den hierzulande üblichen hygienischen Bedingungen besteht für den Verbraucher von Milch, Milchprodukten und Fleisch jedoch auch im Falle einer Einschleppung der MKS nach Deutschland oder in das benachbarte Ausland keine Gefahr. Diese Einschätzung wird u.a. durch die Erfahrungen aus MKS-Seuchenzügen in der Vergangenheit und im Ausland gestützt. In der Fachliteratur werden einzelne Krankheitsfälle beim Menschen beschrieben, welche dieser Einschätzung jedoch nicht widersprechen (Haas, 2004). Nur bei Personen, die unmittelbaren und intensiven Kontakt mit erkrankten Klautieren bzw. dem von diesen ausgeschiedenen Virus hatten, kam es in seltenen Fällen zu gutartig verlaufenden Erkrankungen (Armstrong et al., 1967). MKS in Schweinen und Rindern stellt sich meist als schwerwiegende Erkrankung mit Lahmheit, verminderter Futteraufnahme aufgrund von Aphthen an Maul und Klauen dar (Alexandersen et al., 2003). Generell mildere Verläufe, bis hin zu inapparenten Fällen zeigen sich dagegen bei Schaf und Ziege (Donaldson und Sellers, 2000; Alexandersen et al., 2002; Hughes et al., 2002). Während adulte Tiere i.d.R. überleben, kann in Saugkälbchen, Lämmern oder Ferkeln die Mortalität bis zu 100% betragen.

Das an MKS erkrankte Tier scheidet den Erreger mit der Flüssigkeit aufgeplatzter Blasen sowie mit Speichel, Ausatemluft, Milch und Dung aus. Ein Schwein verbreitet mit der Atemluft u. U. über 1000-fach mehr MKS-Viren als ein Rind (Donaldson et al., 2001). Es kann pro Stunde bis zu 100 Millionen infektiöse Viren ausatmen. Die Minimal infektiöse Dosis für das Rind über den respiratorischen Weg beträgt 10-25 KID₅₀ (Gibson und Donaldson, 1986; Donaldson, 1987, Suttmoller und Vose, 1997; Donaldson und Alexandersen, 2002; Alexandersen et al., 2003). Zu einer Aerosolübertragung kommt es für gewöhnlich innerhalb einer Herde und in deren unmittelbaren Nachbarschaft. Es gibt aber auch Beispiele einer "airborne" Transmission über viele Kilometer (Gloster, 1982). Ein weiterer Transmissionweg ist die orale Aufnahme über kontaminiertes Futter oder Wasser, Fütterung von Resten tierischer Lebensmittel (*swill feeding*). Weitere Verbreitungspfade sind Sperma bei der natürlichen oder künstlichen Befruchtung) sowie biologische Produkte, z.B. minderwertige Impfstoffe mit nicht ausreichend inaktiviertem MKSV. Auch belebte Vektoren wie Menschen, Vögel, diverse Ektoparasiten sowie unbelebte Objekte (engl. *Fomites*), wie Stallausstattungsgegenstände, Arbeitskleidung, Schuhwerk und veterinärmedizinische Materialien spielen eine Rolle bei der Übertragung der MKS.

Die eine „typische“ Verlaufsform der MKS gibt es nicht (Kitching, 1998). Auch werden nicht alle infizierten Tiere klinisch krank. Einige zeigen keine erkennbaren klinischen Anzeichen, während andere deutlich erkranken, manchmal obwohl sie Antikörper durch eine Impfung oder vorhergehende Infektionen besitzen. Es bestehen Alters-, Rasse-, Spezies-, Stallsystem-, Management bedingte Unterschiede im Krankheitsverlauf. Außerdem beeinflusst der Virusstamm den Seuchenverlauf (Orsel et al., 2009). Beispielsweise verursachen einige Schweine-adaptierte Isolate des MKS Serotypes O (O Taiwan 1997) keine oder nur milde Symptome in Rindern (Yang et al., 1999). Epidemiologische Modelle können einen Ausbruchverlauf nur bedingt simulieren (Alexandersen und Gloster, 2004).

Von allen Tierseuchen ist die MKS aus mehreren Gründen besonders gefürchtet. Die geringe minimale Infektionsdosis einerseits und die hochtitriger Virusausscheidung (Alexandersen et al., 2003; Orsel et al., 2009) andererseits tragen zur der hohen Kontagiosität bei. Tiere können bereits Stunden, eventuell Tage, vor dem Auftreten klinischer Anzeichen im Speichel, in Fäzes und Milch das MKSV ausscheiden. Daher können infizierte, noch klinisch inapparente Tiere die Krankheit sehr effektiv übertragen. Zudem existieren bei der MKS subklinische Infektionen sowie Dauerausscheider (*Carrier*), die das Virus über Monate bis Jahre unerkant beherbergen. Ein weiterer Grund für die wirtschaftliche Bedeutung der MKS ist die große Zahl empfänglicher Spezies.

Die enormen Anstrengungen und Kosten einer MKS-Bekämpfung infolge eines Ausbruches (Alexandersen et al., 2002b) sind neben den psychologischen und wirtschaftlichen Schäden der *stamping out* Politik eine schwere Last für jedes betroffene Land (Selbitz und Bisping, 1995; Mort et al., 2005).

Die MKS-Erkrankung gilt als eine der wirtschaftlich bedeutensten Tierseuchen (Selbitz und Bisping, 1995; Kramer et al., 1997; Woolhose und Donaldson, 2001; James und Rushton, 2002).

Es sind nicht allein die direkten Auswirkungen der natürlichen MKS-Infektion für das betroffene Klautier, wie Wachstumsverminderung, erhöhte Abortrate, verzögerte Konzeption, Milchrückgang, die den Gewinn und die Qualität der tierischer Erzeugnisse mindern, sondern auch die direkten Auswirkungen auf den stark eingeschränkten oder total unterbundenen Exporthandel (Wooldridge et al., 2006). Im Vereinigten Königreich wurden 2001 über 4 Mio. Klautiere, die direkt von der Seuche betroffen waren, und mehr als 2 Mio. Tiere, die aufgrund der Handelsrestriktion und als Seucheneindämmungsmaßnahme („Schlachtung aus Tierschutzgründen“) nicht verwertet werden konnten, getötet (Haas, 2001b; Anonymous/DEFRA/DCMS, 2002). Der geschätzte Produktionsausfall betrug 525

Mio. £ (britische Pfund) (Thompson et al., 2002). Wenn man die nachfolgenden Umsatzabsatzeinbrüche, Steuerausfälle in der Landwirtschaft und die Nahrungsmittelindustrie mit einbezieht sind es ca. 3,1 Milliarden £ (Thompson et al., 2002). Auf ca 3 Milliarden £ Verluste aufgrund dieses ca. 6 monatigen Tierseuchenausbruches werden die Verluste in der Tourismusindustrie geschätzt (Thompson et al., 2002).

Neben den entstehenden wirtschaftlichen Schäden kommt auch ein langfristiger Imageschaden hinzu, für die Produkte der betroffenen Landwirtschaft und die Tourismusindustrie im In- und Ausland erleiden würden.

2.6 Immunologie

Der Schutz gegen die MKS wird im Wesentlichen durch die humorale Immunantwort vermittelt (McCullough et al., 1992a und 1992b). Hierbei dürfte weniger die in-vitro messbare eigentliche Neutralisation durch Serumantikörper als die Opsonisierung der entscheidende Mechanismus sein (McCullough et al, 1992b). Im Serum lassen sich MKS-spezifische Antikörper etwa 5-8 Tage nach einer Infektion nachweisen (Hamblin et al. 1986) und sie können vielfach bereits zu diesem Zeitpunkt die Virusvermehrung unterdrücken. Die Immunantwort erfolgt auch bei der MKS in mehreren Phasen. Zuerst werden die relativ breit reagierenden Antikörper der Klasse IgM (Immunglobulin M) in Plasmazellen gebildet und freigesetzt. Dann folgen Antikörper der Klasse IgG (Immunglobulin G) welche stärker subtyp- oder sogar stammspezifisch sind (Abu Elzein und Crowther, 1981; Cowan, 1973). Zwischen den klinisch nicht unterscheidbaren Serotypen besteht allenfalls nach multiplen Infektionen eine sehr geringe Kreuzprotektion und selbst zwischen verschiedenen Subtypen bzw. Topotypen innerhalb eines Serotyps besteht nur ein begrenzter Kreuzschutz (Cottral und Gailiunas, 1972; Black et al., 1986; Thomson et al., 2001; Domingo et al., 2002).

Während infizierte Tiere i.d.R. für Jahre, eventuell lebenslang, gegen eine Reinfektion mit dem gleichen Isolat geschützt sind, ist für einen lang anhaltenden Impfschutz eine mehrfache Revakzination erforderlich (Doel, 2005).

Aufgrund der seit Jahrzehnten erfolgreich praktizierten Impfung gegen die MKS und der beim Rind recht guten Korrelation zwischen dem Schutz gegen klinische Krankheitszeichen und dem Antikörpertiter im Serum (Pay und Hingley, 1987; Ahl et al., 1990; Goris et al., 2008) wird vielfach angenommen, die Immunreaktion auf eine MKS-Infektion oder MKS-Impfung sei im Wesentlichen aufgeklärt. Jedoch ist, im Gegensatz zur humoralen Immunantwort, die Rolle der T-Zell-vermittelten Immunreaktion und ihre Funktion bei der

Induktion einer schützenden B-Zellantwort in natürlicherweise empfänglichen Spezies bisher nur ansatzweise verstanden. Die meisten Arbeitsgruppen verwendeten synthetische Peptide oder Proteinfragmente aus den Strukturproteinen des MKSV um T-Zellepitope zu definieren (Gerner et al., 2009). Während die B-Zellantwort i.d.R. von der T-Helferzellantwort abhängt, wurde vor kurzem gezeigt, dass es beim Rind gegen bestimmte Epitope der Strukturproteine des MKSV auch eine T-Zellunabhängige B-Zellantwort gibt (Juleff et al., 2009). In Bezug auf die Rolle der dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC), die sowohl bei unspezifischen wie bei der unspezifischen Immunantwort eine Rolle spielen, ergibt sich bei der MKS bisher noch kein klares Bild (Summerfield et al., 2009). Es gibt Daten, dass DC mit MKSV infizierbar sind ohne lysiert zu werden und in der Folge die plasmazytoiden DC IFN- α produzieren (Guzylack-Piriou et al., 2006). Die Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellpopulation bei der MKS ist ebenfalls noch unklar (Juleff et al., 2009). Die zur spezifischen Lyse befallener Zellen befähigten zytotoxischen T-Zellen („T-Killerzellen“) scheinen bei der MKS insgesamt jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Wie bei den meisten Krankheiten bietet auch bei der MKS die angeborene unspezifische Immunantwort u.U. einen zwar prompten, aber nur kurzzeitigen Schutz. Der Beitrag der einzelnen Bestandteile der unspezifischen Immunantwort zu diesem Schutz ist noch wenig verstanden. Hinweise gibt es insbesondere für eine Rolle der Makrophagen, der Dendritic cells und wohl auch der NK Zellen (Summerfield et al., 2009). Die Infektion durch MKSV wird durch Typ I Interferon (*IFN*) wirksam unterdrückt (Ahl und Rump, 1976, Chinsangaram et al., 2001 und 2003). Dies lässt sich auch praktisch nutzen (Chinsangaram et al., 2003). Experimente von Parida et al., 2006, sprechen für eine Rolle des *IFN*- γ bei der Immunantwort gegen die MKS. Zu den Mechanismen, mit denen sich das MKSV der Immunantwort zu entziehen versucht gehört die Hemmung der *IFN*- β Induktion und der Translation in der Wirtszelle. (Grubman et al., 2008).

T. Doel konstatierte 2005, dass grundsätzliche Fortschritte in der Vakzineentwicklung ein besseres Verständnis der Immunantwort erfordern. Dies gilt insbesondere für das Schließen der Lücke zwischen Impfstoffapplikation und dem Beginn des Schutzes, für die Erzielung einer lebenslangen oder einer wesentlich breiteren Schutzwirkung und für die Ablösung der inaktivierten *I46S* Vakzine durch neuartige thermostabile Impfstoffe, die keinen Umgang mit infektiösem MKSV mehr erfordern. Die Ergebnisse der hauptsächlich auf die T-Zellabhängigkeit der Immunantwort und auf wichtige B- und T-Zellepitope konzentrierten immunologischen Forschung wurden genutzt, um eine Vielzahl neuartiger Vakzinen zu entwickeln - ohne dass diese Bemühungen bisher zu Impfstoffen geführt hätten, die guten

kommerziellen Standardvakzinen überlegen sind. Die begrenzten Erfolge der meisten Ansätze für Subunit- und insbesondere Peptidvakzinen deuten darauf hin, dass zur Erzielung eines guten Schutzes dem Immunsystem die MKSV-spezifischen Epitope auf der Oberfläche geeigneter Partikel präsentiert werden sollten. Der sich vor allem an den immunologisch relevanten Proteinabschnitten zeigende starke Polymorphismus des MKSV („MKS als Quasispezies“, Domingo et al., 1990) betrifft nicht nur lineare und kontinuierliche, sondern auch konformative und diskontinuierliche Epitope, die mit Peptidimpfstoffen schwer oder gar nicht nachzubilden sind. Andererseits besteht bei der T-Zell-Immunantwort eine hohe Variabilität der einzelnen Wirtsindividuen. Eine T-Helfer-Zelle erkennt in der Regel ein bestimmtes antigenes Peptid nur in Zusammenhang mit einem bestimmten MHC-II-Molekül (*Major Histocompatibility Complex, MHC*) und jedes Individuum exprimiert davon seinen eigenen Satz (MHC-Polymorphismus) - was die oftmals individuell sehr verschiedenen T-Zell –Antworten auf Peptidimpfungen erklärt. Am besten scheint die Präsentation der relevanten Epitope des MKSV auf anderen Partikeln als inaktivierten MKS-Viren bisher noch der Arbeitsgruppe um M. Grubman in den USA gelungen zu sein (Mayr et al., 2001; Moraes et al., 2002; Pacheco et al., 2005).

2.7 Labordiagnostik

Erste Priorität in der MKS Diagnostik haben die Feststellung von Primär- sowie Sekundärausbrüchen, um keine Zeit bis zum Einleiten der Keulungs- und Sperrmaßnahmen zu verlieren. Anschließend folgt die Charakterisierung des isolierten Virus, um ggf. Empfehlungen für einen Impfstoff abgeben zu können.

2.7.1 Probennahme

Der Nachweis von infektiösem MKSV bzw. MKSV-Antigen und virusspezifischer Nukleinsäure gelingt am sichersten in Aphthenlymphe sowie Aphthendeckenmaterial frischer Aphthen. Soweit möglich, sollte von mehreren Tieren ein mindestens briefmarkengroßes Stück Aphthendecke gewonnen werden. Sind keine geschlossenen Aphthen mehr vorhanden, ist Material am Übergang zum gesunden Gewebe zu entnehmen und dieser Bereich mit Tupfern zu beproben. Der klassische Puffer zur Konservierung des MKSV besteht aus Phosphat-gepufferter Salzlösung (*PBS*, pH 7,2 bis 7,6, plus 50 % Glycerin), aber auch Zellkulturmedien sind verwendbar (Ahl et al., 1996).

Beim völligen Fehlen von Aphthenbildung kann versucht werden, MKSV auch aus Speichel oder notfalls auch Nasentupferproben zu isolieren, die möglichst mit Gazetupfern (im Verbandsmaterialhandel als *Pagaslings* zu beziehen) zu nehmen sind. Nach Ablauf der ersten Woche nach der Ansteckung ist die Wahrscheinlichkeit einer Virusisolierung in Nasenschleimproben nur noch gering. Bis dahin sind jedoch bereits Antikörper zu erwarten. Blutproben (Serum oder *EDTA*, möglichst kein *Heparin*) dienen insbesondere dem Nachweis von Antikörpern. Insbesondere bei kleinen Wiederkäuern können Blutproben auch zum Virusnachweis eingesetzt werden. Schafe und Ziegen zeigen vielfach keine typischen MKS-Symptome, daher sind von diesen Tieren stets auch Blutproben (und Nasentupferproben oder *Probangproben*) einzusenden. Es sollten möglichst Röhrchen ohne Gerinnungshemmer verwandt werden, weil die serologischen Tests mit Serum und nicht mit Plasma validiert wurden, zudem können Gerinnungshemmer Probleme in der Zellkultur und im Falle von Heparin auch in der PCR hervorrufen. Blutproben dienen in erster Linie dem Nachweis von Antikörpern. Insbesondere bei kleinen Wiederkäuern können Blutproben auch zum Virusnachweis eingesetzt werden.

Eine Virusisolierung längere Zeit nach einem Ausbruch gelingt unter Umständen aus Rachenschleim. Mit einem speziellen Entnahmegerät werden Rachenschleimproben (*Probangproben*) aus dem Pharyngealraum und dem oberen Abschnitt des Oesophagus genommen. Die zur Untersuchung benutzten Geräte sind möglichst zwischen zwei Tieren mit einer organischen Säure (z.B. 5% Essigsäure oder 2 % Zitronensäure) zu desinfizieren und dann gut mit klarem Wasser zu spülen. MKS-Virus ist in *Probangproben* nur in tiefgefrorenem Zustand lagerbar. Die Proben sind daher nach Möglichkeit in gasdichten Röhrchen auf CO²-Eis per Kurier einzusenden. *Probangproben* dienen insbesondere nach einer MKS-Epidemie oder bei Handelsuntersuchungen in Impfländern der Erkennung von klinisch gesunden Virusträgern (Carriertieren).

Liegen Verdachtsmomente bei getöteten oder verendeten Tieren vor, können auch Organe (veränderte Teile von Zunge, Maulschleimhaut, Klauen, Euter, Herz, Pansenpfeiler) in dicht verschlossenen Behältnissen und gekühlt als Probenmaterial eingesandt werden.

2.7.2 Erregernachweis

Es ist in den Länderlaboren möglich eine MKS-PCR zu machen. Die abschließende Labordiagnostik der MKS sowie die differentialdiagnostische Abklärung findet in Deutschland im nationalen Referenzlabor (NRL) für MKS am Friedrich-Loeffler-Institut,

Insel Riems, statt. Nach der offiziellen Feststellung des Ausbruchs der MKS ist das isolierte Virus zu charakterisieren, um ggf. Empfehlungen für einen Impfstoff abgeben zu können.

2.7.2.1 ELISA zum Nachweis von MKS-Antigen

Die schnellste Methode der MKS-Labordiagnostik ist der Antigen-*ELISA* zum Nachweis von MKS-Antigen in Aphthenflüssigkeit und Aphtendecken sowie in Zellkulturüberständen. Er wird in Verdachtsfällen stets mit der Virusanzüchtung und der PCR kombiniert. Etwa 80 % aller MKS-Proben, aus denen in der Zellkultur MKS-Virus isoliert werden kann, reagieren bereits im *ELISA* positiv. (Roeder und Le Blanc Smith, 1987).

2.7.2.2 Virusnachweis in der Zellkultur

Der Virusnachweis dient hauptsächlich zur Abklärung klinischer Verdachtsfälle. Der Zeitbedarf beträgt, je nach Zelllinie, mind. 1 - 3 Tage bis zum Auftreten eines zytopathogenen Effekts, dann folgt eine Virusvermehrung zur Identifizierung und Typendifferenzierung. Im NRL werden folgende permanente Zelllinien verwendet: Fetale Ziegenzungenzellen (*ZZ-R127*), Babyhamsterkidneyzellen (*BHK-21/CT*) und Schweinenierenzellen (*IB-RS-2*) (Ahl et al., 1990).

Obwohl der MKS-Nukleinsäurenachweis mittels real-time RT-PCR die Virusisolierung auf Zellkultur für diagnostische Zwecke teilweise abgelöst hat, ist es auch heute noch notwendig, ein Ausbruchsvirus möglichst rasch anzuzüchten. Dies ist insbesondere dazu erforderlich, um eine Empfehlung zu ggf. einsetzbaren Impfstoffen aus der nationalen bzw. EU Vakzinebank abgeben zu können - aus den Nukleinsäuresequenzen ist der mögliche Kreuzschutz durch einen vorhandene Impfstamm gegen ein neues MKS-Isolat bisher noch nicht befriedigend vorherzusagen. Das MKS-Virus ist zwar in frischem Aphthenmaterial in hoher Konzentration vorhanden, oft erhält das Labor aber nur älteres Material oder Proben wie Speichel oder Rachenschleim mit weit geringerem Virusgehalt. Deshalb ist eine hochsensitive Zellkultur, wie die Fetale Ziegenzungenzelle (*ZZ-R 127*), unverzichtbar.

2.7.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Um zusätzlich zur Zellkultur eine zweite, schnellere Methode mit gleicher oder höherer Empfindlichkeit zum Nachweis einer MKS-Infektion zur Verfügung zu haben, wurde eine typunabhängige real-time RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (*real-time RT-PCR*) etabliert, welche virusspezifische Nukleinsäure in den Probenarten nachweisen kann. Um möglichst alle MKS-Stämme zu erfassen, wurden am FLI für diese PCR zwei Abschnitte aus dem Nicht-

Strukturbereich ausgewählt, welche für Isolate aus allen 7 Serotypen weitgehend identisch sind (IRES und 3D).

Eine weitere Anwendung der PCR ist die Amplifikation des für die Strukturproteine kodierenden Genombereichs (Hoffmann et al., 2009).

Das Produkt wird anschließend sequenziert, um aus dem Vergleich mit den Sequenzen bekannter Isolate Aussagen zur verwandschaftlichen Einstufung und zur möglichen Herkunft des Virus ableiten zu können.

2.7.3 Serologie

Serologische Untersuchungen werden zur Abklärung klinischer Verdachtsfälle durchgeführt, sowie um bislang nicht erkannte Infektionen zu entdecken. Im Rahmen von Handelsuntersuchungen wird die Serologie eingesetzt um zu bestätigen, dass Tiere weder infiziert noch geimpft sind. Ein weiteres Einsatzfeld ist die Überprüfung der Wirksamkeit einer Impfung. Moderne serologische Verfahren erlauben mit gewissen Einschränkungen auch die Unterscheidung infizierter und lediglich geimpfter Tiere in der sogenannten *DIVA* Diagnostik (van Oirschot, 1999).

2.7.3.1 Nachweis von Antikörpern gegen Strukturproteine

Zum Nachweis von Antikörpern gegen Strukturproteine (SP) sind der ELISA und der Virusneutralisationstest (VNT) geeignet.

Liquid-Phase-Blocking ELISA (LPBE) und Solid- Phase Competition ELISA (SPCE)

Es gibt zurzeit zwei weltweit verwendete und im Diagnostic Manual des Internationalen Tierseuchenamtes (*OIE*) beschriebene ELISAs zum Antikörpernachweis, den Liquid-Phase-Blocking ELISA (*LPBE*) (Hamblin et al., 1986, Lunt et al., 1994) und den Solid-Phase-Competition ELISA (*SPCE*) (Paiba et al., 2003).

Virusneutralisationstest (VNT)

Der VNT dient zum Nachweis von Antikörpern (Ak) gegen Strukturproteine des MKSV. Verwendet werden hierfür Seren (ausnahmsweise Plasma) zum Zweck der Untersuchung von Verdachtsfällen, im Rahmen von Import-/Exportuntersuchungen, zur Impfstoffprüfung und zu wissenschaftlichen Zwecken. Er wird meist ergänzend zum LPBE als Bestätigungstest eingesetzt. Im Mikroneutralisationstest können Ak aufgrund ihrer Fähigkeit nachgewiesen werden, das Auftreten eines zytopathogenen Effektes (*ZPE*) zu verhindern, wenn sie mit

Virus von bekanntem Titer inkubiert und dann mit MKSV-sensitiven Zellen gemischt werden. Der Serumtiter ist definiert als Kehrwert derjenigen Serumverdünnung, welche in 50% der Testobjekte (Vertiefungen einer 96-Well Zellkulturplatte mit *BHK-21-CT* Zellmonolayer) bei Inkubation mit ca. 100 KID₅₀ pro Well die Ausprägung eines ZPE verhindert (Anonymous, 2008b).

2.7.3.2 Nachweis von Antikörpern gegen Nicht-Strukturproteine (NSP)

Neue Aufgaben für die Serologie ergeben sich aus der Möglichkeit, infizierte von lediglich geimpften Beständen zu unterscheiden. Entscheidend dafür ist, dass heutige inaktivierte MKS-Vakzinen Antikörper praktisch nur gegen die Strukturproteine des Virus (SP) erzeugen, während infizierte Tiere auch Antikörper gegen Nicht-Strukturproteine (NSP) ausbilden. Diese können durch geeignete Tests nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass schon die vorhandenen Impfstoffe in einem gewissen Sinn als Markerimpfstoffe betrachtet werden können. Der Einbau eines die Impfung beweisenden Positivmarkers in die Vakzine würde wenig nützen, da das Hauptproblem die Tiere sind, welche geimpft und unbemerkt infiziert wurden. Lediglich das Fehlen eines Infektionsmarkers, etwa der Antikörper gegen NSP, ist im Prinzip als Beweis geeignet, dass ein Tier nicht infiziert wurde. Leider kann die Immunantwort gegen Nicht-Strukturproteine bei geimpften und dann symptomlos infizierten Tieren gelegentlich auch ausbleiben, sodass dieser Untersuchungsansatz nur als Herdentest geeignet ist (Haas, 2001a; Brocchi et al., 2006). Diese Schwachstelle kann deshalb nicht vernachlässigt werden, weil auch geimpfte und dann virusexponierte Wiederkäuer häufig zu Virusträgern und -ausscheidern (*Carrier*) werden. Da einige dieser Virusträger in den Tests auf AK gegen NSP negativ reagieren, ist damit zu rechnen, dass geimpfte Tierpopulationen trotz Testung zunächst nicht frei gehandelt werden können. Es steht außer Frage, dass das von Carriertieren ausgeschiedene Virus für andere empfängliche Tiere infektiös ist, auch wenn das von einem einzelnen *Carrier* ausgehende Risiko wegen der niedrigen ausgeschiedenen Virustiter sehr gering ist (Tenzin et al., 2008).

Die nur durch eine Infektion, aber nicht durch moderne, gereinigte Vakzinen induzierten Antikörper gegen Nichtstrukturproteine (NSP) können mittels ELISA, z.B. dem „3ABC-trapping-ELISA“ (De Diego et al., 1997), dem *Ceditest/Priocheck FMDV-NS®* (Sorensen et al., 1998) und dem *SVANOVIR™ FMDV 3ABC-Ab ELISA®* (Persson et al., 2004) detektiert werden.

Da die Untersuchung auf Antikörper gegen NSP ein mehrere Tiere umfassendes, unbemerktes Seuchengeschehen in einer geimpften Rinderherde aufdecken kann, sollte es möglich sein,

praktikable Regelungen zur Nutzung von Tieren zu finden, welche im Rahmen einer Ringimpfung, also außerhalb der eigentlichen Infektionszone geimpft wurden. Dort ist das Risiko, dass sie zu Virusträgern werden, wesentlich geringer als in der Infektionszone. Für die dort im Rahmen einer Suppressionsimpfung vakzinierten Tiere wären jedoch an die Verlässlichkeit der Testung andere und bisher nicht erfüllbare Ansprüche zu stellen - was bedeutet, dass sie getötet werden müssen. Eine virologische oder *PCR*-Testung der gesamten Population ist bisher weder möglich noch würde sie im Fall negativer Ergebnisse den sicheren Schluss auf das Nichtvorhandensein von Virusausscheidern zulassen. Die Virusausscheidung erfolgt nicht kontinuierlich, sondern intermittierend, sodass das Virus oft über längere Zeit nicht nachweisbar ist (Prato Murphy et al., 1994).

2.8 Bekämpfung der MKS

2.8.1 Bekämpfungsmaßnahmen und OIE-Regelungen

Für eine rasche Tilgung der MKS müssen Verbringungsverbote, Keulungen betroffener Bestände und ggf. Impfungen miteinander kombiniert werden. In endemisch verseuchten Ländern kann versucht werden die Seuche über einen längeren Zeitraum durch eine Kombination aus regelmäßigen Flächenimpfungen, diagnostischen Untersuchungen und Verbringungsverböten zu tilgen.

Durch die Zunahme, Beschleunigung und Liberalisierung von Handel und Reiseverkehr sind die Bedingungen für eine Wiedereinschleppung der MKS und einer explosive Ausbreitung in Europa und damit auch in Deutschland jederzeit gegeben. In der Europäischen Union (EU) wird ihre Bekämpfung durch die Richtlinie 2003/85 EG geregelt, in der Bundesrepublik Deutschland durch die MKS-Verordnung in der jeweils geltenden Fassung (Anonymous, 2005. Bekanntmachung der Neufassung der MKS-Verordnung, 20. Dezember 2005). Schutzimpfung gegen die MKS sowie Heilversuche an seuchenkranken und verdächtigen Tieren sind seit dem 1.1.1992 in der EU verboten.

In Europa werden im Ausbruchsfall Restriktionsgebiete (Sperrbezirke = 3 km, Beobachtungsgebiete = 10 km) eingerichtet. Zusätzlich erfolgen Kontrolle von Transportfahrzeugen, Straßen- und Autobahnkontrollen sowie Kontrollen an Grenzen (Landgrenzen, Häfen, Flughäfen) zur Verhinderung des illegalen Tierhandels und Tierverkehrs. Die Seuche kann durch eine Keulung des MKS-Bestandes sowie der Kontakt-

und Umgebungsbestände ohne Impfung bekämpft werden, wenn die Ausbruchssituation überschaubar ist oder wenn eine Impfung nicht möglich ist. Die Impfung erlaubt es aber u.U. die Seuche rascher und mit geringeren Tierverlusten zu tilgen. Der Einsatz der Impfung in der MKS-Bekämpfung kann in folgender Weise erfolgen: Keulung und Suppressivimpfung (2.8.2.2 Verweis zu Impfstrategien) oder Keulung und Ringimpfung mit oder ohne Suppressivimpfung im eigentlichen Ausbruchsgebiet.

Die zuständige oberste Landesbehörde kann die Notimpfung mit Genehmigung der Kommission der Europäischen Gemeinschaft anordnen, um die Verbreitung des MKS-Ausbruches im Land, in einen EU Mitgliedstaat oder ein Drittland zu verhindern. Zum Zwecke der Erlangung dieser Genehmigung erstellt die oberste Landesbehörde einen Impfplan. Die Kriterien für die Impfscheidung sind nachzulesen im Anhang X der Richtlinie 2003/85/EG. Die rechtlichen Grundlagen zur Impfung sind festgehalten im Abschnitt 8, Art. 49 ff.

Die Kriterien für eine Impfscheidung sind von mehreren Faktoren abhängig: der Populationsdichte der empfänglichen Tiere, den betroffenen Spezies, dem Verbringen potentiell infizierter Tiere und/oder Produkte aus der Schutzzone heraus, der vorhergesagten Verbreitung des Virus aus einer infizierten Tierhaltung über die Luft (*airborne spread*), der Verfügbarkeit eines passenden Impfstoffes, dem Verlauf des Ausbruches (Zurückverfolgbarkeit, Inidenzkurve, geografische Verteilung), der Reaktion der Öffentlichkeit gegenüber der Keulung aller Klautiere im betroffenen Gebiet (*total stamping out policy*), der Akzeptanz der Regionalisierung infolge der Impfung, der ökonomischen Bewertung der Kontrollstrategien, der Durchsetzbarkeit der 24/48 Stunden Keulungsregel, den sozialen und psychologischen Folgen des „*total stamping out*“ sowie der Existenz von Großbetrieben mit Klautierintensivhaltung.

Vom internationalen Tierseuchenamt (*OIE*) wird die MKS im „*Terrestrial Animal Health Code*“ im Kapitel 2.1.1.1. unter den anzeigepflichtigen Tierseuchen als „multiple species disease“ aufgeführt (Anonymus, 2008c). Das Kapitel 2.2.10. regelt die Bedingungen, welche erfüllt werden müssen, um den Status „MKS-frei“ zu erhalten.

Man unterscheidet dabei:

- MKS-freies Land, in dem keine Impfungen stattfinden,
- MKS-freies Land, in dem Impfungen stattfinden,
- MKS-freie Zone, in der keine Impfungen stattfinden,
- MKS-freie Zone, in der Impfungen stattfinden und
Land oder Zone, wo die MKS vorkommt.

Im Folgenden sind die Bedingungen dafür genauer dargestellt:

MKS freies Land ohne Impfung/impffreie Zone

(Art. 60, RI 2003/85/EG: Wiedererlangen des Seuchenfreiheitsstatus nach Tilgung der Maul- und Klauenseuche ohne Notimpfung)

Für den Status „MKS freies Land ohne Impfung/impffreie Zone“ müssen folgende Bedingungen erfüllt sein: Kein Ausbruch während der letzten 12 Monate und kein Nachweis einer MKSV Infektion während der letzten 12 Monate. Keine Vakzination gegen MKS während der letzten 12 Monate und keine Importe von vakzinierten Tieren nach der Einstellung der Vakzination. Dieser Statusnachweis erfolgt durch serologische Überwachung (Surveillance).

MKS freies Land/Zone mit Impfung

(Art. 61, RI 2003/85/EG: Wiedererlangen des Seuchenfreiheitsstatus nach Tilgung der Maul- und Klauenseuche mit Impfung)

Für den Status „MKS freies Land/Zone mit Impfung“ müssen folgende Bedingungen erfüllt sein: Kein Ausbruch von MKS während der letzten 24 Monate und kein Nachweis von MKSV während der letzten 12 Monate. Der Statusnachweis erfolgt durch serologische Überwachung (Surveillance). Die Anforderungen an die zu verwendende Vakzine sind im *OIE Terrestrial Manual* (Anonymous, 2008b) beschrieben.

Wiedererlangen des Status der MKS-Freiheit

Die Wiedererlangung des Seuchenfreiheitsstatus nach einem Seuchenfall kann bereits 3 Monate nach der Schlachtung/unschädlichen Beseitigung aller Klautiere in infizierten Herden (stamping out) und der serologischen Überwachung (Surveillance) der Umgebung erfolgen, wenn keine MKS-Impfung vorgenommen wurde oder wenn alle geimpften Tiere getötet wurden. Falls die geimpften Tiere weiter genutzt wurden, dauert die Wiedererlangung der MKS-Freiheit nach einem Seuchenfall länger. Dann kann dieser Status frühestens 6 Monate nach dem letzten Fall bzw. nach der letzten Vakzinierung erreicht werden, vorausgesetzt, dass aufgrund umfangreicher serologischer Untersuchungen Infektionen in der Population ausgeschlossen werden können.

Maul- und Klauenseuchestatuskarte 2009

Die Verbreitung der MKS in 2009 zieht sich auf der Weltübersichtskarte (Abb.2) gürtelartig von Südamerika, über weite Teile Afrika und den Mittleren Osten sowie des asiatischen Teil der Türkei, bis hin zum indischen Subkontinent, weiter nach Indochina und in den Fernen Osten. Die Daten der Abbildung beruhen auf den der *OIE* gemeldeten Fälle. Um eine alternative, aktuelle Übersicht der gerade kursierenden MKS Isolate zu erhalten, empfiehlt sich die Seite des Weltreferenzlabores (*WRL*) *Molecular epidemiology reports* (http://www.wrlfmd.org/fmd_genotyping/index.html).

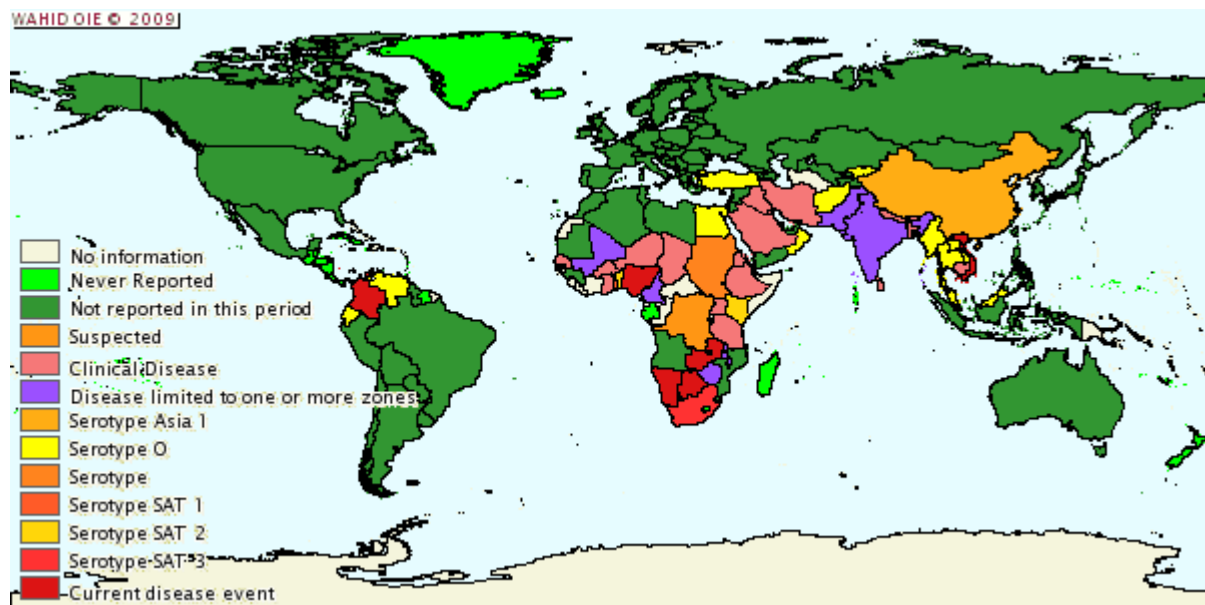


Abb. 2 (Quelle: <http://www.oie.int/wahis/public>)

2.8.2 MKS-Impfung

2.8.2.1 Geschichtlicher Überblick

Ein war ein weiter Weg von den ersten Bekämpfungsversuchen durch Unterstützung der Durchseuchung der Tierbestände, der sogenannten „*Aphthisation*“, (in Deutschland 1781 beschrieben, zitiert nach Röhrer und Olechnovitz, 1980), über die passive Immunisation (Kitt, 1886), die simultane Vakzination (Loeffler, 1898) bis zum ersten praktisch brauchbaren Impfstoff, der *MKS-Formol-Adsorbate-Vakzine* (Schmidt and Hansen, 1936; Waldmann and Köbe, 1938). Zu deren Herstellung mussten Rinder gezielt infiziert und geschlachtet werden, wovon ein erhebliches Verschleppungsrisiko ausging. Daher stellte die Entwicklung von zellkultur-basierten Impfstoffen einen erheblichen Fortschritt dar. In den Niederlanden gelang es Frenkel MKS-Impfstoffantigen in kultivierten Rinderzungenepithelien herzustellen

(Frenkel 1947). Sellers konnte MKS-Impfstoffantigen in Kälbernierzellen herstellen (Sellers, 1955). Die Vermehrung des MKSV in permanenten Zelllinien (Mowat and Chapman, 1962; Capstick et al. 1962) war die Voraussetzung für eine höhere Chargenkonstanz und die Erfüllung heutiger *GMP*-Anforderungen (Good Manufacturing Practice). Wegen der unbefriedigenden Zuverlässigkeit der Inaktivierung mit Formalin wurde diese durch ein Inaktivierungsverfahren auf der Grundlage von *binärem Ethylenimin* (*BEI*, *Aziridine*) ersetzt (Brown und Crick, 1959; Bahnemann, 1975). In der EU wurde die bis 1991 in vielen heutigen Mitgliedsländern übliche jährliche vorbeugende Flächenimpfung der Rinder eingestellt, weil die in Europa üblichen Stämme, nicht zuletzt mit Hilfe der Impfung, getilgt worden waren. Versuche zur Entwicklung von attenuierten Lebendimpfstoffen blieben erfolglos, wegen der großen Vielfalt von Stämmen, vor allem aber wegen der Gefahr der Reversion des Impfvirus in ein krankmachendes Agenz. (Müller, 2001). Heute wird in Industriestaaten inaktiviertes, gereinigtes und formulierungsfertiges konzentriertes Antigen in Vakzinebanken über Flüssigstickstoff gelagert. Weil das Virus der MKS nur durch einen adäquaten Impfstamm des entsprechenden Serotyps wirksam bekämpft werden kann, muss man den eingeschleppten Feldstamm identifizieren und charakterisieren (Doel, 2003, 2005). Eine prophylaktische Impfung gegen alle Stämme mit einem Impfstoff ist unmöglich.

2.8.2.2 Impfstrategien

Die Impfung gegen MKS kann als *vorbeugende Flächenimpfung* (Prophylaxe) oder als *Notimpfung* (im Sinne des Artikels 50 RI 2003/85/EG) durchgeführt werden. Die prophylaktische Flächenimpfung wird heute noch in vielen Entwicklungs- und Schwellenländern eingesetzt. Ein dauerhaft belastbarer Impfschutz durch inaktivierte Vakzinen erfordert eine mehrmalige Immunisierung. Bis zum Ende des zweiten Weltkrieges wurde in Europa eine *metaphylaktische Impfung* vorgenommen. Hierbei wurden, sobald erste MKS-Fälle aufgetreten waren, gefährdete Teilpopulationen geimpft. Heutzutage würde man in Europa die Impfung im Seuchenfall (beim Vorliegen der Voraussetzungen nach Artikel 51 RI 2003/85/EG) entweder als *Schutzimpfung* oder als *Suppressivimpfung* im Sinne des Artikels 53 durchführen. Nach einer Schutzimpfung können die Tiere weiter genutzt werden. Nach einer *Suppressivimpfung* müssen die geimpften Tiere getötet werden. Die *Suppressivimpfung* soll durch Verlangsamung bzw. Beendigung der Seuchenausbreitung die Möglichkeit zu einer geordneten Beseitigung der Tierkörper schaffen.

Bei einem Seuchenfall in Deutschland kann eine MKS *Notimpfung* von der zuständigen obersten Landesbehörde anordnet werden. Alle schutzgeimpften Tiere müssen sofort mit einer Ohrmarke mit „I.MKS“ gekennzeichnet werden. Wo dies nicht möglich ist, muss die Impfung im Rinderpass eingetragen werden (§16 Abs. 2 der MKS-VO vom 20. Dezember 2005). Der Zweck einer *Schutzimpfung* ist die Eingrenzung des Seuchenausbruchs. Hierbei wird man in der EU so vorgehen, dass der OIE Status „MKS freies Land ohne Impfung“ möglich rasch wieder erlangt werden kann. Bedingung hierfür ist eine serologische Untersuchung der Tierbestände in der betroffenen Region. In der Richtlinie des Rates 2003/85 ist vorgeschrieben, alle geimpften Tiere serologisch zu untersuchen, womit frühestens 30 Tage nach der Vakzination begonnen werden kann. Auch die Bestände in der Umgebung des Impfbereiches müssen untersucht werden, wobei ein Probenschlüssel anzuwenden ist, mit dem eine 5% Prävalenz innerhalb einer Herde mit 95% Sicherheit (Konfidenz) erkannt werden kann. Diese Untersuchungen würden in Deutschland die Untersuchungseinrichtungen der Länder („Veterinäruntersuchungsämter“) mit einem kommerziellen *ELISA* durchführen, der nicht nur die Infektion mit beliebigen Virusstämmen erkennt, sondern es auch erlaubt, infizierte Tiere in einer geimpften Population zu erkennen.

2.8.2.3 Heutige Impfstoffe

2.8.2.3.1 Herstellung

In westlichen Industriestaaten werden heute nur noch Impfstoffe eingesetzt, welche auf inaktivierten kompletten Viruspartikeln basieren. Diese werden nach ihrer Schwebbedichte in der Ultrazentrifuge auch als *I46S* Partikel bezeichnet. Heutige Impfstoffe werden nach dem folgenden Schema hergestellt:

Aus *Working* oder *Master Stock Virus* wird in permanenten Zelllinien (meist *BHK*) das MKS Virus vermehrt (Amplifizierung), danach werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation oder Filtration entfernt. Anschließend erfolgt die Inaktivierung mit *BEI*. Hierbei wird die Virussuspension nach einem ersten Inaktivierungsschritt in einen zweiten Behälter gepumpt um eine mögliche Rekontamination durch im ersten Schritt nicht inaktivierte Tröpfchen an der Behälterdecke zu verhindern (Bahnmann, 1990).

Im zweiten Behälter, der außerhalb des eigentlichen MKS-Sicherheitsbereiches steht, wird die Inaktivierung fortgesetzt, wobei einige Hersteller nochmals frisches *BEI* zufügen. Dieser Inaktivierungsprozess muss durch Prozesskontrollen (insbesondere Kontrolle der Inaktivierungskinetik) strikt überwacht werden, um ein sicheres Endprodukt zu erhalten.

Als letzter Schritt vor der Lagerung in flüssigem Stickstoff wird das Antigen gereinigt aufkonzentriert (Wagner et al. 1970, Barteling und De Leeuw, 1981). Manche Hersteller verwenden zu Reinigung chromatographische Verfahren. Die Konzentrierung kann z.B. mit einer *PEG*-Fällung erfolgen. Im Seuchenfall kann das konzentrierte Antigen innerhalb von 2 - 5 Werktagen zu einem fertigen Impfstoff incl. Adjuvanzien und Hilfsstoffen formuliert werden. Heute werden in Industriestaaten entweder *Doppelölemulsionsvakzine (DOE)* zur intramuskulären Injektion oder *Aluminiumhydroxid/Saponinvakzine (Al(OH)₃)* zur subkutanen Injektion eingesetzt. Bei Wiederkäuern können sowohl *Aluminiumhydroxid/Saponinvakzinen* als auch *DOE* Vakzinen verwendet werden. Bei Schweinen wird nur mit *DOE* Impfstoffen eine ausreichende Schutzwirkung erzielt (Doel, 2003, 2005). Ein MKS Impfstoff kann mehrere Antigene gegen unterschiedliche Serotypen oder unterschiedliche Stämme eines Serotyps enthalten. Üblich sind mono- bis quadrivalente Vakzinen. (Doel, 2003).

2.8.2.3.2 Wirksamkeit heutiger Impfstoffe

Eine MKS-Impfung, mit einem dem Feldvirus antigenetisch ähnlichen Impfstamm, kann klinische Ausbrüche verhindern oder zumindest stark reduzieren sowie durch verringerte Virusausscheidung geimpfter Tiere den Infektionsdruck senken. Eine geimpfte Population kann eine weitere der Ausbreitung der MKS verhindern oder stark reduzieren. MKS-Impfstoffe haben wesentlich zur Ausrottung der MKS in Europa und in weiten Teilen Südamerikas beigetragen.

2.8.2.3.3 Einsatz im Rahmen von DIVA-Strategien

Ursprünglich verstand man unter Marker-Vakzinen Deletionsmutanten des Wildtypvirus, die mit einem differenzierenden diagnostischen Test erfasst werden konnten. Der Begriff Marker- oder *DIVA-Vakzine (Differentiating Infected from Vaccinated Animals)* (van Oirschot, 1999) wird mittlerweile in einem erweiterten Sinn verwendet. Er umfasst heute auch *Subunitvakzinen* und *inaktivierte Vollvirusimpfstoffe* und sogenannte „*genetische DIVA-Vakzinen*“ (Pasick, 2004, Uttenthal et al., 2010) sofern diese eine Unterscheidung zwischen lediglich geimpften und infizierten Tieren zulassen. Man unterscheidet ferner Positiv- und Negativmarker, wobei letzteren der Vorzug zu geben ist. Positivmarker würden es zwar erlauben geimpfte Tiere als solche zu erkennen, nicht aber zu prüfen ob diese Tiere infiziert worden sind oder nicht.

Bei der MKS lässt sich das *DIVA*-Prinzip bereits mit den heute allgemein üblichen Impfstoffen realisieren. Bei einer MKS-Infektion werden zwei unterschiedliche Gruppen von Antikörpern gebildet - zum einen schützende Antikörper, die gegen die Strukturproteine gerichtet sind und zum anderen solche gegen die Nicht-Strukturproteine (*NSP*) (Abb.3). Da bei einer Schutzimpfung mit einem gereinigten inaktivierten MKS-Impfstoff keine Antikörper gegen die Nicht-Strukturproteine gebildet werden (diese wurden bei der Antigenreinigung eliminiert), ist eine serologische Unterscheidung zwischen lediglich geimpften und infizierten Tieren möglich.

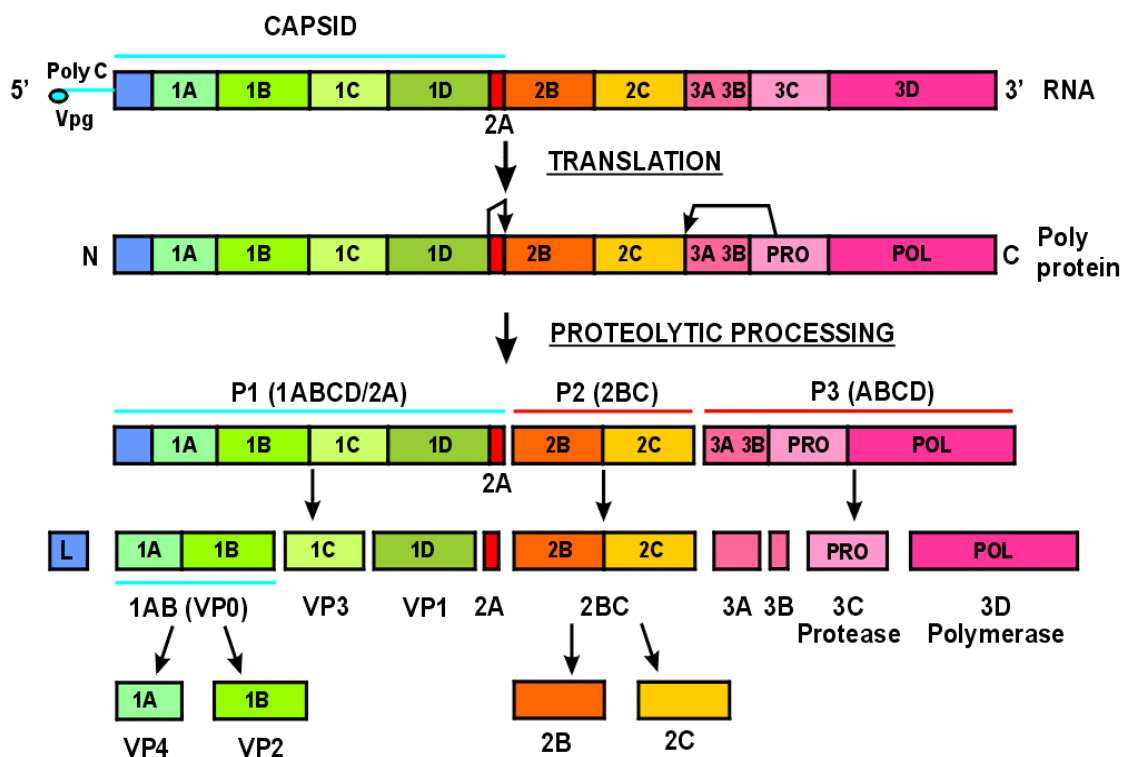


Abb.3: Haas modifiziert nach *CEVAN* (Centro de Virologia Animal, Buenos Aires, Argentinien).

Legende:

Strukturproteine VP1-4 grünfarben

NSP blau-, rot-, gelb-, organe- und rosafarben

Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung der *DIVA*-Strategie zur Tilgung der MKS sind die Programme in Südamerika für die Spezies Rind (Bergmann et al., 2004) und in Taiwan für die Spezies Schwein (Chung et al., 2003).

2.8.2.3.4 Grenzen heutiger Impfstoffe

Aktuell verfügbare Impfstoffe können weder eine lebenslange andauernde noch eine sterile Immunität erzeugen, d.h. es kann trotz Impfung zu einer Virusausscheidung kommen, die u. U. sehr lange anhält (*Carrier*). Zudem besteht eine zeitliche Lücke zwischen der Vakzination und dem Beginn des Impfschutzes, welche im Fall der MKS-Infektion je nach Bedingungen mit 5 bis 14 Tagen angegeben wird. MKS-Impfstoffe wirken nur innerhalb desselben Serotyps und auch das nur bedingt, d.h. sie erzeugen nur einen limitierten Kreuzschutz zwischen Stämmen eines Serotyps. Auch ihre Eignung als *DIVA*-Impfstoff ist begrenzt, weil die Nicht-Strukturproteine weniger immunogen sind als die Strukturproteine und deshalb manche geimpften und dann infizierten Tiere keine Antikörper gegen NSP ausbilden. Bei der MKS funktioniert das *DIVA*-Prinzip daher bisher nur auf Herdenbasis, während der Status eines Einzeltieres mit Antikörpern gegen Strukturproteine nicht sicher beurteilt werden kann. Ferner muss die Produktion heutiger MKS-Impfstoffe unter Hochsicherheitsbedingungen erfolgen und eine Leckage oder ein Fehler bei der Inaktivierung könnte einen Seuchenzug auslösen. Gegenwärtige MKS-Impfstoffe haben eine nur begrenzte Stabilität bei Raumtemperatur – ihr Einsatz erfordert eine lückelose Kühlkette, was in vielen Entwicklungs- und Schwellenländern Probleme bereitet (Parida, 2009).

2.8.2.4 Ansätze für neuartige Impfstoffe

2.8.2.4.1 Gentechnisch verbesserte MKSV-Lebendvakzinen

Man hat lange versucht einen Schutz durch Lebendvakzinen zu erreichen, die auf klassischem Wege durch Passagen in normalerweise nicht empfänglichen Spezies oder in Zellkultur attenuiert worden waren (Mowat et al., 1962a). Jedoch hat sich gezeigt, dass wirksame attenuierte Lebendimpfstoffe stets eine nicht akzeptable Restpathogenität für einige der empfänglichen Spezies besaßen (Mowat et al., 1962a und 1969b; Martin et al., 1965; Zhidkov et al., 1969). Außerdem besteht bei diesem Ansatz das Risiko der Reversion zum Wildtyp oder doch zu einem Virus mit ähnlicher Virulenz (Paton et al., 2009, Rodriguez, et al., 2009). Mit dem besseren Verständnis der funktionalen Genomik und den Möglichkeiten der *cDNA* Technologie ist es möglich, das Genom gezielt zu verändern und die so entstandenen Viren im Tierexperiment zu testen. (Rieder et al., 1993 und 1994). Ein möglicher Ansatz sind Leaderproteindeletionsmutanten. Das Leaderprotein (*Lpro*) ist eine virale Protease, welche die Translation in der Wirtszelle und die Interferoninduktion inhibiert. (Strebel et al., 1986; Devaney et al., 1988; de Los Santos et al., 2006 und 2007; Grubman et al., 2008).

Brown et al. stellten 1996 genetisch einen attenuierten A12 Serotype ohne die *Lpro*-kodierende Region (*A12-LLV2*) her. Dieser Proteinase-defiziente A12 Serotyp wurde im Rind und Schwein von Mason et al., 1997 und im Schwein von Chinsangaram et al., 1998a getestet. Im direkten Vergleich eines *Lpro*-defizienten Lebendimpfstoffes (*A12-LLV2*) mit einem inaktivierten A12 Impfstoff, zeigten sich eine gleichwertige Schutzwirkung in beiden Ansätzen (Chinsangaram et al., 1998a).

2.8.2.4.2 Gentechnisch verbesserte inaktivierte MKSV-Vakzinen

Um die Eignung von auf *I46S* Partikeln basierenden MKS-Impfstoffen für die *DIVA* Strategie zu verbessern, haben Fowler und Mitarbeiter mit gentechnischen Methoden den *G-H Loop* des Stammes *A₁₂I19* durch den eines anderen Serotyps ersetzt und daraus eine inaktivierte Vakzine hergestellt. Sie konnten nachweisen, dass dieser Impfstoff dennoch eine gute Schutzwirkung hatte und, wie erwartet, keine Antikörper gegen den ursprünglichen *G-H Loop* induzierte. In Seren von mit diesem experimentellen Impfstoff vakzinierten und dann mit Stamm *A₁₂I19* infizierten Tieren waren jedoch sehr rasch Antikörper gegen den in der Vakzine fehlenden *A₁₂I19 G-H Loop* nachweisbar. Weitere Forschungen sind erforderlich um zu prüfen, ob dieser Ansatz der der *NSP* Diagnostik überlegen ist (Fowler et al., 2008).

Weil nicht in allen Ländern eine stabile Kühlkette für Impfstoffe gewährleistet ist, wird auch mit gentechnischen Methoden an inaktivierten MKSV-Impfstoffen mit einer Stabilität bei Raumtemperatur gearbeitet (Mateo et al., 2008).

2.8.2.4.3 Empty capsid–Vakzinen

Einige MKS-Stämme bilden in der Zellkultur *leere Partikel* (*Empty capsids*). Diese *75S* Partikel sind ähnlich immunogen wie die *I46S* Partikel, enthalten jedoch keine Virus *RNS*. Diese Art der Impfstoffe präsentiert alle wichtigen immunogenen Komponenten des intakten Viruspartikels. Den leeren Kapsiden fehlt die infektiöse *RNS*, trotzdem sind sie genauso immunogen wie komplette Virionen (Rowlands et al., 1975; Rweyemamu et al, 1979; Doel und Baccarini, 1981; Abrams et al., 1995; Roosien et al., 1990; Lewis et al., 1991; Mason et al., 2003; Grubman et al., 2005; Li et al., 2008b; Cao et al., 2009). Aufgrund der ungenügenden Stabilität der *leeren Partikel* sind noch weitere Arbeiten an diesem System nötig (Curry et al., 1997, Rodriguez et al., 2009). *Empty capsids* können mittels verschiedener Expressionsysteme wie *E coli* (Grubman et al., 1993) und rekombinanten *Baculoviren* (Saiz et al., 1994) hergestellt werden. In einigen Ansätzen wurden eine Kombination aus dem leeren Kapsid und der die *3C Protease* (*3Cpro*) kodierenden Region (Vakharia et al., 1987;

Roosien et al., 1990; Lewi et al., 1991; Abrams et al., 1995) verwendet. Die 3C Protease ist zur Prozessierung des Kapsidprecursorproteins in die Strukturproteine *VP0*, *VP3* und *VP1* notwendig (Vakharia et al., 1987).

2008 verwendete Li et al. erstmals ein rekombinantes *Baculovirus*-Seidenraupenexpressionsystem mit einer Kassette, die das intakte P1-2A Protein und die 3C-Protease kodierenden Regionen des MKS-Asia enthielt. Vier von fünf mit Hämolymphe infizierter Seidenraupen inokulierter Rinder waren vor einer Testinfektion geschützt. Während bei den o.g. Empty capsid-Vakzinen im engeren Sinne die Kapside außerhalb des Tieres exprimiert wurden, können die leeren Partikel auch mittels rekomanter lebender Vektorvakzinen im Zieltier erzeugt werden. Diese Ansätze werden unter 0 „Rekombinante lebende Vektorvakzinen“ besprochen.

2.8.2.4.4 Protein-Vakzinen

Das MKS Kapsidprotein *VP1* stellt einen entscheidenden Teil der Virusoberfläche dar (Laporte, 1969, Rowlands et al., 1971). In Studien von Laporte et al. und Bachrach et al. konnte aus aufgereinigtem Virus isoliertes *VP1* neutralisierende Antikörper im Schwein induzieren (Laporte et al., 1973) und sowohl Schweine als auch Rinder gegen eine MKS-Testinfektion schützen (Bachrach et al., 1975). Bereits 1981 konnten Kleid et al. mit *VP1*, welches unter der Verwendung von *rekombinanter DNS* in *E. coli* hergestellt worden war, Schweine und Rinder gegen eine Testinfektion schützen. Weitere Studien mit Kombinationen von *B*- und *T-Zellepitopen* mit verschiedenen Expressionssystemen wie transgenen Pflanzen folgten (Wigdorovitz et al., 1999a, Wigdorovitz et al., 1999b, Taboga et al. 1997, Rodriguez et al., 2003). Insgesamt verliefen Schutzversuche mit Proteinimpfstoffen bisher enttäuschend.

2.8.2.4.5 Peptid-Vakzinen

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass auch Teilabschnitte des *VP1* eine neutralisierende Antikörperantwort induzieren können. Unter anderem wurden verschiedene Peptide getestet, welche die Regionen des variablen *G-H Loops* und die carboxyterminale Region des *VP1* mit *B-Zellepitopen* (Acharya et al., 1989) enthielten.

1982 synthetisierte Bittle et al. Peptide, die *B-Zellepitopregion* entsprechen. In ihren Versuchen erzeugten diese Peptide im Rind hohe Titer neutralisierender Antikörper und konnten Meerschweinchen gegen eine Testinfektion schützen.

In einer Studie von DiMarchi et al., waren 2 von 3 Rindern, die mit *VP1 B-Zellepitopregion* basierten Peptiden immunisiert worden waren geschützt. Die Arbeitsgruppe um A. Saalmüller

verwendete zur Identifizierung von T- und B-Zellepitopen überlappende synthetische Peptide, abgeleitet aus dem Polyprotein des MKSV (Höhlich et al. 2003a und b). 2008 untersuchten Greenwood et al. bei Schafen die Möglichkeit der Verwendung von synthetischen Peptiden konjugiert mit inerten Nano-Beads. Wang et al. verwendeten eine *VPI* Peptid basierte Vakzine mit T-Zellepitopen im Schwein. Diese Vakzine schützte 20 von 21 immunisierten Tieren gegen eine Belastungsinfektion mit O1 Taiwan (Wang et al., 2002 und 2003).

Für die in China für Schweine kommerziell angebotene Peptid-Vakzine, die auf einem *VPI* Fusionsprotein des *G-H Loops* in Verbindung mit einem T-Zellimmunogen basiert (Li et al, 2004), muss noch gezeigt werden, dass diese Peptid-Vakzine den konventionellen Vakzinen im Feld ebenbürtig ist (Paton et al., 2009). Der Vakzine fehlen wichtige MKS Hauptantigene. Bis dato konnte kein effektiver Schutz im Rind belegt werden.

2.8.2.4.6 DNS-Vakzinen

Auch mittels nackter *DNS* (engl. *naked DNA*) hat man versucht, eine schützende Immunantwort zu induzieren (Chinsangaram et al., 1998b; Wong et al., 2000). Um die geringe und langsame Entwicklung der humoralen Antikörpern zu überwinden, die oft bei *DNS*-Impfstoffen beobachtet wird, hat Li et al. mit einer Prime-Boost-Strategie gearbeitet. Die mit *DNS*-Impfstoff gegen MKS P1-2A3C3D geimpften Schweine wurden gegen einen homologen Challenge geschützt (Li et al., 2008a).

2.8.2.4.7 Rekominante Vektorvakzinen

Um MKS-spezifische Proteine und insbesondere empty-capsids direkt im Zieltier zu generieren, hat man u.a. rekombinante *Pocken- oder Pseudorabiesviren* (Sanz- Parra et al., 1998; Berinstein et al., 2000) als *Vektoren* eingesetzt (Ma et al., 2008; Mingxiao et al., 2007; Kit et al., 1991; Kitson et al. 1991).

Der bisher erfolgreichste Versuch, dem Immunsystem die relevanten Epitope des MKSV zu präsentieren, ohne dieses Virus in lebender oder inaktivierter Form einzusetzen, gelang mit rekombinanten, replikationsdefekten, humanen Adenoviren vom Typ 5 (*Ad5*) Dieser Vektor kann bis zu 5–8 kbp fremder *DNS* aufnehmen. Er kann sich nur in speziellen Zellkultursystemen vermehren, die das deletierte *Ad5 Gen* exprimieren. Unterschiedliche Versionen des *Ad5* Vektors, welche die *PI* Kapsid- und *3Cpro*- kodierenden Regionen exprimierten, schützen Schweine und Rinder innerhalb von wenigen Tagen (Mayr et al. 2001; Moraes et al., 2002; Pacheo et al., 2005). Bei einigen Versuchen wurde im Tier zusätzlich *INF alpha* (Interferon alpha) mittels rekombinanter *Ad5* erzeugt (Chinsangaram et al., 2003).

Mit der Interferoninduktion soll die zeitliche Lücke zwischen der Applikation des Impfstoffes und dem Beginn des antikörpervermittelten Impfschutzes geschlossen werden (Sanz-Parra et al., 1999; Mayr et al., 1999; Mayr et al., 2001).

Als potentieller Nachteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit anzusehen, dass bei einer wiederholten Impfung anti-Adeno Antikörper den Impfstoff neutralisieren, so dass eine Wiederholungsimpfung oder eine Impfung gegen einen weiteren Serotyp unwirksam wäre. Grubman führte hierzu aus, dass es in diesem Falle möglich sei, durch Verwendung eines anderen Adenoserotyps die Immunantwort wirksam zu boostern (Haas, pers. Mittlg.).

2.8.2.4.8 Ausblick

T. Doel konstatierte 2005, dass grundsätzliche Fortschritte in der Vakzineentwicklung ein besseres Verständnis der Immunantwort erfordern. Dies gilt nach wie vor und betrifft sowohl das Schließen der Lücke zwischen Impfstoffapplikation und dem Beginn des Schutzes wie für die Erzielung einer lebenslangen oder einer wesentlich breiteren Schutzwirkung und für die Ablösung der inaktivierten *146S* Vakzine durch neuartige thermostabile Impfstoffe, die keinen Umgang mit infektiösem MKSV mehr erfordern. Die Ergebnisse der hauptsächlich auf die T-Zellabhängigkeit der Immunantwort und auf wichtige B- und T-Zellepitope konzentrierten Forschung wurden seit vielen Jahren genutzt, um eine Vielzahl von neuartigen experimentellen Vakzinen zu entwickeln - ohne dass diese Bemühungen bisher zu Impfstoffen geführt hätten, die guten kommerziellen Standardvakzinen überlegen sind. Die begrenzten Erfolge der meisten Ansätze für Subunit- und Peptidvakzinen deuten darauf hin, dass zur Erzielung eines guten Schutzes dem Immunsystem die MKSV-spezifischen Epitope auf der Oberfläche geeigneter Partikel präsentiert werden sollten (Doel und Chong, 1982; Rodriguez et al., 2009). Der sich vor allem an den immunologisch relevanten Proteinabschnitten zeigende starke Polymorphismus des MKSV („MKS als Quasispezies“, Domingo et al., 1990) betrifft nicht nur lineare und kontinuierliche, sondern auch konformative und diskontinuierliche Epitope, die insbesondere mit Peptidimpfstoffen schwer oder gar nicht nachzubilden sind. Andererseits besteht bei der T-Zell-Immunantwort eine hohe Variabilität der einzelnen Wirtsindividuen. Eine T-Helfer-Zelle erkennt in der Regel ein bestimmtes antigenes Peptid nur in Zusammenhang mit einem bestimmten MHC-II-Molekül und jedes Individuum exprimiert davon seinen eigenen Satz (MHC-Polymorphismus) - was die oftmals individuell sehr verschiedenen T-Zell –Antworten auf Peptidimpfungen erklärt. Am besten scheint die Präsentation der relevanten Epitope des MKSV auf anderen Partikeln als inaktivierten MKS-Viren bisher der Arbeitsgruppe um M. Grubman in den USA gelungen

zu sein (Mayr et al., 2001; Moraes et al., 2002; Pacheco et al., 2005) deren auf *Ad5* basierender experimenteller Impfstoff in den USA erfolgreich an Schweinen und Rindern getestet wurde.

3 Zielsetzung der experimentellen Arbeiten

Diese Arbeit soll dazu beitragen, wissenschaftliche Grundlagen für die Entscheidung über einen Einsatz der Impfung in Situationen zu schaffen, in denen sich das Vakzine- und das Feldvirus mehr oder weniger deutlich unterscheiden. In den Vakzinebanken der Industrieländer kann nur eine begrenzte Anzahl von Impfstoffantigenen vorrätig gehalten werden. In endemisch MKS-infizierten Ländern entstehen jedoch ständig neu MKS-Stämme, die zum Teil nur eine geringe antigenetische Verwandtschaft zu den Impfstämmen zeigen. Insbesondere der Serotyp A zeigt eine hohe Variabilität, was die Bekämpfung erschwert. Andererseits ist bekannt, dass für Vakzinebanken produzierte Impfstoffe gegen den MKS-Serotyp A oft eine sehr hohe homologe Schutzwirkung bieten. Deshalb stellt sich die Frage, ob sie im Ausbruchsfall auch einen zumindest begrenzten Schutz gegen wenig verwandte Stämme bieten. Weil im Falle der Einschleppung die Entscheidung über den Einsatz der Impfung sehr rasch (binnen Tagen) getroffen werden muss, kann ein Belastungsversuch zur Klärung dieser Frage in Bezug auf das eingeschleppte Virus nicht mehr rechtzeitig durchgeführt werden (Dauer mit Vorbereitung etwa sechs Wochen). Deshalb besteht Bedarf für ein rasch durchführbares in-vitro Verfahren zur Vorhersage des möglichen Kreuzschutzes. Es war bekannt, dass zumindest bei homologen Belastungsversuchen der Schutz insgesamt recht gut mit dem durch die Impfung induzierten Neutralisationstiter korreliert. Darum wurden im Rahmen dieser Arbeit auch heterologe Neutralisationstests durchgeführt.

Auch für die Durchführung von Neutralisationstests muss zunächst das Ausbruchsvirus isoliert werden. Zwar hat der MKS-Nukleinsäurenachweis mittels real-time RT-PCR die Virusisolierung in Zellkultur für diagnostische Zwecke teilweise abgelöst, aber um eine Empfehlung zu ggf. einsetzbaren Impfstoffen abgeben zu können, ist es nach wie vor unumgänglich, das Ausbruchsvirus möglichst rasch anzuzüchten. Aus den Nukleinsäuresequenzen ist der mögliche Kreuzschutz durch einen vorhandenen Impfstamm gegen ein neues MKS-Isolat bisher noch nicht befriedigend vorherzusagen. Weil nicht immer sofort ein hochtitriges Isolat zur Verfügung steht, ist eine hocheffiziente Zellkultur erforderlich. Die für MKS-Virus sensitivste Zelle, die bovine Schilddrüsenzelle (*BTY*), muss jedes Mal als Primärkultur aus frischen Kälberschilddrüsen gewonnen werden, da sie nicht subkultivierbar oder auch nur gefrierlagerfähig ist. Der dazu erforderliche Aufwand und zeitliche Vorlauf sowie die Qualitätsschwankungen bei dieser primären Zelle führen dazu,

dass sie kaum in der Routine eingesetzt wird – außer am Weltreferenzlabor für MKS, *Institute for Animal Health (IAH)*, in Pirbright, Großbritannien. Am FLI standen zwei etablierte Zelllinien (*IB-RS-2*, *BHK-21-CT*) zur Anzucht des MKSV zur Verfügung. Aus Vorversuchen war bekannt, dass auch eine bisher nicht näher beschriebene Zelllinie (fetale Ziegenzunge) der FLI-Zellbank für MKSV empfänglich ist. Sie wurde mit den am FLI etablierten Zelllinien und der primären bovine Schilddrüsenzelle des IAH hinsichtlich ihrer Sensitivität für MKSV und anderer diagnostisch relevanter Eigenschaften verglichen.

4 Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der Ergebnisse

4.1 Zusammenfassung der experimentellen Untersuchungen

Es wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit neun Challengetests (Belastungsinfektionen) durchgeführt und insgesamt elf Challengetests ausgewertet. Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen des EU-Projektes „*Impro_Con*“.

Die Vakzinationen und die Belastungsinfektionen wurden, wie in der MKS-Monographie der Europäischen Pharmakopöe (2008) beschrieben, ausgeführt. Pro Versuch wurden 15 Rinder i.m. geimpft. Drei Gruppen von je fünf Rindern erhielten 1/1, 1/4 oder 1/16 der vorgeschriebenen Dosis. 21 Tage nach der Impfung wurden alle 15 Tiere zusammen mit 2 ungeimpften Kontrolltieren mit MKSV testinfiziert (*Challenge*). Nach acht Tagen wurden die Ergebnisse des Belastungstests am Tier abgelesen (*Reading*). Tiere, die Läsionen an anderen Stellen als der Zunge (Primärphthe) zeigten, wurden als nicht geschützt vermerkt (*non-protected*). Die PD_{50} Werte wurden, wie international üblich, nach der Methode von Spearman und Kärber (Spearman, 1908; Kärber, 1931) berechnet.

Es zeigte sich, dass Impfstoffe mit einer hohen Schutzwirkung (Potency) gegen die MKS innerhalb des Serotyps A auch einen Kreuzschutz gegen heterologe Belastungsinfektionen (Challenge) mit solchen Viren vermitteln, die nur geringe Verwandtschaftsgrade (ermittelt durch r-Wert Bestimmung) zu den Impfstämme aufweisen. Alle Sera wurden umfassend im VNT homolog und heterolog getestet. Hierbei zeigte sich, dass heterolog geschützte Tiere bereits am Tag 21 nach der Impfung gut messbare Challengevirus-spezifische Antikörpertiter aufwiesen. Diese Neutralisationstiter am Tag der Belastungsinfektion korrelierten insgesamt gut mit dem ermittelten Schutzwert. Die Ergebnisse dieser Kreuzschutzversuche wurden veröffentlicht (Brehm et al., 2008).

Zur Verbesserung der Virusanzüchtung wurde die fetale Ziegezungenzelllinie (ZZ-R 127) aus der Zelliniensammlung (CCLV) des Friedrich-Loeffler-Instituts auf ihre Empfänglichkeit für Infektionen durch MKSV sowie die Viren der vesikulären Schweinekrankheit (SVD) und der vesikulären Stomatitis (VSV) untersucht. Diese Viren verursachen ebenfalls vesikuläre Erkrankungen, die klinisch von der MKS nicht unterscheidbar sind. Die Ziegezungenzelle und die vergleichend mitgeführten etablierten Zelllinien wurden auf Zellkulturplatten oder in

Fläschchen angezüchtet und mit Virusisolaten aller 7 MKS-Serotypen inokuliert. Die Kulturen wurden 24 bzw. 48 Stunden nach der Inokulation auf *ZPE* untersucht und die Zellkulturüberstände im *Ag-ELISA* getestet. Vertreter aller sieben Serotypen des MKSV konnten auf *ZZ-R 127* Zellen mit einer Empfindlichkeit isoliert werden, die deutlich höher war als die von etablierten Zelllinien und nur etwa $0,5 \log_{10}$ unterhalb der Empfindlichkeit von *BTY* Zellen lag. Für die *ZZ-R 127* Zelllinie wurde gezeigt, dass sie ein sensibles, schnelles und bequemes Werkzeug für die Isolierung von MKSV und eine nützliche Alternative zu *BTY* Zellen für die MKS-Diagnose ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden veröffentlicht (Brehm et al., 2009).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Notimpfung kann bei der Bekämpfung der MKS in normalerweise MKS-freien Ländern eine wichtige Rolle spielen (Barnett et al., 2001). Um im Tierseuchenkrisenfall die Entscheidung zu treffen, ob und wie eine Notimpfung entsprechend gesetzlicher Vorgaben (hier Richtlinie des Rates 2003/85/EG) in Frage kommt, bedarf es vielschichtiger Risiko-Nutzenabwägungen (Barnett et al. 2001). Wichtig ist vor allem die Frage, ob davon ausgegangen werden kann, dass ein geeigneter Impfstoff in kurzer Zeit hergestellbar ist (Lombard et al., 2007). Da es nicht vorhersagbar ist, welcher Serotyp für den nächsten Ausbruch verantwortlich ist, werden verschiedene Antigene in den Vakzinebanken vieler Industrieländer eingelagert, aus denen innerhalb weniger Tage eine monovalente Vakzine hergestellt werden könnte (Doel, 2005). Dabei ist in Betracht zu ziehen, dass unter den Serotypen keine ausreichende Kreuzprotektivität besteht und so immer eine serotypspezifische Vakzine notwendig ist (Paton et al., 2005). Darüber hinaus treten auch innerhalb eines Serotyps Isolatvarianten auf, die ebenfalls keine ausreichende Kreuzprotektivität aufweisen (Cottral und Gailunas, 1972; Black et al., 1986; Thomson et al., 2001; Domingo et al., 2002). In einer zuvor freien Region hat die Kontrollmaßnahme „Notfallimpfung im Tierseuchenkrisenfall“ das Ziel, die Ausbreitung der Erkrankung zu verhindern oder zumindest signifikant zu reduzieren. Dazu können Ringimpfungen, gezielte Impfungen oder die ganze Population einbeziehende Impfstrategien verfolgt werden (Hutber et al., 2010). Im Rahmen einer Notimpfung ist in der Regel keine vollständige, d.h. sterile, Immunität zu erreichen. Ziel ist daher, die Virusausscheidung zu minimieren und die minimale Infektionsdosis zu erhöhen (Barnett und Carabin, 2002). Die Selektion des

Impfantigens ist also von überragender Bedeutung. Grundlagen für die Selektion können indirekte serologische Methoden (r-Werte), Sequenzdaten (Paton et al., 2005) oder Daten aus *in vivo* Belastungstests (Goris et al., 2008) sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die homologe und heterologe Schutzwirkung unterschiedlicher Serotyp A Antigene analysiert und der Frage nachgegangen, ob statistische und/oder serologische Parameter die besten Vorhersagen zur heterologen Schutzwirkung eines Impfantigens zulassen.

Experimente zur Ermittlung der Schutzwirkung von MKS Impfstoffen, welche die Feldsituation z.B. durch Kontaktinfektionen nachstellen, sind nicht bzw. schwierig zu standardisieren (Barnett et al., 2003). Darüber hinaus gibt es für diese Studien kein anerkanntes Schema. Aus diesem Grund wird in der Regel die Belastungsinfektion mit der Nadel durchgeführt (European Pharmacopoeia, 2008). In diesem Fall wird ausschließlich der Schutz gegen eine generalisierte Erkrankung getestet.

Prinzipiell steht für die Einschätzung des Kreuzschutzes die *expected percentage of protection* Methode (EPP, engl. erwartete Schutzwirkung in Prozent) zur Verfügung, die auf serologischer Grundlage die Wahrscheinlichkeit, dass Rinder gegen eine Belastungsinfektion mit 10^4 infektiösen Dosen nach einer einzelnen bzw. wiederholten Impfung geschützt wären schätzt (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, chapter 2.1.5, 2008*). Diese Methode bietet jedoch nur belastbare Einschätzungen, wenn die entsprechende Vakzine vorher extensiv an Hunderten von Rindern mit homologen Belastungstests getestet wurde (Paton et al., 2005). Da dies in der vorliegenden Studie nicht möglich war, wurde die standardisierte Belastungsinfektion mit der Nadel gewählt, die jedoch die Feldsituation weniger realistisch widerspiegelt. Alle Experimente wurden nach dem Standardprotokoll der Europäischen Pharmakopöe durchgeführt. Die Zielgröße dieses Protokolls ist die protektive Dosis 50% (PD_{50}), die eine quantitative Schätzung der Schutzwirkung darstellt, die durch die getestete Vakzine vermittelt wird. Die kleine Tierzahl, die unter Hochsicherheitsbedingungen infiziert werden kann, führt zu einer großen Varianz in diesen Tests (Goris et al., 2007). In Ermangelung einer besseren Alternative, wird dieses Verfahren jedoch seit Jahrzehnten in der Impfstoff-Qualitätskontrolle eingesetzt. Für den vorgenannten Einsatz werden die Tiere mit einem nahe verwandten Virus belastet. Das Verfahren kann jedoch einfach auf eine heterologe Belastungsinfektion übertragen werden (Doel, 2004).

Ein solcher Belastungstest ist für eine Impfentscheidung eigentlich nicht nutzbar, da das Ergebnis erst nach über einem Monat zur Verfügung stünde, während die Entscheidung innerhalb von Tagen getroffen werden muss. Aus diesem Grund verlässt man sich auf *in vitro*

Tests, die die Reaktivität von Seren mit dem entsprechenden Impfstoff geimpfter Tiere, gegen das homologe Impfvirus und das Feldvirus im Neutralisationstest vergleichen. Obwohl die Schutzwirkung komplexer ist als die ausschließliche Neutralisation von Virusepitopen, wurde von unterschiedlichsten Autoren gezeigt, dass die *in vivo* Schutzwirkung mit dem Antikörpertiter korreliert (Pay et al., 1977 und 1986; Van Maanen et al., 1989; Ahl et al., 1990; Smitsaart et al., 1998; Barnett et al., 2003). Auf der Grundlage von Antikörpertitern können zudem *r*-Werte berechnet werden, die als Maß des antigenetischen Verwandtschaftsgrads zwischen Virusstämmen angesehen werden. Barnett et al. (2001) betrachten einen durch Neutralisationstests ermittelten *r*-Wert von 0,3—1 als hinweisend auf einen ausreichenden Kreuzschutz. Während diese Richtlinien auf praktischer Erfahrung beruhen, ist es weithin anerkannt, dass es an experimentellen Studien zum Kreuzschutz mangelt. Insbesondere fehlen Studien zur Korrelation mit serologischen Ergebnissen (Paton et al., 2005). Paton et al. postulieren, dass die Schutzwirkung in einer heterologen Belastungssituation von zwei Faktoren abhängt – vom Verwandtschaftsgrad (ausgedrückt durch den *r*-Wert) und der Potenz des eingesetzten Impfstoffes (PD_{50}).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hochpotente MKS-Impfstoffe eine Schutzwirkung auch gegen heterologe Serotyp-A-Belastungsinfektionen bieten. Im Speziellen konnte gezeigt werden, dass drei Impfstoffe mit homologen PD_{50} -Werten von 32 auch gegen heterologe Serotyp-A Stämme schützten, die einen *r*-Wert wesentlich unter 0,3 aufwiesen und somit eigentlich nicht als geeignet eingestuft worden wären (Barnett et al., 2001). Für ein Ausbruchsszenario, in der eine Notimpfung in Erwägung gezogen wird, eine nahe verwandte Vakzine jedoch nicht verfügbar ist, könnte dies bedeuten, dass die Nutzung einer hochpotenten Vakzine trotz niedrigem *r*-Wert gerechtfertigt ist. Besonders vor dem Hintergrund sich ständig verändernder Stämme ist diese Beobachtung von praktischer Bedeutung für die Impfentscheidung an sich, aber auch für die Frage, welche und wie viele Stämme in einer Antigenbank verfügbar sein müssen. Auf der Grundlage der vorliegenden Daten kann man postulieren, dass die Qualität des Antigens eine entscheidendere Rolle spielt als die stammgetreue Abbildung jedes Serotyps.

Die Titer der neutralisierenden Antikörper korrelierten in den Studien der Doktorarbeit generell mit der Schutzwirkung. So wiesen die Tiere aus zwei Experimenten mit mangelnder Schutzwirkung niedrige oder nicht vorhandene Titer neutralisierender Antikörper gegen den Belastungsstamm auf. Ein besonderes Problem für die Korrelation serologischer Parameter mit der Schutzwirkung ist, dass der Endpunkt der homologen Schutzwirkung unter

experimentellen Praxisbedingungen nicht bestimmt werden konnte, da bereits 1/16 einer 2 ml Impfdosis das Limit einer sinnvollen Applikationsmenge darstellen.

Als Basis für eine Auswertung wurden die Belastungsvirus-spezifischen Antikörpertiter an Tag 21 nach der Impfung sowie die Schutzwirkung im Einzeltier aus allen Experimenten gepoolt. Teilte man die Tiere in drei, auf dem Impfstatus (homolog geimpft, heterolog geimpft, ungeimpft) beruhende Gruppen, zeigte sich, dass alle homolog geimpften Tiere vollkommen geschützt waren, und zwar unabhängig von den Serumantikörpertitern. Die ungeimpften Tiere entwickelten eine generalisierte Erkrankung und wiesen keine Antikörper auf. Wesentlich komplexer stellte sich die Situation in heterolog geimpften Tieren dar. In dieser Gruppe gab es sowohl Tiere, die messbare Antikörpertiter und Schutzwirkung aufwiesen als auch Tiere ohne messbare Antikörper, die dennoch geschützt waren. Insgesamt waren 40,4% der Tiere ohne messbare Antikörpertiter geschützt. Hier muss noch weiter untersucht werden, auf welchem Wege diese Tiere geschützt waren. Zum einen können die Titer unterhalb des Detektionslimits des Testsystems gelegen haben, zum anderen können nicht-antikörpervermittelte Immunantworten wie der T-Zell vermittelte Schutz bzw. Zytokine eine Rolle spielen (Cox et al., 2003; Parida et al., 2006).

Von allen Tieren mit messbaren Antikörpertitern gegen das Belastungsvirus waren fast 90 % geschützt. Würde man diesen Prozentsatz in einer notgeimpften Population erreichen, wäre davon auszugehen, dass die Ausbreitung verhindert werden könnte.

Die Ergebnisse dieser Studie reichen zwar noch nicht als statistische Basis für eine sogenannte *probit curve* (Titer in Bezug zur Schutzwahrscheinlichkeit), sie können jedoch bereits als Entscheidungshilfe für oder gegen einen Impfstoff eingesetzt werden. Unklar ist, ob sich diese Ergebnisse ohne weiteres auf andere Serotypen übertragen lassen. Besonders für Serotyp O, der momentan in Ostasien grassiert, ist dies fraglich. Srinivasan et al. zeigten schlechten Kreuzschutz trotz hoher r-Werte im Serotyp O (Srinivasan et al., 2006). Des Weiteren ist die Übertragbarkeit serologischer Ergebnisse in bzw. aus anderen Laboren fraglich, da die Titer deutliche Varianzen aufweisen, wenn sie in unterschiedlichen Laboren mit unterschiedlichen Testsystemen erhoben werden (Ferris et al., 2006). Ein Faktor sind die Zellsysteme, die für den Neutralisationstest genutzt werden. So deuten Ergebnisse von Ahl et al. an, dass BHK21-CT Zellen niedrigere numerische Werte für VNT Titer als IBRS2 Zellen produzieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zumindest für den MKSV Serotyp A eine hochpotente Vakzine auch eine Schutzwirkung gegen heterologe Stämme hat. Die

Schutzwirkung korreliert klar mit dem Titer virus-spezifischer, neutralisierender Antikörper (Brehm et al., 2008).

Wie bereits angeführt, ist die Grundlage der Impfscheidung eine schnelle Anzucht und Charakterisierung des Virusisolats, da sonst gar nicht geprüft werden kann, ob das Feldisolat zu Antigenen in der Impfstoffbank passt. Für eine Erkrankung wie der MKS benötigt man, neben der PCR, ein hoch-sensitives System zum Virusnachweis (Ferris et al., 2006). Die sensitivsten Zellkultursysteme sind primäre Zellen aus Kälberschilddrüsen (BTY) (Snowdon, 1966; Burrows et al., 1981; Ferris et al., 2006). Der primäre Charakter der Zellen macht sie jedoch zu einer suboptimalen Lösung im Tierseuchenkrisenfall, da sie sich weder subkultivieren noch langfristig lagern lassen. Im Krisenfall benötigt man daher ein robusteres aber möglichst gleich sensitives System.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die fetale Ziegenzungenzelllinie (ZZ-R 127) eine hochsensitive MKSV Replikation gestattet (Wildtyp und Vakzine), die der Sensitivität der BTY Zelle des WRL nur wenig nachsteht. Der Grund für diese höhere Empfänglichkeit der Zelllinie ist bisher nicht bekannt. Ein wichtiger Faktor könnte jedoch die Expression förderlicher Oberflächenrezeptoren sein. Hier ist besonders die Familie der Integrine hervorzuheben. Integrine sind Rezeptoren für viele Viren, darunter auch für MKSV-Feldisolate (Jackson et al., 1997 und 2003; Neff et al., 1998; McKenna et al., 2005). Integrine sind Heterodimere, die eine α - und eine β -Untereinheit besitzen, die jeweils in unterschiedlichen Formen vorkommen können. Sechs oder sieben Integrinvarianten sind dafür bekannt, dass sie das konservierte RGD Aminosäuremuster des VP2 Kapsidproteins von MKSV binden können. Darüber hinaus soll das Integrin $\alpha\beta 6$ ein Rezeptor für die Bindung von Wildtyp MKSV sein (Jackson et al., 2000; Ferris et al., 2005). Neben den Integrinen nutzt das MKSV Heparansulfat-Proteoglykane für Virusanlagerung und Vermehrung (Jackson et al., 1996, Monaghan et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass vor allem das Vorhandensein des $\alpha\beta 6$ Rezeptors für die Empfänglichkeit der Zelle gegenüber MKSV verantwortlich ist.

In der vorliegenden Validierungsstudie konnten insgesamt 40 Virusstämme aus allen sieben Serotypen mit hoher Empfindlichkeit auf der Ziegenzungenzelle isoliert werden, wobei sich im Gegensatz zu den anderen permanenten Zelllinien der ZPE fast durchweg in der ersten Passage binnen 24 Stunden zeigte. Es ist zudem möglich aus eingefrorenen Zellen binnen 1-2 Tagen einen verwendbaren Monolayer zu erzeugen (Brehm et al., 2009).

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die fetale Ziegenzungenzelle der BTY Zelle bei wesentlich erleichterter Handhabung fast ebenbürtig ist. Die Zelllinie wurde in Kooperation mit dem IAH in Pirbright und am FLI validiert und steht nun zur Anwendung als eine wertvolle Ergänzung im Arsenal der diagnostischen Methoden bereit.

5 Literaturverzeichnis

Abrams, C.C., A.M. King und G.J. Belsham. 1995. Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J. Gen. Virol.* 76:3089–3098.

Abu Elzein, E.M.E. und J.R. Crowther. 1981. Detection and quantification of IgM, IgA, IgG₁ and IgG₂ antibodies against foot-and-mouth disease virus from bovine sera using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Hyg. Camb.* 86:79-85.

Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., D. Rowlands und F. Brown. 1989. The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9Å resolution. *Nature* 337(6209):709–16.

Ahl, R., Haas, B., R.J. Lorenz und G. Wittmann. 1990. Alternative potency test of FMD vaccines and results of comparative antibody assays in different cell systems and ELISA; In: Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Lindholm, Denmark. 25-29 June. Food and Agriculture Organisation (FAO), Rome, 51-60.

Ahl, R., B. Haas und O. Marquardt. 1996. Improved and new techniques for the diagnosis of foot-and-mouth disease. Report of the Session of the FAO Research Group Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Ma'ale Hachamisha, Israel.58-63.

Alexandersen, S. und A.I. Donaldson. 2002. Further studies to quantify the dose of natural aerosols of foot-and-mouth disease virus for pigs. *Epidemiol. Infect.* 128:313-323.

Alexandersen, S., Zhang, Z., Reid, S.M., G.H. Hutchings und A.I. Donaldson. 2002. Quantities of infectious virus and viral RNA recovered from sheep and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus O UK 2001. *J. Gen. Virol.* 83: 1915-1923.

Alexandersen, S., Zhang, Z., A.I. Donaldson und A.J.M. Garland. 2003. Review: The Pathogenesis and Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *J. Comp. Path.* 129:1-36.

Alexandersen, S. und J. Gloster. 2004. Airborne transmission of foot-and-mouth disease. *Aerosol Soc. Newsletter* 42:4-9.

Anonymous. 2002. Economic Cost of Foot and Mouth Disease in the UK. A Joint Working Paper. DEFRA/DCMS. March 2002.

- Anonymous.** 2003. Council directive 2003/85/EC on Community measures for the control of foot-and-mouth disease repealing directive 85/511/ECC and Decisions 89/531/EEC and 96/665/EEC and amending Directive 92/46/EEC. *Offic. J. Eu. Union* 46.
- Anonymous.** 2008a. Annual OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Report 2008.
- Anonymous.** 2008b. Foot and mouth disease. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 6th ed. 12 rue de Prony, 75017 Paris, France, OIE.
- Anonymous.** 2008c. OIE Terrestrial Animal Health Code, Vol. 2, 17th edition. Part 2: Recommendations applicable to specific diseases; Chapter 2.1. OIE Listed Diseases; Chapter 2.2. Multiple Species Diseases. World Organisation for Animal Health.
- Armstrong R., J. Davie und R.S. Hedger.** 1967. Foot-and-mouth disease in man. *BMJ* 4:529-530.
- Bachrach, H.L., Bresse, S.S., Jr., Callis, J., W. Hess und R. Patty.** 1957. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1:147-152.
- Bachrach, H.L.** 1959. Foot-and-mouth disease virus: stability of its ribonucleic acid core to acid and to heat. *Biophys. Res. Comm.* 1:356.
- Bachrach, H.L., Moore, D.M., P.D. McKercher und J. Polatnick.** 1975. Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J. Immunol.* 115(6):1636-41.
- Bahnemann, H.G.** 1975. Binary ethyleneimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47:47-56.
- Bahnemann, H.G.** 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine. *Vaccine* 8:299-303.
- Barnett, P.V., A.R. Samuel und R.J. Statham.** 2001. The suitability of the 'emergency' foot-and-mouth disease antigens held by the International Vaccine Bank within a global context. *Vaccine* 19(15-16):2107-17.
- Barnett, P.V und H. Carabin.** 2002. A review of emergency foot-and-mouth disease (FMD) vaccines. *Vaccine* 20:1505-1514.
- Barnett, P.V., Cox, S.J., Aggarwal, N., H. Gerber und K.C. McCullough.** 2002. Further studies on the early protective responses in pigs following immunisation with high potency foot-and-mouth disease vaccine. *Vaccine* 20:3197-3208.

- Barnett, P.V., Statham, R.J., W. Vosloo und D.T. Haydon.** 2003. Foot-and mouth disease vaccine potency testing: determination and statistical validation of a model using a serological approach. *Vaccine* 21:3240-8.
- Barteling, S.J. und P.W. De Leeuw.** 1981. The use of stored concentrated antigens for the preparation of foot-and mouth disease vaccines. Rep. Res. Gr. Eur. Comm. Contr. FMD, Vienna, Austria, FAO Rome, 19.
- Belsham, G.J.** 1993. Distinctive features of foot-and mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60:241-60.
- Bergmann, I.E., Malirat, V., E. Neitzert und E. Correa Melo.** 2004. Vaccination: foot-and-mouth disease experience in South America. *Dev. Biologicals* 119 A Schudel & M Lombard 283-292.
- Berinstein, A., Tami, C., Taboga, O., E. Smitsaart und E. Carrillo.** 2000. Protective immunity against foot-and-mouth disease virus induced by a recombinant vaccinia virus. *Vaccine* 18(21):2231–8.
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., J.G. Sutcliffe und R.A. Lerner.** 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298(5869):30–3.
- Black, L., Nicholls, M.J., Rewyemamu, M.M., R. Ferrari und M.A. Zunino.** 1986. Foot-and -mouth disease vaccination: a multifactorial study of the influence of antigen dose and potentially competitive immunogens on the response of cattle of different ages. *Res. Vet. Sci.* 40:303-7.
- Brocchi, E., Bergmann, I.E., Dekker, A, Paton, D.J. Sammin, D.J. M. Greiner und S. Grazioli.** 2006. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 24(47-48):6966-6979.
- Brooksby, J.B.** 1958. The virus of foot-and-mouth disease. *Adv. Virus Res.* 5:1-37.
- Brooksby, J.B und J. Roger.** 1957. In: *Methods of Typing and Cultivation of Foot and Mouth Disease Viruses.* Project 208 of OEEG. Paris, 31.
- Brown, C.C., Piccone, M.E., Mason, P.W., T.S. McKenna und M.J. Grubman.** 1996. Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J. Virol.* 70(8):5638–41.

- Brown, F. und J. Crick.** 1959. Application of gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.* 82:444–447.
- Brown, F.** 2002. Review: Inactivation of viruses by aziridines. *Vaccine* 20:322–327.
- Brown, F.** 2004. Stepping stones in Foot-and-Mouth research: a personal view. In *Foot-and-Mouth Disease, Current Perspectives*, 1-17. Edited by F. Sobrino & E. Domingo: Horizon Bioscience, Wymondham, England.
- Brown, C.C., H.J. Olander und R.F. Meyer.** 1995. Pathogenesis of foot-and-mouth disease in swine, studied by in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 1:51-58.
- Burbury, Y.M.** 1928. The survival of foot-and-mouth disease in blood and vesicle fluid at temperatures between 50° and 60°C. 3rd Progr. Rep.FMD Res. Comm. App. II, 88.
- Burrows, R., Mann, J.A., Garland, J.M., A. Greig und D. Goodridge.** 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural FMD infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 191:599-609.
- Cao, Y., Lu, Z., Sun, J., Bai, X., Sun, P., Bao, H, Chen, Y., Guo, J., Li, D., X. Liu und Z. Liu.** 2009. Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and-mouth disease virus in insect cells and their immunogenicity in guinea pigs. *Vet. Microbiol.* 137:10–17.
- Challa, S., Barrette, R., Rood, D., Zinckgraf, J., R. French und L. Silbart.** 2007. Non-toxic *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A expressing the FMDV VP1 G-H loop for mucosal vaccination of swine against foot and mouth disease virus. *Vaccine* 25(17):3328-37.
- Chapstick, P.B., Telling, R.C., W.G. Chapman und D.L Stewart.** 1962. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature* 195:1163–1164.
- Chinsangaram, J., P.W. Mason und M.J. Grubman.** 1998a. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 16(16):1516–22.
- Chinsangaram, J., Beard, C., Mason, P.W., Zellner, M.K., G. Ward und M.J. Grubman.** 1998b. Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *J. Virol.* 72(5):4454–7.
- Chinsangaram, J., M. Koster und M.J. Grubman.** 2001. Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* 75:5498–5503.

- Chinsangaram, J., M.P. Moraes, M. Koster und M.J. Grubman.** 2003. Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. *J. Virol.* 77:1621–1625.
- Chung, W.B., P.C. Liao und P.C. Yang.** 2003. Surveillance of FMD virus non-structural protein antibodies in pig populations involved in an eradication programme. *Vet. Rec.* 152(19):595-597.
- Collen, T., L. Pullen und T.R., Doel.** 1989. T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J. Gen. Virol.* 70:395-403.
- Collen, T. und T.R. Doel.** 1990. Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 71:309-15.
- Cottral, G.E.** 1969. Persistence of foot-and-mouth disease virus in animals, their products and the environment. *Bull. Off. Int. Epiz.* 71:(3-4) 549-68.
- Cottral, G.E. und P. Gailunas.** 1972. Experimental multiple infection of animals with foot-and-mouth disease virus. *Proc. Am. Mtg. U.S. Anim. Hlth. Assoc.* 75:441-65.
- Cowan, K.M.** 1973. Antibody responses to viral antigens. *Adv. Immunol.* 17:195-255.
- Cox, S.J. und P.V. Barnett.** 2009. Experimental evaluation of foot-and-mouth disease vaccines for emergency use in ruminants and pigs. *Vet. Res.* 40:3.
- Cox, S.J., Aggarwal, N., R.J. Statham und P.V. Barnett.** 2003. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine* 21(13-14):1336-47.
- Curry, S., E. Fry, W. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, T. Jackson, A. King, S. Lea, J. Newman und D. Stuart.** 1997. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 71:9743–9752.
- Dawe, P.S., Sorenson, K., Ferris, N.P., Barnett, I.T.R., R.M. Armstrong und N.J. Knowles.** 1994. Experimental transmission of foot-and-mouth disease virus from carrier African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in Zimbabwe. *Vet. Rec.* 134:211–215.
- De Diego, M., Brocchi, E, D. Mackay und S.F. De.** 1997. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.* 142(10):2021-2033.
- De Los Santos, T., de Avila Botton, S., R. Weiblen und M.J. Grubman.** 2006. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J. Virol.* 80(4):1906–14.

- De Los Santos, T., F. Diaz-San Segundo und M.J.Grubman.** 2007. Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J. Virol.* 81(23):12803–15.
- Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., E. Ehrenfeld und M.J. Grubman.** 1988. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* 62(11):4407–9.
- Diaz-San Segundo, F., Moraes, M.P., de los Santos, T., C.C.A. Dias und M.J. Grubman.** 2010. Interferon-Induced Protection against Foot-and-Mouth Disease Virus Infection Correlates with Enhanced Tissue-Specific Innate Immune Cell Infiltration and Interferon-Stimulated Gene Expression. *J. Virol.* 84(4):2063–2077.
- DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., T. Doel und N. Mowat.** 1986. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science (New York, NY)* 232(4750):639–41.
- Doel, T.R. und P.J. Baccarini.** 1981. Thermal stability of FMDV. *Arch. Virol.* 70:21-32.
- Doel, T.R. und W.K.T. Chong.** 1982. Comparative immunogenicity of 146S, 75S, and 12S particles of FMDV. *Arch. Virol.* 73:185-191.
- Doel, T.R.** 2003. FMD Vaccines. *Virus Res.* 91:81-99.
- Doel, T.R.** 2004. FMD Vaccine Strain Selection and Development Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD Chania, Crete, Greece 12-15 Oct, 355-357.
- Doel, T.R.,** 2005. Natural and Vaccine Induced Immunity to FMD. In: Mahy BWJ, editor. *Foot-and -mouth disease virus (CTMI)*, Springer-Verlag Berlin und Heidelberg GmbH & Co. K, 288:103—31.
- Donaldson, A.I., N.P. Ferris und J. Gloster.** 1982a. Air sampling of pigs infected with foot-and-mouth disease virus: comparison of Littone and cyclone samples. *Res. Vet. Sci.* 33:384-385.
- Donaldson, A.I., Gloster, J., L.D. Harvey und D.H. Deans.** 1982b. Use of prediction models to forecast and analyse airborne spread during the foot-and-mouth disease outbreaks in Brittany, Jersey and the Isle of Wight in 1981. *Vet. Rec.* 110: 53-57.
- Donaldson, A.I., N.P. Ferris und G.A. Wells.** 1984. Experimental foot-and-mouth disease in fattening pigs, sows and piglets in relation to outbreaks in the field. *Vet Rec.* 20:509-512.
- Donaldson, A.I.** 1987. Foot-and-Mouth disease: the principal features. *Irish Vet. J.* 41:325-327.
- Donaldson, A.I., Alexandersen, S., J.H. Sorensen und T. Mikkelsen.** 2001. The relative risks of the uncontrollable (airborne) spread of foot-and-mouth disease by different species. *Vet. Rec.* 148:602–604.

- Donaldson, A.I. und S. Alexandersen.** 2002. Predicting the spread of foot-and-mouth disease by airborne virus. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 21:569-575.
- Domingo, E., Mateu, M.G. Martinez, M.A., Dopazo, J., A. Moya und F. Sobrino.** 1990. Genetic Variability and Antigenic Diversity of Foot-and-Mouth Disease Virus. In: Kurstak, E., Marusyk, R.G., Murphy, F.A. und Van Regenmortel, M.H.V., *App. Virol. Res., Vol 2 Virus Variability, Epidemiol. and Control.* New York. Plenum Publishing Corp. 233-66.
- Domingo, E., Baranowski, E., C. Escarmis und F. Sobrino.** 2002. Foot-and mouth disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 25:297-308.
- European Pharmacopoeia.** 2008. Foot-and-mouth disease (ruminants) vaccine (inactivated). 6th ed. Strasbourg: Council of Europe.
- Eskildsen, M.K.** 1969. Experimental pulmonary infection of cattle with FMDV. *Nord Vet. Med.* 21:86-91.
- Federer, K.E.** 1969. Susceptibility of the Agouti (*Dasyprocta aguti*) to Foot-and-Mouth Disease Virus. *Zentralbl Veterinärmed. B* 16:847-853.
- Ferris, N.P. und A.I. Donaldson.** 1992. World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease: review of thirty-three years of activity (1958-1991). *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 11:657-684.
- Ferris, N.P., Abrescia, N.G.A., Stuart, D.I., Jackson, T., Burman, A., D.P. King und D. J. Paton.** 2005. Utility of recombinant integrin $\alpha\beta 6$ as a capture reagent in immunoassays for the diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Meth.* 127:697th.
- Ferris, N.P., D. P. King, S.M. Reid, G.H. Hutchings, A.E. Shaw, D.J. Paton, N. Goris, B. Haas, B. Hoffmann, E. Brocchi, M. Bugnetti, A. Dekker und K. De Clercq.** 2006. Foot-and-mouth disease virus: A first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.* 117(2-4):130-140.
- Fowler, V.L., Paton, D.J., E. Rieder und P.V. Barnett.** 2008. Chimeric foot-and-mouth disease viruses: Evaluation of their efficacy as potential marker vaccines in cattle. *Vaccine.* 26(16):1982-9.
- Frenkel, H.S.** 1947. La culture de la virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés. *Bull. Off. Int. Epiz.* 28:155–162.
- Gerner, W., Hammer, S.E., K-H. Wiesmüller und A. Saalmüller.** 2009. Identification of Major Histocompatibility Complex Restriction and Anchor Residues of Foot-and-Mouth Disease Virus-Derived Bovine T-Cell Epitopes. *J. Virol.* 83(9):4039–4050.

- Gibbs, P.** 2003. The foot-and-mouth disease epidemic of 2001 in the UK: implications for the USA and the ""war on terror". *J. Vet. Med. Educ.* 2003 Summer; 30(2):121-32.
- Gibson, C.F. und A.I. Donaldson.** 1986. Exposure of sheep to natural aerosols of foot-and-mouth disease virus, *Res. Vet. Sci.* 41:45–49.
- Glass, .E.J., Oliver, R.A., Collen,T., Doel, T.R., R. Dimarchi und R.L. Spenner.** 1991. MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunol.* 74:594-99.
- Gloster, J., Blackall, J., R.F. Sellers und A.I. Donaldson.** 1981. Forecasting the spread of foot-and-mouth disease. *Vet. Rec.* 108:370–374.
- Gloster, J.** 1982. Risk of airborne spread of foot-and-mouth disease from the continent to England. *Vet. Rec.* 111:290-295.
- Gloster, J., Williams, P., Doel, C., Esteves, I., H. Coe und J.F. Valarcher.** 2006. Foot-and-mouth disease - Quantification and size distribution of airborne particles emitted by healthy and infected pigs. *Vet. J.* 174(1):42-53.
- Goris, N., Willems, T., Diev, V.I., Merkelbach-Peters, P., Vanbinst, T., Van der Stede, Y., Kraft, H.-P., Zakharov, V.M., Borisov, V.V., Nauwynck, H.J., B. Haas und K. De Clercq.** 2008. Indirect foot-and-mouth disease vaccine potency testing based on a serological alternative. *Vaccine* 26(31):3870–3879.
- Goris, N., Merkelbach-Peters, P., Diev, V.I., Verloo, D., Zakharov, V.M., H-P. Kraft und K. De Clercq.** 2007. European Pharmacopoeia foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle: Between test variability and its consequences. *Vaccine* 25:3373-3379.
- Greenwood, D.L.V., Kalkanidis, K.D.M., Xiang, S., M. Plebanski und J.-P.Y. Scheerlinck.** 2008. Vaccination against foot-and-mouth disease virus using peptides conjugated to nano-beads. *Vaccine* 26:2706—2713.
- Grubman, M.J., S.A Lewis und D.O. Morgan.** 1993. Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* 11(8):825–9.
- Grubman, M.J.** 2005. Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals* 33:227–234.
- Grubman, M.J., Moraes, M.P., Diaz-San Segundo, F., L. Pena und T. de los Santos.** 2008. Evading the host immuneresponse: howfoot-and-mouth disease virus has become an ejective pathogen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53:8–17.
- Haas, B.** 2001a. Die Diagnostik der Maul- und Klauenseuche. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 108:508-513.

- Haas, B.** 2001b. Die Maul- und Klauenseuche: Klinik, aktuelle Seuchenlage, Bekämpfungsverfahren, Probennahme und Diagnostik. *Tierärztl. Umsch.* 56:619-628.
- Haas, B.** 2004. Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus in Milk. *Bull IDF* 392:77-83.
- Hamblin, C., I.T. Barnett und J.R. Crowther.** 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. II. Application. *J. Immunol. Meth.* 93(1):123-9.
- Hamblin, C., I.T.R. Barnett und R.S. Hedger.** 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J. Immunol. Meth.* 93:115–121.
- Hegde, N.R., Maddur M.S., Rao, P.P., S.V. Kaveri und J. Bayry.** 2009. Thermostable foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate for endemic countries: A perspective. *Vaccine* 27:2199–2201.
- Hedger, R.S., J.B. Condy und J. Falconer.** 1969. The Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus from African Buffalo (*Syncerus caffer*). *Vet. Rec.* 84:526-527.
- Hedger, R.S.** 1972. Foot-and-mouth disease and the African buffalo (*Syncerus caffer*). *J. Comp. Pathol.* 82:19-28.
- Hedger, R.S., J.B. Condy und S.M. Golding.** 1972. Infection of some species of African wild life with foot-and-mouth disease virus. *J. Comp. Pathol.* 82:455-461.
- Hedger, R.S.** 1981. Foot-and-Mouth Disease. In: Davis, J.W. Karstad, L.H. und Trainer, D.O. (Hrsg.). *Infectious diseases of wild mammals*, 2nd edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 87-96.
- Heinritzi, K., G. Drasch, W. Hermanns, K. Matiasek und T. Hänichen.** 2001. Selenvergiftung bei Mastschweinen als Differenzialdiagnose zur MKS. *Tierärztl. Praxis Großtiere/Nutztiere.* Band 29 (G) 91.
- Höhlich, B.-J., Wiesmüller, K.-H., Haas, B., Gerner, W., Correa, R., Hehnen, H.-R., Schlapp, T. E. Pfaff und A. Saalmüller.** 2003a. Induction of an antigen-specific immune response and partial protection of cattle against challenge infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV) after lipopeptide vaccination with FMDV-specific B-cell epitopes. *J. Gen. Virol.* 84:3315–3324.
- Höhlich, B.-J., Wiesmüller, K.-H., Schlapp, T., Haas, B., E. Pfaff und A. Saalmüller.** 2003b. Identification of Foot-and-Mouth Disease Virus-Specific Linear B-Cell Epitopes to Differentiate between Infected and Vaccinated Cattle. *J. Virol.* 8633–8639.

- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., C.A. Janeway und R.A. Ezekowitz.** 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-8.
- Hoffmann, B., Beer, M., Reid, S.M., Mertens, P., Oura, C.A.L., van Rijn, P.A., Slomka, M.J., Banks, J., Brown, I.H., D.J. Alexander und D.P. King.** 2009. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Mic.* 139(1-2):1-23.
- Hughes, G.J., Mioulet, V., Haydon, D.T., Kitching, R.P., A.I. Donaldson und M.E.J. Woolhouse.** 2002. Serial passage of foot-and-mouth disease virus in sheep reveals declining levels of viraemia over time. *J. Gen. Virol.* 83:1907-1914.
- Hutber, A.M., Kitching, R.P., J.C. Fishwick und J. Bires.** 2010. Foot-and-mouth disease: The question of implementing vaccinal control during an epidemic. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.018
- Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., J.W. Newman und A.M. King.** 1996. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 70:5282–5287.
- Jackson, T., A. Sharma, R.A. Ghazaleh, W.E. Blakemore, F.M. Ellard, D.L. Simmons, J.W. Newman, D.I. Stuart und A.M. King.** 1997. Arginineglycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin $\alpha_3\beta_1$ in vitro. *J. Virol.* 71:8357–8361.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., W. Blakemore und A.M. King.** 2000. The epithelial integrin $\alpha_3\beta_1$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74:4949–4956.
- Jackson, T., A.M. King, D.I. Stuart und E. Fry.** 2003. Structure and receptor binding. *Virus Res.* 91:33–46.
- James, A.D. und J. Rushton.** 2002. The economics of foot-and-mouth disease. *Rev. Sci. Tech.* 3:637-44.
- Juleff, N., Windsor, M., Lefevre, E.A., Gubbins, S., Hamblin, P., Reid, E., McLaughlin, K., Beverley, P.C.L., I.W. Morrison und B. Charleston.** 2009. Foot-and-Mouth Disease Virus Can Induce a Specific and Rapid CD4⁺ T-Cell-Independent Neutralizing and Isotype Class-Switched Antibody Response in Naïve Cattle. *J. Virol.* 83(8): 3626–3636.
- Kärber, G.,** 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 162:480-3.

- Kit, M., Kit, S., Little, S.P., R.D. Di Marchi und C. Gale.** 1991. Bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus)-based viral vector which expresses foot-and-mouth disease epitopes. *Vaccine* 9(8):564–72.
- Kitching, R.P., Kowles, N.J., A.R. Samuel und A.I. Donaldson.** 1989. Development of foot-and mouth disease virus stain characterisation – a review. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 23:153-166.
- Kitching, R.P.** 1992. The application of biotechnology to the control of foot-and-mouth disease virus. *Br. Vet. J.* 148:375-388.
- Kitching, R.P.** 1998. A recent history of foot-and mouth disease. *J. Comp. Pathol* 118:89-108.
- Kitson, J.D., Burke, K.L., Pullen, L.A., G.J. Belsham und J.W. Almond.** 1991. Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea pigs. *J. Virol.* 5(6):3068–75.
- Kitt, T.** 1886. Wert und Unwert der Schutzimpfungen gegen Tierseuchen. P. Parey. Berlin.
- Kleid, D.G., Yansura, D., Small, B., Dowbenko, D., D.M. Moore und M.J. Grubman.** 1981. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science (New York, NY)* 214(4525):1125–9.
- Knowles, N.J. und A.R. Samuel.** 2003. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 91(1):65-80.
- Kramer, M., Jentsch, D., Kaden, V., H. Schlüter und W. Zwingmann.** 1997. Die Maul- und Klauenseuche - Situation in Europa und der Welt im Jahr 1996. *Amtstierärztl. Dienst und Lebensmittelkontrolle.* 4:196 - 202.
- Laporte, J.** 1969. The structure of foot-and-mouth disease virus protein. 1969. *J. Gen. Virol.* 4(4):631–4.
- Laporte, J., Grosclaude, J., Wantyghem, J., S. Bernard und P. Rouze.** 1973. Neutralization of the infective power of the foot-and-mouth disease virus in cell culture by using serums from pigs immunized with a purified viral protein. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences.* 276(25):3399–401.
- Lewis, S.A., D.O. Morgan und M.J. Grubman.** 1991. Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J. Virol.* 65:6572–6580.

- Li, G., Chen, W., Yan, W., Zhao, K., Liu, M., Zhan, J., Fei, L., Xu, Q., Sheng, Z., Y. Lu und Z. Zheng.** 2004. Comparison of immune responses against foot-and-mouth disease virus induced by fusion proteins using the swine IgG heavy chain constant region or beta-galactosidase as a carrier of immunogenic epitopes. *Virology* 328:274–281.
- Li, X., Liu, R., Tang, H., Jin, M., H. Chen und P. Qian.** 2008. Induction of protective immunity in swine by immunization with live attenuated recombinant pseudorabies virus expressing the capsid precursor encoding regions of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 26(22):2714–22.
- Li, Y., Stirling, C.M., Denyer, M.S., Hamblin, P., Hutchings, G., H.H. Takamatsu und P.V. Barnett.** 2008a. Dramatic improvement in FMD DNA vaccine efficacy and cross-serotype antibody induction in pigs following a protein boost. *Vaccine*. 26(21):2647-56.
- Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Z. Zhang und J. Liu.** 2008b. Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PloS One* 3(5):e2273.
- Liu, G., Liu, Z., Xie, Q., Chen, Y., Bao, H., H. Chang und X. Liu.** 2004. Generation of an infectious cDNA clone of an FMDV strain isolated from swine. *Virus Res.* 104:157–164.
- Lombard, M. und A.E. Fussel.** 2007. Antigen and vaccine banks: technical requirements and the role of the European antigen bank in emergency foot and mouth disease vaccination. *Rev. Sci. Tech.* 26(1):117–34.
- Lunt, R., W. Linchongsubongkoch und L. Gleeson.** 1994. A modified liquid phase (LP) blocking ELISA used to assess type O foot-and-mouth disease virus antigenic variation in Thailand. *Vet. Mic.* 42:79-90.
- Ma, M., Jin, N., Shen, G., Zhu, G., H.J. Liu und M. Zheng.** 2008. Immune responses of swine inoculated with a recombinant fowlpox virus co-expressing P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. *Vet. Immuno. Immunopath.* 121:1–7.
- Martin, W.B. und L.T. Edwards.** 1965. Edwards. A field trial in south africa of an attenuated vaccine against foot-and-mouth disease. *Res. Vet. Science* 6:196–201.
- Mason, P.W., Piccone, M.E., McKenna, T.S., J. Chinsangaram und M.J. Grubman.** 1997. Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* 227(1):96–102.
- Mason, P.W., J. Chinsangaram, M.P. Moraes, G.A. Mayr und M.J. Grubman.** 2003. Engineering better vaccines for foot-and-mouth disease. *Dev. Biol.* 114:79–88.

- Mateo, R., Luna, E., V. Rincon und M.G. Mateu.** 2008. Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in the development of improved vaccines. *J. Virol.* 2(24):12232–40.
- Mattion, N., Goris, N., Willems, T., Robiolo, B., Maradei, E., Perez Beascochea, C., Perez, A., Smitsaart, E., Fondevila, N., Palma, E., K. De Clercq, und J. La Torre.** 2009. Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology. *Vaccine* 27 (5):741-747.
- Mayr, G.A., J. Chinsangaram und M.J. Grubman.** 1999. Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* 263(2):496–506.
- Mayr, G.A., O'Donnell, V., Chinsangaram, J., P.W. Mason und M.J. Grubman.** 2001. Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. *Vaccine* 19:2152–62.
- McKenna, T.S., J. Lubroth, E. Rieder, B. Baxt und P.W. Mason.** 1995. Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J. Virol.* 69:5787–5790.
- McKercher, P.D., W.R. Hess und F. Hamdy.** 1978. Residual viruses in pork products, *App. Env. Microbiol.* 35:142–145.
- McCullogh, K.C., Bruckner, L., Schaffner, R., Fraefel, W., H.K. Mueller und U. Kihm.** 1992a. Relationship between the anti-FMD virus antibody reaction as measured by different assays, and protection in vivo against challenge infection. *Vet. Microbiol.* 30:99-112.
- McCullogh, K.C., De Simone, F., Brocchi, E. Capucci, L., J.R. Crowther und U. Kihm.** 1992b. Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.* 66:1835-40.
- Minor, P.** 1998. Picornaviridae. In: Topley and Wilsons microbiology and microbial infections, Vol 1: Virology, 9 th ed. Arnold, Mitglied der Hodder Headline Group, 485-509.
- Mingxiao, M., Ningyi, J., Juan, L.H., Min, Z., S.Guoshun und Z. Guangze.** 2007. Immunogenicity of plasmids encoding P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. *Ant. Res.* 76(1):59–67.
- Monaghan, P., S. Gold, J. Simpson, Z. Zhang, P.H. Weinreb, S.M. Violette, S. Alexandersen und T. Jackson.** 2005. The $\alpha\beta 6$ integrin receptor for foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J. Gen. Vir.* 86:2769–2780.

- Moonen, P. und R. Schrijver.** 2000. Carriers of foot-and-mouth disease virus: A review. *Vet. Quart.* 22:193-197.
- Moraes, M.P., Mayr, G.A., P.W. Mason und M.J. Grubman.** 2002. Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine* 11–12:1631–9.
- Moraes, M.P., Chinsangaram, J., M.C.S. Brum und M.J. Grubman.** 2003. Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. *Vaccine* 22:268–279.
- Mort, M., Convery, I., J. Baxter und C. Bailey.** 2005. Psychosocial effects of the 2001UK foot and mouth disease epidemic in a rural population: qualitative diary based study. *BMJ (Clin. Res. Ed.)* 331(7527):1234.
- Mowat, G.N. und W.G Chapman.** 1962. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell derived from hamster kidneys. *Nat. Lond.* 194:253–255.
- Mowat, G.N., D.A. Barr und J.H. Bennett.** 1969a. The development of an attenuated foot-and-mouth disease virus vaccine by modification and cloning in tissue cultures of BHK21 cells. *Archiv Virusforschung* 26(4):341–54.
- Mowat, G.N., J.B. Brooksby und T.W. Pay.** 1962b. Use of BHK 21 cells in the preparation of mouse attenuated live foot-and-mouth disease vaccines for the immunization of cattle. *Nature* 196:655–6.
- Müller, H. (2001):** Maul- und Klauenseuche (MKS) - Wissenschaftliche Grundlagen. www.dvg.net/index.php?id=324
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., M.C Horzinek und M.J. Studdert.** 1999. *Vet. Virol.*, 3rd edition. Academic Press, San Diego USA, 23-42:517-532.
- Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P.W., Blystone, S.D, E.J. Brown und B. Baxt.** 1998. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin $\alpha_3\beta_1$ as its receptor. *J. Virol.* 72:3587–3594.
- Orsel, K., Bouma, A., Dekker, A., J.A. Stegeman und M.C.M. de Jong.** 2009. Foot and mouth disease virus transmission during the incubation period of the disease in piglets, lambs, calves, and dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 88:158–163.
- Pacheco, J.M., Brum, M.C., Moraes, M.P., W.T. Golde und M.J. Grubman.** 2005. Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. *Virol.* 337(2):205–9.
- Paiba G.A., Anderson, J., Paton, D.J., Soldan, A.W., Alexandersen, S., Corteyn,**

- M., Wilsden, G., Hamblin, P., D.K.J. MacKay and A.I. Donaldson.** 2004. Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *J. Virol. Meth.* 115:145–158.
- Panina, G.F., A. Civardi, I. Massirio, F. Scatozza, P. Baldini and F. Palmia.** 1989. Survival of foot-and-mouth disease virus in sausage meat products (Italian salami), *Int. J. Food Microbiol.* 8:141–148.
- Parida, S., Oh, Y., Reid, S. M., Cox, S. J., Statham, R. J., Mahapatra, M., Anderson, J., Barnett, P. V., B. Charleston and D.J. Paton.** 2006. Interferon-gamma production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. *Vaccine* 24:964-969.
- Parida, S.** 2009. Vaccination against foot-and-mouth disease virus: strategies and effectiveness. *Expert Rev. Vaccines* 8(3):347-365.
- Parida, S., Oh, Y., Reid, S.M., Cox, S.J., Statham, R.J., Mahapatra, M., Anderson, J., Barnett, P.V., B. Charleston and D.J. Paton.** 2006. Interferon-gamma production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. *Vaccine* 24(7):964-9.
- Pasick, J.** 2004. Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication. *Anim. Health Res. Rev.* 5(2):257-262.
- Patel, J.R. und J.G.M. Heldens.** 2009. Review, Immunoprophylaxis against important virus diseases of horses, farm animals and birds. *Vaccine* 27:1797–1810.
- Paton, D.J., K.J. Sumption und B. Charleston.** 2009. Review: Options for control of foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364:2657–2667.
- Paton, D.J., Valarcher, J.F., Bergmann, I., Matlho, O.G., Zakharov, V.M., E.L. Palma und G.R. Thomson.** 2005. Selection of foot and mouth disease vaccine strains—a review. *Rev. Sci. Tech.* 24(3):981–93.
- Pay, T.W.F. und N.J. Parker.** 1977. Some statistical and experimental design problems in the assessment of FMDV vaccine potency. *Dev. Biol. Stand.* 35:369.
- Pay T.W.F. und P.J. Hingley.** 1986. The use of serum neutralising antibody assay for the determination of the potency of foot-and-mouth disease vaccines in cattle. *Dev. Biol. Stand.* 64:153-161.
- Pay T.W.F. und P.J. Hingley.** 1987. Correlation of 140S antigen dose with the serum neutralizing antibody response and the level of protection induced in cattle by foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 10:699-706.

- Persson, K., Nordengrahn, A., C. Decker und M. Merza.** 2004. The development of an indirect ELISA for the detection of antibodies to the non-structural protein 3ABC of the Foot-and-mouth disease virus; the use of a polyclonal conjugate that allows a multi-species detection of antibodies. Report of: The Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease. Crete, Greece. App. 79:479-480.
- Prato Murphy, M.L., Meyer, R.F., Mebus, C., A.A. Schudel und M. Rodriguez.** 1994. Analysis of sites of foot and mouth disease virus persistence in carrier cattle via the polymerase chain reaction. Arch. Virol. 136:299-307.
- Rieder, E., Bunch, T., F. Brown und P.W. Mason.** 1993. Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly (C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. J. Virol. 67(9):5139-45.
- Rieder, E., Baxt, B., J. Lubroth und P.W. Mason.** 1994. Vaccines prepared from chimeras of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies and protective immunity to multiple serotypes of FMDV. J. Virol. 68(11):7092-8.
- Rodriguez, L.L., Barrera, J., Kramer, E., Lubroth, J., F. Brown und W.T. Golde.** 2003. A synthetic peptide containing the consensus sequence of the G-H loop region of foot-and-mouth disease virus type-O VP1 and a promiscuous T-helper epitope induces peptide-specific antibodies but fails to protect cattle against viral challenge. Vaccine 21(25-26):3751-6.
- Rodriguez, L.L. und M.J. Grubman,** 2009. Review: Foot and mouth disease virus vaccines. Vaccine 27:D90-D94.
- Roeder, P.L. und P.M. Le Blanc Smith.** 1987. Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. Res. Vet. Sci., 43, 225-232.
- Röhler, H. und A.-F. Olechnowitz.** 1980. Maul- u. Klauenseuche. Gustav Fischer Verlag, Jena. 66-69.
- Röhler, H. und A.-F. Olechnowitz.** 1980. Maul- u. Klauenseuche. Gustav Fischer Verlag, Jena. 16-64.
- Rolle, M. und A. Mayr.** 2007. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 325-330.
- Roosien, J., G.J. Belsham, M.D. Ryan, A.M. King und J.M. Vlak.** 1990. Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. J. Gen. Virol. 71:1703-1711.

- Roux, E., Vallée, H., H. Carré und E. Nocard.** 1921. Résumé d'expériences sur la fièvre aphteuse. C.R. Acad. Sci. Paris 173:1141.
- Rowlands, D.J.** (Hrsg.) 2003. Sonderheft S1 Virus Research Foot-and-Mouth Disease. Januar 91(1):1-161.
- Rowlands, D.J., D.V. Sangar und F. Brown.** 1975. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 26(3):227–38.
- Rowlands, D.J., D.V. Sangar und F. Brown.** 1971. Buoyant Density of Picornaviruses in Caesium Salts. J. Gen. Virol 13:141-152.
- Rowlands, D.J., D.V. Sangar und F. Brown.** 1971. Relationship of the antigenic structure of foot-and-mouth disease virus to the process of infection. J. Gen. Virol. 13(1):85–93.
- Rueckert, R.R.** 1996. Chapter 21, Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. und Howley, P.M. (Hrsg.). Fields Virology Vol 1, third edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 609-654.
- Rweyemamu, M.M., G. Terry und T.W. Pay.** 1979. Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. Arch. Virol. 59(1–2):69–79.
- Rweyemamu, M., Roeder, P., Mackay, D., Sumption, K., Brownlie, J., Y. Leforban und R.F. Sellers.** 1971. Quantitative aspects of the spread of foot-and-mouth disease. Vet. Bull. 41:431-439.
- Ryan, E., D. Mackay und A. Donaldson.** 2008. Foot-and-Mouth Disease Virus Concentrations in Products of Animal Origin. Transbound. Emerg. Dis. 55(2):89-98.
- Saiz, J.C., Cairo, J., Medina, M., Zuidema, D., C. Abrams und G.J. Belsham.** 1994. Unprocessed foot-and-mouth disease virus capsid precursor displays discontinuous epitopes involved in viral neutralization. J. Virol. 68(7):4557–64.
- Salt, J.S.** 1993. The carrier state in foot and mouth disease - an immunological review. Br. Vet. J. 149:207-223.
- Sanz-Parra, A., Blasco, R., F. Sobrino und V. Ley.** 1998; Analysis of the B and T cell response in guinea pigs induced with recombinant vaccinia expressing foot-and-mouth disease virus structural proteins. Arch. Virol. 143(2):389–98.
- Sanz-Parra, A., Vazquez, B., Sobrino, F., Cox, S.J., V. Ley und J.S. Salt.** 1999. Evidence of partial protection against foot-and-mouth disease in cattle immunized with a recombinant adenovirus vector expressing the precursor polypeptide (P1) of foot-and-mouth disease virus capsid proteins. J. Gen. Virol. 80:671–9.

- Schmidt, S. und A. Hansen.** 1936. Acta path. microb. Scand. 18, 405:1936.
- Sellers, R.F.** 1955. Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue cultures. Nature 176:547–549.
- Seifert, H.S.H.** 1992. Tropentierhygiene. Gustav Fischer Verlag, Jena. 330-341.
- Smitsaart, E.N., Zanelli, M., Rivera, I., Fondevila, N., Compaired, D., Maradei, E., Bianchi, T., V. O'Donnell und A.A. Schudel.** 1998. Assessment using ELISA of the herd immunity levels induced in cattle by foot-and-mouth disease oil vaccines. Prev. Vet. Med. 33 (1-4):283-96.
- Snowdon, W.A.** 1966. Growth of foot-and-mouth disease virus in monolayer cultures of calf thyroid cells. Nature 210:1079-1080.
- Sobrinho, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M.A., Nunez, J.I., Rosas, M.F., E.**
- Baranowski und V. Ley,** 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known, but a current threat. Vet. Res. 32:1-30.
- Sorensen, K.J., K.G. Madsen und E.S. Madsen.** 1998. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. Arch. Virol. 143(8):1461-1476.
- Sørensen, J.H., Mackay, D.K., C.O. Jensen und A.I. Donaldson.** 2000. An integrated model to predict the atmospheric spread of foot-and-mouth disease virus. Epi. Inf. 124:577–590.
- Sørensen, J.H., Jensen, C.Ø., Mikkelsen, T., D.K. Mackay und A.I. Donaldson.** 2001. Modelling the atmospheric dispersion of foot-and-mouth disease virus for emergency preparedness. Phys. Chem. Earth. 26:93–97.
- Spearman, C.** 1908. The method of right and wrong cases (constant stimuli) without Gauss' formulae. Br. J. Psych. 2:227-242.
- Srinivasan, V.A., Nagendra Kumar, S.B., Madhan Mohan, M., Marondam, V., Santha Kumar, P., Parida, S., J. Horsington und D.J. Paton.** 2006. Preliminary results to evaluate cross-protection between O1 Manisa and O1 Campos in Cattle. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD, Paphos, Cyprus, App. 30.
- Strebel, K. und E. Beck.** 1986. A second protease of foot-and-mouth disease virus. J. Virol. 58(3):893–9.
- Sutmoller, P. und J.W. Mc Vicar.** 1976 Pathogenesis of FMD: the lung as an additional portal of entry of the virus. J. Hyg. 77:235-243.

- Sutmoller, P. und D.J. Vose.** 1997. Contamination of animal products: the minimum pathogen dose required to initiate infection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 16:30-32.
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Nunez, J.I., A. Rodriguez und J.C. Saiz.** 1997. A largescale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.* 71(4):2606–14.
- Tenzin, Dekker. A., Vernooij, H. A. Bouma, und A. Stegeman.** 2008. Rate of Foot-and-Mouth Disease Virus Transmission by Carriers Quantified from Experimental Data. *Risk Analysis* 28(2):303-9.
- Terpstra, C.** 1972. Pathogenesis of foot-and-mouth disease in experimentally infected pigs. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 77:859–874.
- Thomson, G.R., R.G. Bengis und C.C. Brown.** 2001. Picornavirus Infections. In: Williams E.S. und Barker, I. K. (Hrsg.). *Infectious diseases of wild mammals*, 3rd edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 119-130.
- USDA.APHIS.VS.** 1994. Foot-and-mouth disease: Sources of out breaks and hazard categorization of modes of virus transmission. <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cei/Fmdps.pdf>.
- Uttenthal, A., Parida, S., Rasmussen, T.B., Paton DJ, B. Haas und W.G. Dundon.** 2010. Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. *Expert Rev. Vaccines* 9(1):73-87.
- Vakharia, V.N., Devaney, M.A., Moore, D.M., J.J. Dunn und M.J. Grubman.** 1987. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J. Virol.* 61(10):3199–207.
- Valarcher, J.F., N.J. Knowles und V. Saraiva.** 2008. *Transbound Emerg Dis.* 55(1):57-72.
- Vallee, H. und H. Carrel.** 1922. Sur la pluralite des virus aphteux. *C R Acad. Sci. Paris* 174:1498-1500.
- Van Maanen, C. und C. Terpstra.** 1898. Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Immunol. Meth.* 124(1):111-9.
- Van Oirschot, J.T.** 1999. Diva vaccines that reduce virus transmission. *J. Biotechnol.* 73(2-3):195-205.
- Vosloo, W., Bastos, A.D., Kirkbride, E., Esterhuysen, J.J., Janse van Rensburg, D., Bengis, R.G., D.W. Keet und G.R. Thomson.** 1996. Persistent infection of African buffalo

(Syncerus caffer) with SAT type foot-and-mouth disease viruses: rate of fixation of mutations, antigenic change and interspecies transmission. *J. Gen. Virol.* 77:1457-1467.

Wagner, G.C., J.L. Card und K.M. Cowan. 1970. Immunochemical studies of foot-and mouth disease virus. VII. Characterization of foot-and mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. Ges. Virusforsch.* 30:343.

Waldmann, O. und K. Köbe. 1938. zitiert nach Waldmann, J. and N. Zimmermann. 1955. Preparation d'un vaccine anti-aphteux selon la methode de Waldmann et Koebe en employant le veau comme source d'antigène. *Bull. OIE.* 43:723-730.

Waldmann, O. und J. Pape. 1920. Die künstliche Übertragung der Maul- und Klauenseuche auf das Meerschweinchen. *Berl. Tierärztl. Wschr.* 36, 519-520.

Waldmann, O. und J. Pape. 1921. Experimentelle Untersuchungen über Maul- und Klauenseuche. *Berl. Tierärztl. Wschr.* 37:349-354.

Waldmann, O. und K. Trautwein. 1926. Experimentelle Untersuchungen über die Pluralität des Maul- und Klauenseuchevirus. *Berl. Tierärztl. Wschr.* 42:569-571.

Wang, C.Y., Chang, T.Y, Walfield, A.M., Ye, J., Shen, M., Chen, S.P., Li, M.C. Lin, Y.L., Jong, M.H, Yang, P.C., Chyr, N., E. Kramer und F. Brown. 2002. Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine* 20:2603-2610.

Wang, J.-H., Liang, C.-M., Peng, J.-M., Shieh, J.-J., Jong M.-H., Lin, Y.-L., M. Sieber und S.-M. Liang. 2003. Induction of immunity in swine by purified recombinant VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 21:3721-3729.

Wigdorovitz, A., Perez Filgueira, D.M., Robertson, N., Carrillo, C., A.M. Sadir und T.J., Morris. 1999a. Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology* 264(1):85-91.

Wigdorovitz, A., Carrillo, C., Dus Santos, M.J., Trono, K., A. Peralta und M.C. Gomez. 1999b. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology* 255(2):347-53.

Wijnker, J.J., B. Haas und B.R. Berends. 2007. Removal of foot-and-mouth disease virus infectivity in salted natural casings by minor adaptation of standardized industrial procedures, *Int. J. Food Microbiol.* 115:214-219.

Wong, H.T., Cheng, S.C., Chan, E.W., Sheng, Z.T., W.Y Yan und Z.X. Zheng. 2000. Plasmids encoding foot-and-mouth disease virus VP1 epitopes elicited immune responses in mice and swine and protected swine against viral infection. *Virology* 278(1):27-35.

- Wooldridge, M., Hartnett, E., A. Cox und M. Seaman.** 2006. Quantitative risk assessment case study: Smuggled meats as disease vectors, *Rev. Sci. Tech.OIE* 25:105–117.
- Woolhouse, M. und A. Donaldson.** 2001. Managing foot-and-mouth. *Nature* 410(6828):515-6.
- Yang, P.C., Chu, R.M., W.B. Chung und H.T. Sung.** 1999. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. *Vet. Rec.* 145:731–734.
- Zhang, Z.D. Hutching, G., P. Kitching und S. Alexandersen.** 2002. The effects of gamma interferon on replication of with foot-and -mouth disease virus in persistently infected bovine cells. *Arch. Virol.* 147:2157-67.
- Zhidkov, S.A. und V.A. Sergeev.** 1969. A study of the properties of attenuated cold variant of type O foot-and-mouth disease virus. *Vet.* 10:29–31.
- Ziebert, A., Maass, G., Strebel, K., M.M. Falk und E. Beck.** .1990. Infectious Foot-and-Mouth Disease Virus Derived from a Cloned Full-Length cDNA. *J. Virol.* 2467-2473.

6 High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus

High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus

Brehm, K.E.¹, Kumar, N.¹, Thulke, H.- H.² and Haas, B.¹

¹ Friedrich-Loeffler-Institute, Institute of Diagnostic Virology, Südufer 10, 17493 Greifswald – Insel Riems, Germany

² UFZ Helmholtz Centre for Environmental Research, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

Abstract

In a series of 3 homologous and 8 heterologous challenge experiments, it was shown that high potency vaccines against FMD serotype A can induce protection even against heterologous challenge infection with viruses that give low r-values with the vaccine strains.

The challenge virus specific neutralizing antibody response on the day of challenge (21 days post vaccination) generally correlated with protection.

Key words: Foot-and-mouth disease virus, Protection by vaccines, Serology

Introduction

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious infectious disease of cloven-hoofed animals. Typical clinical signs are vesicles and erosions of cutaneous mucosae and hairless parts of the skin, affecting mainly the mouth and the hoofs. In endemically infected countries, there are direct losses due to mortality in young and reduced productivity of adult animals. In industrialized countries that are normally free of FMD without vaccination, the costs of an outbreak associated with eradication and control can reach several billion Euros, in particular if indirect losses due to the imposition of trade and movement restrictions are included. While

FMD was eradicated in Europe during the 1960th to 1980th it still is one of the animal diseases with the highest economic importance due to the catastrophic effect of an outbreak. FMD is endemic in many countries of Asia, Africa, South America and Turkey. The devastating epidemic of 2001 in the UK that spread to Ireland, France and the Netherlands showed again that at any time the disease can be re-introduced into countries that have been free for decades [1, 2].

There are seven different serotypes and multiple variants of FMD virus in circulation worldwide and new variants arise continuously [2]. Current vaccines are inactivated whole virus preparations of a particular strain and the immunity they induce will only protect against a limited range of field strains. This range is maximised by selecting vaccine strains that are as immunogenic and cross reactive as possible. Annual vaccination of cattle, which had contributed to the eradication of the disease in many European countries, was ceased in EU member states in 1991 and replaced by a new control strategy [1, 2]. This strategy consists mainly of stamping out and movement controls and in appropriate cases, emergency vaccination. For obvious ethical reasons, there is a strong desire to reduce reliance on large-scale culling of animals to control future outbreaks of FMD. Since the storage time of formulated vaccines is limited, several countries and groups of countries have established FMD vaccine banks in the form of concentrated viral antigens stored over liquid nitrogen. It is neither economically or logistically feasible to keep vaccine antigens in stock that are pertinent to any given outbreak situation. Therefore, vaccine reserves are established on a prioritised basis according to the likeliest perceived risk. Because it would take several months to produce a new vaccine from a field isolate contingencies must be based on the use of existing vaccines. While it should be attempted to match the vaccine strains as closely as possible to the field strains against which protection is required, often new variants arise against which no such vaccine is readily available. The most accurate way to assess the match between a particular combination of vaccine and field strain is by carrying out a vaccine potency test in vaccinated animals experimentally infecting them with a given FMD challenge strain. However, such heterologous challenge tests to measure cross protection were rarely carried out due to the expenses involved and the time required to obtain results. Results would only be obtained after more than a month while the decision to vaccinate often will have to be made within days. Instead, reliance is usually placed on in vitro tests to compare the reactivity of anti-vaccine virus antisera (bovine post vaccinal sera) with homologous vaccine and field virus, either using a virus neutralisation test (VNT) or an ELISA [3 - 6]. The advantage of

these methods is that they are quick, however, variation between batches of bovine post vaccinal antisera can lead to inconsistent results, there may be discrepancies between the results obtained with VNT and ELISA and it is difficult for such tests to take account of differences in the intrinsic potency of different vaccines [7]. Since there is a lack of experimental cross protection studies [8] we investigated the capability of high potency vaccines to induce protection against heterologous challenge and the correlation of protection and neutralisation titre of post vaccination sera.

Methods

Vaccines

The DOE vaccines were received from Merial, Pirbright, UK. They had been formulated according to the specifications for vaccine bank vaccines from stored antigens. According to the information disclosed by the manufacturer, such vaccines typically contain 4 to 10 µg of antigen per dose. The antigens were taken either from the German or the EU vaccine bank. For the preparation of the A22 vaccine, strain A22Iraq24/64 was used. For the preparation of the AIran96 and AIran99 vaccines, Iranian type A viruses isolated during the respective year were used, but the full designation was considered a commercial secret by the manufacturer and therefore not revealed to the authors.

Cattle

Healthy, unvaccinated German Holstein Friesian and Red Holstein cattle, both male and female, 6-12 months old, were purchased locally and kept in high security stables of the Friedrich-Loeffler-Institute, Riems.

Challenge virus

Starting with low passage cell culture virus received from the WRL for FMD, IAH, Pirbright (A22Iraq24/64, AIran2/97, AIran22/99, AEgypt1/06), a challenge virus (homogenate of tongue lesion material in cell culture medium) was prepared by cattle inoculation into the tongue. The challenge virus was aliquoted, frozen (-70 °C), titrated and tested by cattle inoculation into the tongue for the ability to induce typical clinical signs.

Serology

All sera were tested in virus neutralisation tests (VNT, homologous and heterologous). The tests were performed according to the OIE manual [9]. For all VNTs BHK21 CT cells were used. Every VNT was done at least twice.

Vaccination and Challenge

Vaccination and challenge were carried out according to the FMD monograph of the European Pharmacopoeia [10]. Fifteen cattle were vaccinated intramuscularly (3 groups of 5 cattle received a full dose, ¼ dose or 1/16 dose of vaccine, respectively). Twenty-one days after vaccination, all fifteen cattle together with two unvaccinated control animals were challenged with FMD Virus. After 8 days the test was read. Animals that show lesions at sites other than the tongue were considered as non-protected. The PD50 values were calculated by the Spearman-Kärber method [11].

Determination of r-values

The r-values were determined according to standard procedures by comparing VNT titres of 21 day post vaccination sera and calculated according to definitions published by the World Reference Laboratory for FMD (Pirbright, UK). The r1 value was derived in the conventional manner i.e.:

$$r_1 = \frac{\text{titre of bovine reference serum against field isolate}}{\text{titre of bovine reference serum against homologous reference strain [7]}}$$

Statistical analysis

Frequency data were tested on homogeneity or statistical difference by calculating appropriate Chi² statistics. After demonstrating a relation between factors, observed trends in frequency data were tested according to Pfanzagl [12, 13].

Results

The results of 3 homologous and 8 heterologous challenge experiments are summarized in table 1.

Table 1: Summary of challenge results

Test	Number of protected animals versus					PD 50	r-value
	vaccinated animals						
Vaccine strain/ Challenge strain	2 ml 1/1	0.5 ml 1/4	0.125 ml 1/16	control animals	PD 50 value		
A22Iraq/ A22Iraq	5/5	5/5	5/5	0/2	32		
A22Iraq/ Alran96	5/5	2/5	2/5	0/2	6.06	0.09	
A22Iraq/ AEgypt06	5/5	3/5	3/5	0/2	10.56	0.12	
A22Iraq/ Alran99	5/5	2/5	0/5	0/2	3.84	0.04	
Alran99/ Alran99	5/5	5/5	5/5	0/2	32		
Alran99/ A22Iraq	5/5	4/5	3/5	0/2	13.93	0.10	
Alran99/ Alran96	5/5	5/5	3/5	0/2	18.38	0.23	
Alran96/ Alran99	5/5	4/5	2/5	0/2	10.56	0.12	
Alran96/ A22Iraq	2/5	2/5	1/5	0/2	2	n.a.	
Alran96/ A22Iraq	5/5	4/5	1/5	0/2	8	0.10	
Alran96/ Alran96	5/5	5/5	5/5	0/2	32		
Overall	52/55	41/55	30/55	0/22			

n.a.: not applicable

Vaccine and challenge strain specific group mean VNT titres recorded on 21 d.p.v. are given in table 2.

Table 2: Summary of serological results

**Vaccine strain specific (homologous) and challenge strain specific (heterologous)
group mean VNT titres, 21 d.p.v.**

Vaccine strain/ Challenge strain		2 ml 1/1	0.5 ml 1/4	0.125 ml 1/16	Control animals
A22Iraq	homologous	1.96	1.34	0.86	0.00
A22Iraq	heterologous	0.79	0.00	0.00	0.00
Alran96	homologous	1.82	0.98	0.79	0.00
A22Iraq	heterologous	1.64	1.34	0.87	0.00
AEgypt06	homologous	2.56	1.78	1.14	0.00
A22Iraq	heterologous	1.03	0.61	0.00	0.00
Alran99	homologous	2.39	1.44	1.13	0.00
Alran99	homologous	2.34	1.82	1.49	0.00
Alran99	heterologous	1.05	0.58	0.72	0.00
A22Iraq	homologous	2.03	1.46	1.61	0.00
Alran99	heterologous	1.57	1.36	0.48	0.00
Alran96	homologous	2.21	1.99	1.23	0.00
Alran96	heterologous	0.74	0.00	0.00	0.00
Alran99	homologous	1.66	1.39	0.98	0.00
Alran96	heterologous	0.00	0.60	0.54	0.00
A22Iraq	homologous	1.10	1.40	0.54	0.00
Alran96	heterologous	1.49	0.83	0.77	0.00
A22Iraq	homologous	2.47	2.06	1.52	0.00
Alran96	homologous	2.18	2.08	1.66	0.00

The vaccine specific (homologous) mean VNT titres for the vaccine types were similar, (A22: 2.06; AIran99: 2.19 and A Iran 96). However, for the calculation of these mean titres, two vaccines were omitted – the A22 vaccine used for the AEgypt trial (2.56), which had had been formulated from a different batch of antigen and one AIran96 vaccine (1.10) which had been stored beyond the guaranteed shelf life.

All 3 vaccines gave PD50 values of at least 32 against homologous challenge. In the 8 heterologous challenge experiments, these vaccines also conferred protection, which in 6 out of 8 cases reached or exceeded a value of 6 PD50, despite the r-values determined on the basis of full dose 21 d.p.v. serum titres were between 0.04 and 0.23, indicating a low degree of relatedness between vaccine and challenge strains.

When the interaction of vaccine dose reduction and protection against heterologous challenge was examined, no difference between vaccine strains was found (χ^2 ; $p > 0.8$) and hence the data were pooled. The interaction of vaccine dose and protection (χ^2 Yates corrected; $p < 0.00001$) was studied further and it was found that the probability of protection decreased with decreasing vaccine dose.

Dose	1/1	1/4	1/16	1/∞
Protection	93%	65%	38%	0% ($p < 0.000001$; wcont 0.00000000001 1E-11)

According to Pfanzagl [12, 13] the observed trend was non random (without controls $p < 0.000001$ or $p = 0$ otherwise).

In figure 1, the interaction of challenge virus specific neutralization titre and protection is given for individual animals. The animals are ranked within groups A, B and C according to the neutralization titre. Bars representing protected animals are pointing upright whereas bars representing non protected animals are pointing downwards. For animals without measurable serum antibodies squares above or below the ordinate indicate whether they were protected or not. All 45 animals which had received a homologous vaccine were protected, whereas all 22 unvaccinated control animals showed generalized infection and didn't have measurable antibodies. Within the 120 animals which had received a heterologous vaccine, 55 (87.3 %) of the 63 animals with titres above 0.6 and 23 (40.4 %) of the 57 vaccinated animals without measurable titres were protected.

Figure 1

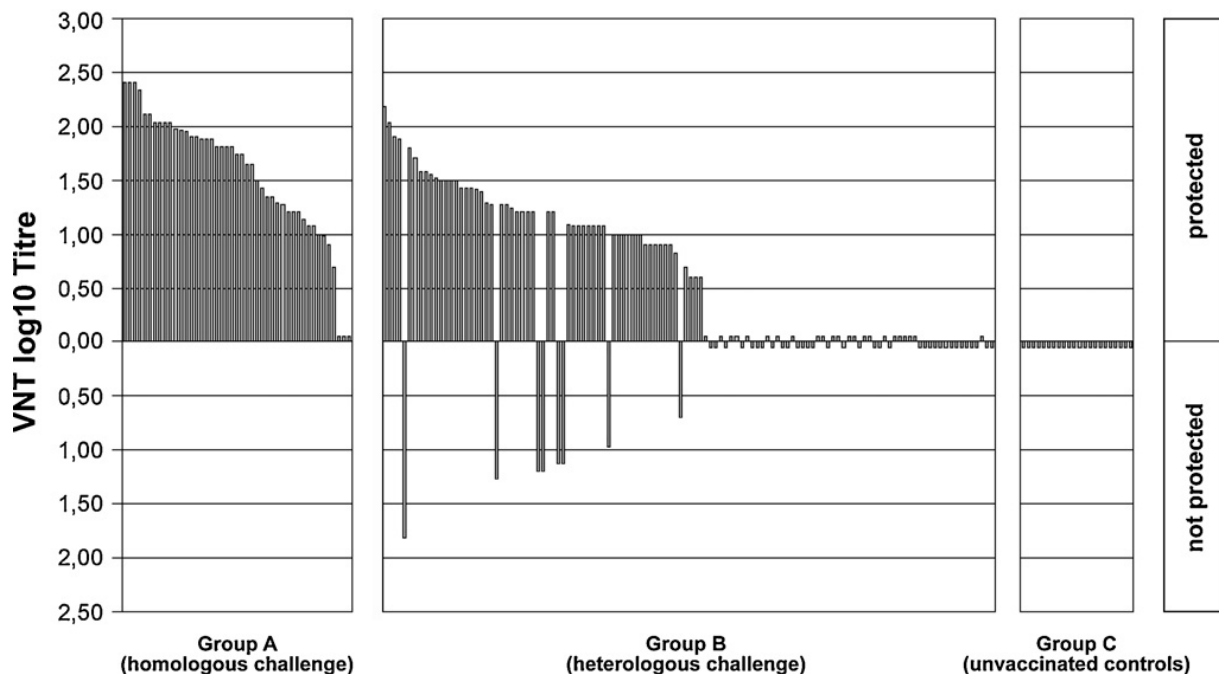


Figure 1: Challenge strain specific VNT titres of individual animals vs. protection. The animals are ranked within groups A (homologous challenge), B (heterologous challenge) and C (unvaccinated controls) according to the neutralization titre. Bars representing protected animals are pointing upright whereas bars representing non protected animals are pointing downwards. For animals without measurable serum antibodies squares above or below the ordinate indicate whether they were protected or not.

The titre-dependent outcome of heterologous challenge experiments was also examined by grouping individual data in 0.5 steps with respect to challenge virus specific titres. This analysis [11, 12] revealed an obvious trend and statistical testing showed that the increase of protection with increasing challenge virus specific titres was non-random ($p < 0.000001$).

Upper interval limit	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Percent protected	44 %	79%	85 %	94 %	100 %

Hence, the 50 % protection threshold would be expected in the log-titre interval from 0.5 to 1.0.

The probit analysis usually applied to evaluate the correspondence between titre and protection for individual data points [14] did not provide useful information for these data due to the lack of quantitative data from animals without measurable titres (i.e. below 0.6) which were already protected in the heterologous challenge with 40.4 % probability.

Therefore, as an alternative way of analysing the relation between titre and protection, the regression of full dose VNT titres and protection (expressed as log PD₅₀ values, calculated on the basis of all three dose groups) was determined as shown in fig. 2. In this figure it was assumed that the PD₅₀ values for the homologous situations are actually 32, resulting in formula of $y = 1.56 x - 0.30$ with a coefficient of correlation of $R^2 = 0.77$.

Discussion

It was shown that high potency FMDV vaccines can induce protection even against clearly heterologous challenge. A statistical analysis confirmed that with decreasing vaccine dose also the level of protection decreased.

Figure 2

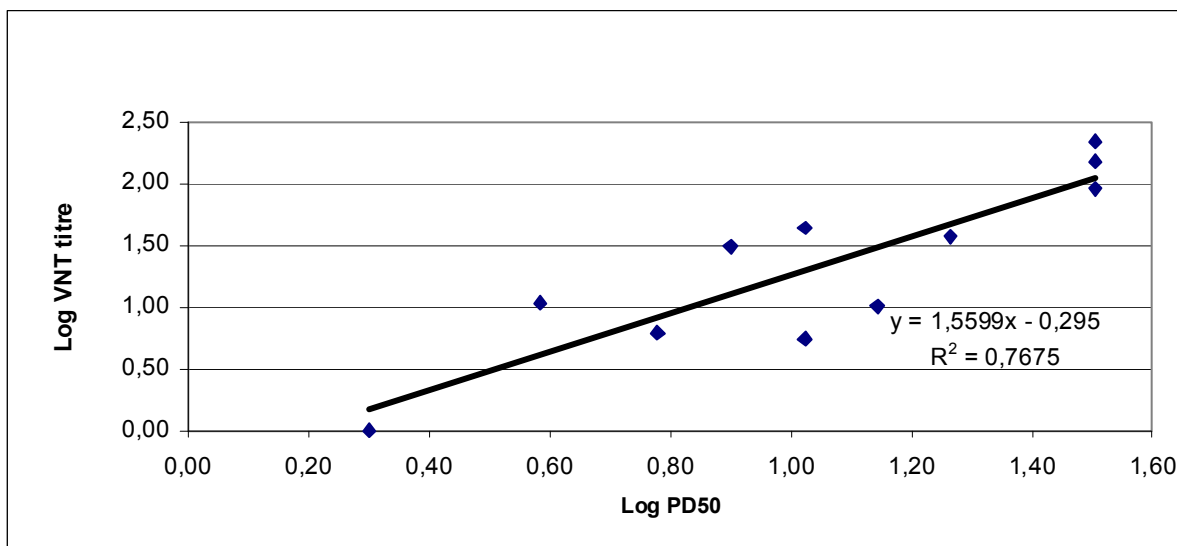


Figure 2: Regression of protection vs. challenge strain specific full dose mean VNT titres (Log PD 50 value vs log titre of full dose group mean).

Furthermore, in vitro neutralization titres were correlated with protection in vivo. Three vaccines with homologous PD₅₀ values of at least 32 showed significant protection even against heterologous challenge with viruses showing r-values below 0.3. In six out of the eight heterologous challenge experiments, the high potency vaccines still conferred a protection of at least 6 PD₅₀. For comparison, it should be mentioned that vaccines with at least 3 PD₅₀ were used in the 1960th during annual vaccination campaigns and for emergency vaccines a PD₅₀ value of at least 6 is required. Therefore, in a situation when vaccination is considered, but no closely related vaccine is available, the usage of a high potency vaccine

may be justified despite low *r*-values. Since new strains are constantly evolving against which sometimes no closely related vaccine is available in vaccine banks [15], this finding is of practical relevance. The main objective of an emergency vaccination after an outbreak in a previously free area is to end or at least significantly reduce the spread of disease. This is achieved by increasing the minimum infectious dose and by reducing the virus shedding by animals that become infected despite vaccination. Tests measuring the protective effect of an FMD vaccine by an experimental set-up that mimics the field situation, e.g. by contact challenge, are difficult to standardize. There is no generally accepted procedure and the variability is even higher than in needle challenge. Therefore, the protective effect of a vaccine usually is determined by needle challenge [10], the parameter measured being protection against generalized disease.

The most thorough serological evaluation of cross protection is provided by the expected percentage of protection (EPP) method [16], which estimates the likelihood that cattle would be protected against a challenge of 10000 infective doses after a single or boosted vaccination. This requires the vaccine in question to have been extensively tested in hundreds of cattle by previous (homologous) challenge tests [5]. However, since this wasn't possible here, it was decided to use the well established needle challenge protocol described in the European Pharmacopoeia monograph [10]. This protocol leads to a quantitative estimate of protection conferred by a vaccine, the PD50 value. Due to the small number of cattle that can be infected under high security conditions, the intrinsic variation of the EP challenge test is high and the 90% confidence intervals of a 10 PD50 value are approximately 4.5 and 22 [17]. Nevertheless, in the absence of a better test, this procedure has been used for decades for vaccine quality control. For vaccine control purposes, the animals are challenged with a virus closely related to the vaccine virus. This procedure can easily be adapted for a heterologous test situation [18].

The results of a heterologous challenge test would only be obtained after more than a month while the decision to vaccinate usually will have to be made within days. Therefore, reliance is usually placed on *in vitro* tests to compare the reactivity of anti-vaccine virus antisera (bovine post vaccinal sera, BVS) with homologous vaccine virus and field virus, using a virus neutralisation test (VNT). While the mechanisms behind protection are certainly more complicated than mere blocking of epitopes and rendering a virus incapable of infecting a cell, it has been shown by numerous authors, that *in vivo* protection correlates with antibody titres measured by VNT or ELISA [14, 19- 23]. Furthermore, on the basis of antibody titres,

r-values can be calculated which are considered a measure of immunological relatedness between virus strains and which support the choice of an appropriate vaccine strain. Barnett et al. [4] considered r-values derived from VNT titres in the range of 0.3 to 1 as indicative of reasonable levels of cross protection. While these guidelines were based on practical experience, experts in the field of FMD vaccination always acknowledged that there is a lack of experimental cross protection studies, in particular studies correlated with serological results [5]. Paton et al. also stated that protection in a heterologous challenge situation is determined by two factors – the degree of relatedness (measured by the r-value) and the potency of a vaccine, usually expressed as PD50 value or probability of protection.

All r-values presented here did not exceed 0.23. They were determined on the basis of full dose group mean titres because in small groups ($n = 5$) an exceptionally high individual titre has a strong influence on the titre of a serum pool. Nevertheless, also the titres for pooled sera were determined and generally led to similar r-values. The only notable difference was found for the AIran96 vaccination / A Iran99 challenge experiment, when the r-value based on pooled sera was 0.3 whereas the r-value based on full dose group mean titres was 0.12.

In our experiments, it was found that in the two experiments with insufficient protection, either no or only low neutralizing antibody titres against the challenge strain were found. The expected tendency was also confirmed when, assuming that the PD50 values for the homologous situations is actually 32, the regression of full dose VNT titres (neglecting the $\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{16}$ groups) and protection expressed as PD50 values was calculated ($y = 1.56 x - 0.30$; $R^2 = 0.77$) (Figure2).

A particular problem for the correlation of the serological response with protection on the level of challenge experiments versus individual animals is the fact that in this study, the endpoints of homologous protection could not be determined since $\frac{1}{16}$ of a 2ml dose clearly is at the limit of what can be administered without an unacceptable error under practical conditions. In order to establish a better provisional basis for such a decision, information on challenge virus specific 21 d.p.v. titres and protection status of individual animals from all experiments were pooled. When the animals were divided into three groups according to whether they had been vaccinated with a homologous or heterologous vaccine or not at all, it was found that all animals which had received a homologous vaccine were protected, irrespective of serum titre, whereas all unvaccinated control animals showed generalized infection and didn't have measurable antibodies. Within the group of animals which had received a heterologous vaccine, there clearly were two subgroups. While 40.4 % of all

animals without measurable titres were protected, protection was found for 87.3 % of all animals with measurable antibodies to the challenge strain – a percentage, which, if achieved in a population, would normally be sufficient to stop the spread of disease. While the results of this study do not yet provide a sufficient statistical basis to establish a probit curve (titre vs. probability of protection), they already can be used to support the decision of the use of a vaccine that will have to be made within days even in the absence of really satisfactory data basis. However, it will have to be investigated if these results for serotype A are also valid for other serotypes. Srinivasan [8] found poor cross protection despite good level of r-values for serotype O.

The VNT titres at which animals are protected are lower than those reported by Barnett et al. [14] for the test systems used at the IAH Pirbright and the ARC-Onderstepoort Veterinary Institute, South Afrika. This confirms that titres obtained by different groups with different test systems can't be directly compared, which also Barnett et al. concluded in their paper. Results of Ahl et al. [23] for homologous challenge indicate that the BHK21-CT cell used here gives lower numerical values for VNT titres compared to the IBRS2 cells used by most groups, but correlated well with protection. Whereas only three of the 45 animals which had been challenged with a homologous virus strain and were protected had no challenge virus specific neutralizing antibodies, 23 out of 120 animals which had been challenged with a heterologous challenge strain were protected in the absence of challenge virus specific heterologous antibodies. The contribution of other factors than neutralizing antibodies might be more important in case of heterologous challenge. There are several possible explanations why vaccinated animals without VNT titres were protected. Possibly, low amounts of antibodies, in particular antibodies induced by a heterologous vaccine, were not detected in the VNT using BHK21-CT cells, but still contribute to protection. Non-neutralizing antibodies, cellular mechanisms and cytokines also may have an impact on protection. [24, 25], and might be even more relevant for protection against heterologous challenge. In particular, IFN-gamma may play an important role for protection against a FMDV infection [26].

In order to create a better scientific basis for the choice of vaccines, it is suggested to analyse the BVS produced during this project also in other laboratories and with other methods for comparison.

The AIran96 vaccination / A22Iraq challenge experiment was performed twice. The first vaccination induced exceptionally low homologous (full dose group mean titre: 1.16) and no measurable heterologous titres of neutralizing antibodies and a low PD50 value of 2 was

observed, possibly because in contrast to all other experiments this vaccine had been stored beyond the guaranteed shelf life. When the experiment was repeated with another batch of vaccine, a homologous full dose group mean titre of 2.47, a heterologous group mean titre of 1.49 and a PD50 value of 8 were found.

It is concluded that at least for FMDV type A, high potency vaccines can induce protection even against clearly heterologous challenge and that challenge virus specific neutralizing antibody titres correlate with protection.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the technical assistance of Bianca Nehmzow and Anja Schulz of the German national reference laboratory for FMD and wish to thank Andreas Froehlich for helpful discussion. We also would like to thank Merial Animal Health Ltd, Pirbright, UK for the vaccines and the Institut for Animal Health, Pirbright, UK for the virus strains. The support of DG Research from the EC is gratefully acknowledged. The study was supported by the EU project FMD_ImproCon, grant SSPE-CT-2003-503603.

References

- [1] Leforban Y, Gerbier G. Review of the status of foot and mouth disease and approach to control/eradication in Europe and Central Asia *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2002, 21 (3), 477-492.
- [2] Kitching RP. Global epidemiology and prospects of control of foot-and-mouth disease. In: Mahy BWJ, editor. *Foot-and mouth disease virus (Current topics in microbiology and immunology)*, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, CTMI (2005) 288:133-148.
- [3] Kitching RP, Rendle R, Ferris NP. Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 1988; 6:403-408.
- [4] Barnett PV, Samuel AR, Statham RJ. The suitability of the 'emergency' foot-and-mouth disease antigens held by the International Vaccine Bank within a global context. *Vaccine* 2001 Feb 28; 19(15-16):2107-17.
- [5] Paton DJ, Valarcher JF, Bergmann I; Matlho OG, Zakharov VM, Palma EL, Thomson GR. Selection of foot-and-mouth disease vaccine strains - a review. *Rev Sci Tech* 2005 Dec; 24; 3:981-93.
- [6] Ferris NP, Donaldson AI. The World Reference Laboratory for foot-and-mouth disease: review of thirty-three years of activity (1958-1991). *Rev sci tech Off int Epiz* 1992; 11:657-684.
- [7] Kitching RP, Kowles NJ, Samuel AR, Donaldson AI. Development of foot-and-mouth disease virus strain characterisation – a review. *Trop Anim Hlth Prod* 1989; 23:153-166.
- [8] Srinivasan VA, Nagendra Kumar SB, Madhan Mohan M, Marondam V, Santha Kumar P, Parida S, Horsington J, Paton DJ. Preliminary results to evaluate cross-protection between O1 Manisa and O1 Campos in Cattle. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD, Paphos, Cyprus 15th - 21st October 2006; App. 30.

- [9] OIE (Office International des Epizooties/World Organisation for Animal Health) (2004) Foot and mouth disease. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 5th ed. OIE Standards Commission. Paris, France, Office International des Epizooties. Chapter 2.1.1.
- [10] European Pharmacopoeia. Foot-and-mouth disease (ruminants) vaccine (inactivated) 04/2005:0063. 5th ed., Version 5.5; 2006.
- [11] Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch Exp Pathol Pharmacol 1931; 162:480-3.
- [12] Pfanzagl J. Über die Existenz überall trennscharfer Tests. Metrika Vol.3; 1; 1960:169–176.
- [13] Pfanzagl J. Überall trennscharfe Tests und monotone Dichtequotienten. Z. Wahrscheinlichkeitstheorie verw. Geb. 1, 1963:109–115.
- [14] Barnett PV, Statham RJ, Vosloo W, Haydon DT. Foot-and mouth disease vaccine potency testing: determination and statistical validation of a model using a serological approach. Vaccine 2003; 21:3240-8.
- [15] Wadsworth J, Knowles NJ, Swabey KG, Stirling JM, Statham RJ, Li Y, Hutchings GH, Ferris NP, Paton DJ. Recent spread of new strains of foot-and-mouth disease virus type A in the Middle East and North Africa. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD, Paphos, Cyprus 15th - 21st October 2006.
- [16] Alonso FA, Casa Olascoaga RC, Astudillo VM, Sondahl MS, Gomes I, Vianna Filho YL. Updating of foot-and-mouth disease virus strains of epidemiological importance in South America. Bol. Cent. Panam. Fiebre aftosa, 1987; 53:11-18.
- [17] Goris N, Merkelbach-Peters P, Diev VI, Verloo D, Zakharov VM, Kraft H-P, De Clercq K, European Pharmacopoeia foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle: Between test variability and its consequences. Vaccine 2007; 25:3373-3379.
- [18] Doel T. FMD Vaccine Strain Selection and Development Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD Chania, Crete, Greece 12-15 October 2004, pp 355-357.
- [19] Pay TWF, Parker NJ. Some statistical and experimental design problems in the assessment of FMDV vaccine potency. Dev Biol Stand 1977; 35:369.
- [20] Pay TWF, Hingley PJ. The use of serum neutralising antibody assay for the determination of the potency of foot-and-mouth disease vaccines in cattle. Dev Biol Stand 1986; 64:153-161.
- [21] Van Maanen C, Terpstra C. Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. J Immunol Methods 1989; 13; 124(1):111-9.
- [21] Smitsaart EN, Zanelli M, Rivera I, Fondevila N, Compaired D, Maradei E, Bianchi T, O'Donnell V, Schudel AA. Assessment using ELISA of the herd immunity levels induced in cattle by foot-and-mouth disease oil vaccines. Prev Vet Med 1998; 33 (1-4):283-96.
- [23] Ahl R, Haas B, Lorenz RJ, Wittmann G. Alternative potency test of FMD vaccines and results of comparative antibody assays in different cell systems and ELISA; In: Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Lindholm, Denmark; June 25-29th., 1990.

[24] Cox SJ, Aggarwal N, Statham RJ, Barnett PV. Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine* 2003 Mar 28; 21(13-14):1336-47.

[25] Parida S, Oh Y, Reid SM, Cox SJ, Statham RJ, Mahapatra M, Anderson J, Barnett PV, Charleston B, Paton DJ. Interferon-gamma production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. *Vaccine* 2006 Feb 13; 24(7):964-9.

[26] Oh Y, Charlston B, Paton DJ, Park JH, Barnett PV, Joo YS, Parida P. Importance of cell mediated immunity for protection against Foot and Mouth Disease. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EUFMD, Paphos, Cyprus 15th - 21st October 2006;App.34.

Die Co-Autoren haben folgenden Anteil an den Arbeiten, die der Publikation zugrunde liegen: Herr Dr. Kumar führte zwei der Tierversuche durch, Herr Dr. Thulke half bei der Berechnung des P-Wertes und der weiteren statistischen Auswertung und Herrn Dr. Haas oblag die Betreuung.

7 Highly sensitive fetal goat tongue cell line for detection and isolation of foot-and-mouth disease virus

Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus

Brehm, K.E.¹, Ferris, N.P.², Lenk, M.³, Riebe, R.³ and Haas, B.¹

¹ Friedrich-Loeffler-Institute, Institute of Diagnostic Virology, Südufer 10,
17493 Greifswald – Insel Riems, Germany

² Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Surrey GU24 0NF,
UK

³ Friedrich-Loeffler-Institute, Institute of Infectology, Südufer 10,
17493 Greifswald – Insel Riems, Germany

Abstract

A fetal goat cell line (ZZ-R 127) supplied by the Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine of the Friedrich-Loeffler-Institute was examined for its susceptibility to infection by foot-and-mouth disease virus (FMDV) and by two other viruses causing clinically indistinguishable vesicular conditions, namely the viruses of swine vesicular disease and vesicular stomatitis. Primary bovine thyroid (BTY) cells are generally the most sensitive cell culture system for FMDV detection but are problematic to produce, particularly for laboratories that infrequently perform FMD diagnostic tests and for those in FMD endemic countries that face problems in sourcing thyroid glands from FMD-negative calves. Strains representing all seven serotypes of FMDV could be isolated in ZZ-R 127 cells with a sensitivity that was considerably higher than that of established cell lines and within 0.5 log of that for BTY cells. The ZZ-R 127 cell line was found to be a sensitive, rapid and convenient tool for the isolation of FMDV and a useful alternative to BTY cells for FMD diagnosis.

Key words: Foot and mouth disease virus, virus isolation, cell culture, diagnosis

Introduction

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious infectious disease of cloven-hoofed animals. Typical clinical signs are vesicles and erosions of cutaneous mucosae and hairless parts of the skin, affecting mainly the mouth and the hoofs. While FMD was effectively eradicated from Europe by 1990, the disease retains its status of having the highest economic importance due to the catastrophic effect of an outbreak. FMD is endemic in many countries of Asia, Africa, South America and the Middle East. There are seven different serotypes and multiple variants of the virus circulate worldwide with new variants arising continuously. Current vaccines are based on inactivated whole virus preparations of a particular strain and the immunity they induce only protects against a limited range of field strains. Although for diagnostic purposes, virus isolation may nowadays often be replaced by real-time PCR, it is still a crucial first step for the isolation and characterization of new isolates and the selection of a suitable vaccine. Furthermore for some countries that do not have established RT-PCR in their laboratories, virus isolation is still the most sensitive assay for FMDV.

While infective FMD virus (FMDV) is usually present in high concentrations in fresh vesicular material, amounts found in older lesions, sera, nasal swabs, saliva and oropharyngeal (probang) samples are much lower, necessitating highly sensitive assay systems for their detection. Currently, the most sensitive cell culture system for FMDV isolation is the primary bovine thyroid (BTY) cell (11, 3, 27). However, primary BTY cells cannot be passaged or easily frozen without impairing their sensitivity (unpublished results). Ensuring that there is always a fresh and suitable batch of primary BTY cells available for diagnostic work is quite laborious and expensive (9). Therefore, most diagnostic laboratories use other cells which are less susceptible to FMDV infection but more convenient to handle, such as other primary cells of bovine, ovine or porcine origin or permanent cell lines such as BHK-21 (4, 21) or IB-RS-2 (5, 6) and sometimes PK 15 cells or SK 6 cells (18).

A study was performed to evaluate a novel fetal goat tongue cell line (ZZ-R 127) from the Friedrich-Loeffler-Institute (FLI) Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV) as an FMD diagnostic tool. Experiments were conducted both at the FLI, Insel, Riems, Germany and at the Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory (IAH), UK and the results are hereby presented.

Methods

1. Cells

In Germany, cells were obtained from the Institute of Infectology of the FLI, which maintains a collection of cell lines for veterinary medicine. Each cell of this collection is identifiable by a distinct CCLV-RIE-number (Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine). In this study, we compared IB-RS-2 cells (pig kidney, adult, CCLV-RIE 103) and the BHK-subline BHK-21/CT cells (baby hamster kidney, CCLV-RIE 164) with a novel fetal goat tongue cell line (ZZ-R 127, CCLV-RIE 127). The history of the ZZ-R 127 cell line is as follows: very small pieces from the mucosa of the tip of a goat tongue were used as explants to initiate a cell culture. An outgrowth of polymorphic cells but mostly epithelial-like cell types was observed. After a crisis between the 25-30th subculture, there was alteration to permanence and cells could be multiplied continuously maintaining their polymorph epithelial-like morphology.

The species derivation of all CCLV cell lines used in this report has been confirmed by sequencing a part of cytochrome b gene which is contained in mitochondrial DNA (28).

The fetal goat tongue cells (ZZ-R 127) were passaged with Iscove's DMEM and Ham's F12 1:1, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), pH 7.2 – 7.4; in a split ratio of 1:2. Cell growth took one week at 37°C and 4-6% CO₂ incubation to develop a confluent monolayer. After medium change, the cell monolayer was stable at 37°C for at least 21 and up to 28 days. The seeding density was approximately 5.2×10^4 cells/cm².

The IB-RS-2 cells were passaged with a mixture of MEM (Eagle) in Hanks' BSS and MEM (Eagle) in Earle's BSS 1:1; supplemented with 1.25 g/L NaHCO₃, NEAA, 120 mg/L Na-Pyruvat, 10% FCS, pH 7.2 – 7.4; for CO₂ incubation DMEM is suitable, in a split ratio of 1:4 – 1:6. Cell growth took 56-72 hours at 37°C and 4-6% CO₂ incubation to form a continuous monolayer. After medium change, the cell monolayer was stable at room temperature for at least 14 days.

The BHK-21/CT cells were passaged with a mixture of MEM (Eagle) in Hanks' BSS and MEM (Eagle) in Earle's BSS 1:1; supplemented with 1.25 g/L NaHCO₃, NEAA, 120 mg/L Na-Pyruvate, 10% FCS, pH 7.2-7.4; for 5% CO₂ incubation DMEM is suitable; in a split ratio of 1:6 – 1:10. Monolayers took from 48-56 hours at 37°C and 4-6% CO₂– to complete, showing a regular picture with slight orientation. The stability of the monolayer at 37°C was limited – after medium change and placing them at room temperature – to approximately 10 days.

At the IAH, BTY cells and IB-RS-2 (two sub-clones, termed A and B) were grown as described previously (9, 11).

2. Viruses

Virus isolates of all seven serotypes of FMD were taken either from the German national reference laboratory collection or from the collection of the WRL for FMD.

At the FLI, cell culture supernatants of O₁ Manisa, A Iran 97, A₂₂ Iraq, C₁ Noville, Asia 1 Shamir, SAT 1 Zimbabwe, SAT 2 Zimbabwe, SAT 3 Zimbabwe (Table 1, 2) and bovine epithelia of A₈₇ Castellanos, Asia 1 Shamir, A₂₂ Iraq, A₂₄ Cruzeiro, C₁ Noville, O₁ Manisa, A Iran 99 (Table 3) were titrated in BHK-21, IB-RS-2 and ZZ-R 127 cells. The susceptibility of ZZ-R 127 cells for porcine epithelia of O₁ Manisa, Asia 1 Shamir, A₂₂ Iraq and A Iran 97 and further 25 FMDV cell culture supernatants of various strains (A Turkey 1/2006, A Turkey 10/96, A Argentina 5/2001, A Jordan 3/2006, A Eritrea 2/98, A Malaysia 10/97, A Argentina 1/2001, A₅ Modena, A Egypt 1/2006, O Greece 96, O Israel 2/2007, O Algeria 1/99, A Taiwan 3/97, O Taiwan 1/99, O South Korea 1/2000, O₁ BFS 1860, O Albania 1/96, O Pakistan 2/97, O Iran 16/97, O Bulgaria 1/96, O Turkey 5/2005, O United Kingdom 10/2001, O United Kingdom 34/2001, O Japan 2000, C Oberbayern) was investigated without titration.

In addition, the ZZ-R 127 cells were inoculated with SVDV and VSV of serotypes Indiana and New Jersey.

At the IAH, epithelial suspensions of FMDV types O UAE 2/2003, A IRN 7/97, C₃ Resende, SAT 1 TAN 44/99, SAT 2 ERI 9/98, SAT 3 BEC 1/65 and Asia 1 MAY 14/92, SVDV UKG 155/80 and VSV-New Jersey, Montrose were titrated on BTY, IB-RS 2 and ZZ-R 127 cells (Table 4).

3. Virus isolation procedures

At the FLI, samples of all seven FMDV serotypes were tested. The virus isolation was performed according to the OIE manual (12). Virus isolation was performed on freshly prepared confluent monolayers. Either 24 well plates or T 12.5 cm² flasks were used. After removing the medium except for a minimal residual volume, monolayers were incubated with aliquots of FMDV samples (240µl) for 1 hour at 37°C on a swivel plate. Afterwards, fresh medium without fetal calf serum was added and the cultures were incubated for 48 hours at 37°C and 5% CO₂. Monolayers were observed microscopically for evidence of a cytopathic effect (CPE), a preliminary reading was carried out after 24 hours and a final reading after 48 hours. The test was considered valid if a CPE was observed within 48 hours in the FMDV

positive control, which contained approximately 10 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) and no CPE was observed in the negative control. The specificity of a CPE was confirmed by antigen ELISA (8) performed according to the OIE manual (12). In a few cases, a real-time RT-PCR procedure was additionally performed (24, 25). In order to determine the sensitivity of the cells for FMDV, fourfold virus dilutions were prepared in tubes and each dilution was transferred to four wells of 24 well plates. Titres were calculated by the Spearman-Kärber method (17).

At the IAH, ten percent suspensions of vesicular epithelium representing each of the seven serotypes of FMDV plus SVDV and VSV were prepared as previously described (8). The suspensions were clarified by centrifugation and mixed with an equal volume of glycerol (50%, w/v) and resulting stocks stored at -20 °C. The virus isolates that were employed are shown in Table 4.

Comparative titrations of viruses were performed in ZZ-R 127, primary BTY and IB-RS-2 cells. Tenfold dilution series of each epithelial suspension were made in 0.04 M phosphate buffer and inoculated onto cell monolayers (pre-washed with phosphate buffered saline and overlaid with 2 ml of serum-free Eagle's maintenance medium) grown in plastic tubes (0.2 ml per tube, 4 tubes per serial tenfold dilution) and subsequently rolled continuously at 37 °C. The cell cultures were examined microscopically for evidence of CPE daily for up to 4 days post inoculation and titres of each virus stock expressed as TCID₅₀/ml.

The specificity of virus serotype of random cell culture supernatant antigens arising from the virus titrations was confirmed by ELISA (8).

Results

In order to determine whether the new ZZ-R 127 cell line possesses a higher sensitivity than established cell lines, the infectivity titres of cell culture supernatants were determined at the FLI Riems, in three different cell lines at various time points following sample inoculation. As can be seen from Table 1, the titres recorded in ZZ-R 127 cell were consistently higher than in the other permanent cell lines, the general range of increase being between 0.9 to 4.0 log₁₀.

Table 1: Titration of cell culture grown FMDV in routinely produced cells of BHK and IB-RS-2 cells in comparison with fetal goat cells (ZZ-R 127) at the FLI

Serotype	Celltype	24h Titre	48h Titre	Difference in virus titre to ZZ-R 127 cells
O ₁ Manisa	ZZ-R 127	5.0 ^a	5.9	
	BHK-21	n.a.	4.2	-1.7
	IB-RS-2	n.a.	4.8	-1.1
A Iran 97	ZZ-R 127	5.5	8.2	
	BHK-21	n.a.	4.8	-3.4
	IB-RS-2	n.a.	5.9	-2.3
A ₂₂ Iraq	ZZ-R 127	5.9	7.2	
	BHK-21	n.a.	4.4	-2.8
	IB-RS-2	n.a.	5.1	-2.1
C ₁ Noville	ZZ-R 127	4.9	7.4	
	BHK-21	n.a.	6.5	-0.9
	IB-RS-2	n.a.	6.5	-0.9
Asia 1 Shamir	ZZ-R 127	7.9	8.6	
	BHK-21	n.a.	6.7	-1.9
	IB-RS-2	5.2	6.7	-1.9
SAT 1 Zimbabwe	ZZ-R 127	6.1	7.0	
	BHK-21	n.a.	4.2	-2.8
	IB-RS-2	n.a.	4.2	-2.8
SAT 2 Zimbabwe	ZZ-R 127	5.5	7.0	
	BHK-21	n.a.	4.2	-2.8
	IB-RS-2	n.a.	4.2	-2.8
SAT 3 Zimbabwe	ZZ-R 127	7.3	7.9	
	BHK-21	n.a.	n.a.	n.a.
	IB-RS-2	n.a.	6.0	-1.9

Footnotes: n.a. = not applicable (CPE was not evident in these systems at this stage)

^a Virus titre, log₁₀ TCID₅₀/ml

Table 2 shows the progress of virus replication over time and a range of virus dilutions in a semi quantitative way. With a few exceptions seen in the highest dilutions, virus replication could be detected in ZZ-R 127 cells after 18-24 hours by the recognition of the development of a CPE, whereas consistently almost no CPE could be observed in BHK-21 and IB-RS-2 cells at this stage. After 48 hours, there was CPE in all three cell lines, but still in ZZ-R 127 cells there were a higher number of CPE positive wells, in particular with the type SAT 2 and SAT 3 FMDV titrations.

Table 2: Development of cytopathic effect arising from the titration of cell culture grown FMDV in routinely produced cells of BHK and IB-RS-2 cells in comparison with fetal goat cells (ZZ-R 127) at the FLI

ZZ-R 127 cells	CPE											
	24 hours						48 hours					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
O ₁ Manisa	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+
A Iran97	+++	++	++	++	+	-	+++	+++	++	+++	+++	+++
A ₂₂ Iraq	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C ₁ Noville	++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Asia 1 Shamir	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SAT 1 Zimbabwe	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
SAT 2 Zimbabwe	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SAT 3 Zimbabwe	+++	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++

BHK-21 cells	CPE											
	24 hours						48 hours					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
O ₁ Manisa	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+	-	-
A Iran97	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+	-	-
A ₂₂ Iraq	-	-	-	-	-	-	+++	++	+	+	-	-
C ₁ Noville	-	-	-	-	-	-	+++	++	++	+	-	-
Asia 1 Shamir	-	-	-	-	-	-	+++	++	++	+	-	-
SAT 1 Zimbabwe	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
SAT 2 Zimbabwe	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
SAT 3 Zimbabwe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-

IB-RS-2 cells	CPE											
	24 hours						48 hours					
	A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
O ₁ Manisa	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	+	-	-
A Iran97	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
A ₂₂ Iraq	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-
C ₁ Noville	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++
Asia 1 Shamir	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-
SAT 1 Zimbabwe	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
SAT 2 Zimbabwe	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
SAT 3 Zimbabwe	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-

Footnotes:

A, B, C, D, E, F: dilutions in log 0.6 steps

- no CPE detected

+++ CPE affecting > 60% of monolayer

++ CPE affecting between 20-60% of monolayer

+ CPE affecting < 20% of monolayer

In order to confirm further the suitability of ZZ-R 127 cells for the isolation of FMDV and test a broader range of isolates, the cells were inoculated with 25 additional cell supernatants without titration. In all but one cases, the cells were susceptible to infection with the FMDV isolates and a strong CPE was observed within 24 hours. The exception was the strain A TAW 3/97, which is completely pig specific and does not infect cattle under field conditions. It did not produce a clear CPE in ZZ-R 127 cells, but led to the development of CPE in IB-RS-2 cells.

In order to exclude that these results are artefacts that only apply to cell culture adapted FMDVs, at the FLI, all three cell lines were inoculated with different fourfold dilutions of bovine vesicular material (i.e. “wild-type FMDV”) of A₈₇ Castellanos, Asia 1 Shamir, A₂₂ Iraq, A₂₄ Cruzeiro, C₁ Noville, O₁ Manisa and A Iran 99 and the results are shown in Table 3.

Table 3: Development of cytopathic effect arising from the titration of epithelial suspensions of FMDV in routinely produced cells of BHK and IB-RS-2 cells in comparison with fetal goat cells (ZZ-R 127) at the FLI

ZZ-R 127	CPE									
	24 hours					48 hours				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
A ₈₇										
Castellanos	+	+	-	-	-	+	+	+		
Asia 1 Shamir	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
A ₂₂ Iraq	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
A ₂₄ Cruzeiro	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
C ₁ Noville	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
O ₁ Manisa	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
A Iran 99	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

BHK-21	CPE									
	24 hours					48 hours				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
A ₈₇										
Castellanos	-	-	-	-	-	+				
Asia 1 Shamir	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
A ₂₂ Iraq	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
A ₂₄ Cruzeiro	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
C ₁ Noville	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
O ₁ Manisa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A Iran 99	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

IB-RS-2	CPE									
	24 hours					48 hours				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
A ₈₇										
Castellanos	-	-	-	-	-	+				
Asia 1 Shamir	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
A ₂₂ Iraq	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
A ₂₄ Cruzeiro	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
C ₁ Noville	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
O ₁ Manisa	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
A Iran 99	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Footnotes:

A, B, C, D, E: dilutions in log 0.6 steps

- no CPE detected

+ CPE detected

After 24 hours, a CPE could be observed for each sample in ZZ-R 127 cells, but not in IB-RS-2 cells whereas in BHK-21 cells only Asia 1 Shamir, A₂₄ Cruzeiro and C₁ Noville led to the development of CPE. Subsequently, CPE could be observed in all 3 cell lines at 48 hours post inoculation.

Furthermore, the susceptibility for pig-passaged virus was checked with vesicular material from pigs (O₁ Manisa, Asia 1 Shamir, A₂₂ Iraq and A Iran 97). All four isolates showed a CPE in ZZ-R 127 cells after 24 hours, whereas only the A Iran 97 isolate showed a CPE in IB-RS-2 cells at this time. No CPE developed after inoculation with SVDV UKG and VSV of serotypes Indiana and New Jersey.

At the IAH, epithelial suspensions of FMDV O UAE 2/2003, A IRN 7/97, C₃ Resende, SAT 1 TAN 44/99, SAT 2 ERI 9/98, SAT 3 BEC 1/65 and Asia 1 MAY 14/92 were titrated on ZZ-R 127 cells in comparison to primary BTY cells as well as IB-RS-2 cells and the results are shown in Table 4. Strains representing all seven serotypes of FMDV could be isolated on ZZ-R 127 cells with a sensitivity that was higher than that of IB-RS-2 cells. By calculating the mean of the titres in ZZ-R127 and BTY cells respectively, the sensitivity of the goat cells was found to be approximately 0.5 log lower than the sensitivity of primary BTY cells. No CPE was observed after inoculation of ZZ-R 127 cells with SVDV UKG 155/80, while VSV New Jersey led to the development of CPE but only at a high concentration of virus inoculum.

Table 4: Titration of epithelial suspensions of FMDV, SVDV and VSV in routinely produced IB-RS-2 and primary BTY cells in comparison with fetal goat tongue cells (ZZ-R 127) at the IAH

Cell culture type	Virus								
	FMDV			SVDV			VSV		
	O UAE 2/2003	A IRN 7/97	C3 Resende	SAT 1 TAN 44/99	SAT 2 ERI 9/98	SAT 3 BEC 1/65	Asia 1 MAY 14/92	UKG 155/80	VSV – New Jersey
IB-RS-2 (A)	5.7 ^a	6.2	2.95	6.95	6.45	3.45	6.2	4.45	n.d.
IB-RS-2 (B)	5.2	6.2	2.45	6.45	5.2	3.95	5.95	5.7	4.2
Goat tongue ZZ-R 127	5.95	6.45	3.7	6.7	6.7	4.95	6.2	≤2.2	2.2
BTY	5.95	6.7	4.45	7.2	7.2	5.7	6.2	n.d.	1.95

Footnotes:

^a Virus titre, log₁₀ TCID₅₀/ml

FMDV, foot-and-mouth disease virus

SVDV, swine vesicular disease virus

VSV, Vesicular stomatitis virus

IB-RS-2, permanent cell line of pig kidney cells (subclones A and B)

BTY, primary bovine thyroid cells

Discussion

In general, the most sensitive cells for FMD virus isolation are primary BTY cells. However, ensuring their constant availability for diagnostic purposes is laborious and expensive and there are also batch-to batch variations in their quality and fitness for purpose. Therefore, most diagnostic laboratories use other cells which are less sensitive but more convenient to handle, such as cells of bovine, ovine or porcine origin or permanent cell lines as BHK-21 or IB-RS-2. These protocols do not usually facilitate a reliable or overnight amplification and detection of virus.

Since more reliance is now being placed on real-time RT-PCR procedures for FMDV diagnosis and less on virus isolation, FMD laboratories that might use them are even less likely than in the past to maintain the propagation of primary BTY cells on a regular basis. If primary BTY cells are not then routinely produced, the danger is that the skills for their

propagation will become lost or not so easily used. As for a disease as contagious as FMD, one would like to have a sensitive system in reserve for emergency situations and not rely entirely on PCR, it will be important to have a cell line of equivalent or near equivalent sensitivity to BTY cells that can either be routinely maintained or else quickly resuscitated from the freezer to be made available for diagnostic use. Furthermore, procedures for the vaccine strain selection require isolation of the virus causing the outbreak. As time is a crucial factor for emergency vaccination, saving even one or two days can make a significant difference to control measures that are adopted.

In this study, we have shown that a fetal goat tongue cell line (ZZ-R 127) was found to be highly sensitive to FMDV replication of both wild-type and cell adapted virus. The cell line was validated as a tool for FMDV isolation in co-operation with the IAH. Strains representing all seven serotypes of FMDV could be isolated on ZZ-R 127 cells with a sensitivity that was only slightly inferior to that of the BTY cell but significantly higher than that of BHK-21 or IB-RS-2 cells. In total 40 isolates (14 type A, 16 type O, 2 type C, 2 type Asia, 2 type SAT 1, 2 type SAT 2 and 2 type SAT 3) could be grown on ZZ-R 127 cells and the results suggest that the cell line has suitable susceptibility to a broad range of FMDV strains. FMDV infection was almost always detected by visual means within 18-24 hours in the first passage, whereas in BHK-21 and IB-RS-2 cells, the detection of low amounts of FMDV often took several days and may have required additional cell culture passages.

It was concluded, that the fetal goat tongue cell line is a sensitive, fast and convenient tool for the isolation of foot-and-mouth-disease virus (FMDV), which almost matches the sensitivity of the BTY cell, with significant advantages over established permanent cell lines.

While the experiments described in this study were done with the 76th to 91th passage (FLI) and the 141st to 142nd passage (IAH), the fetal goat tongue cell line maintains its growth characteristics and its sensitivity for FMDV at least from the 76th to the 160th passage and its properties are not dependent on type of vessel or plastic ware used (data not shown). It is possible to resuscitate the cells of a high density working stock in a way that within one to two days, a susceptible monolayer is achieved.

While no replication of SVDV UKG was observed in the ZZ-R 127 cells, VSV led to the development of CPE when the virus was present in high concentration. As the new goat cell line is not proposed as a diagnostic tool for SVD or vesicular stomatitis but for FMDV, this is not considered a disadvantage. At the FLI and the IAH, all material of porcine origin is tested also on a porcine cell susceptible for SVDV. The inoculation of any material of porcine origin

onto a suitable cell of porcine origin is also necessary because some highly pig-adapted strains (e.g. TAW 3/97) do not grow well on cells derived from other species, including the ZZ-R 127 cell. On the other hand, the FMD-specificity of any CPE observed will always have to be checked by ELISA or PCR.

The reason why susceptibility of the goat cell line ZZ-R 127 is considerably higher than that of other permanent cell lines is not yet known. An important factor which determines the susceptibility of a cell for a particular virus is the expression of suitable surface receptors on the cell surface. Integrin molecules are receptors for a number of viruses including field isolates of FMDV (14, 16, 20, 23). Integrins are heterodimers comprising alpha and beta subunits, each of which can occur in a number of different forms. Six or seven different varieties of integrin are known to bind to the conserved RGD amino acid motif found on the VP1 capsid protein of FMDV. The integrin $\alpha\beta6$ is considered to be the principal receptor for binding wild-type FMDV (15, 10). Beside integrins, heparan sulphate proteoglycans (HSPGs) (13) are used by FMDV for cell attachment and virus replication (22). However, there is no convincing evidence of a role for HSPG in cell entry by field viruses (1, 2, 7, 18, 23, 26). In order to exclude that the higher susceptibility of the cell line ZZ-R 127 is due to HSPGs and does not apply to field virus, epithelial suspensions containing FMDV were also included in this study. The results confirmed what was found with cell culture supernatants. Comparative receptor studies with the three cell lines have been initiated and preliminary results indicate that over 90% of ZZ-R127 cells express the $\alpha\beta6$ receptor (own unpublished FACS data). The overall results suggest that the ZZ-R 127 cell line is a cell line of almost equal sensitivity to primary BTY cells for FMD virus isolation and could be introduced into FMD diagnostic laboratories worldwide to improve local FMDV isolation procedures.

The cell line (ZZ-R, goat, tongue epithelium, fetal, Catalogue No.:RIE 127) is available from the Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV), Friedrich-Loeffler-Institute, 17493 Greifswald – Insel Riems, Tel.: +49 38352 7260; Fax: +49 38351 7151; e-mail: matthias.lenk@fli.bund.de.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the technical assistance of Bianca Nehmzow of the German national reference laboratory for FMD. The support of DG Research from the EC is gratefully acknowledged. The study was supported by the EU project FMD_ImproCon, grant SSPE-CT-2003-503603 and the Department for the Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA; project numbers SE1120 and SE1123).

References

- (1) Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdaguer, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck, and E. Domingo. 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* 72:6362–6372
- (2) Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, N. Sevilla, D. Andreu, E. Beck, and E. Domingo. 2000. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J. Virol.* 74:1641–1647
- (3) Burrows, R., J. A. Mann, A. Greig, W.G. Chapman, and D. Goodridge. 1981. The pathogenesis of natural and simulated natural foot and mouth disease infection in cattle. *J. Comp. Path.* 91:599-609
- (4) Clarke, J. B., and R. E. Spier. 1980. Variation in the susceptibility of BHK populations and cloned cell lines to three strains of foot-and-mouth disease. *Archives of Virology* 63:1-9
- (5) De Castro, M. P. 1964. Comportamento do vírus aftoso em cultura de células: susceptibilidade da linhagem de células suínas IB-RS-2. *Archivos do Instituto Biológico, São Paulo* 31:63-78
- (6) De Castro, M. P., and R. C. B. Pisani. 1964. The chromosome complement of the IB-RS-2 swine cell line susceptible to the foot and mouth disease virus. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo* 31:155-166
- (7) Escarmis, C., E. C. Carrillo, M. Ferrer, J. F. Arriaza, N. Lopez, C. Tami, N. Verdaguer, E. Domingo, and M. T. Franze-Fernandez. 1998. Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *J. Virol.* 72: 10171–10179
- (8) Ferris, N. P., and M. Dawson. 1988. Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases. *Vet. Microbiol.* 16:201-209
- (9) Ferris N. P., G. H. Hutchings, H. J. Moulds, J. Golding, and J. B. Clarke. 2002. Sensitivity of primary cells immortalised by oncogene transfection for the detection and isolation of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease viruses. *Vet. Microbiol.* 84(4):307-316
- (10) Ferris, N. P., N. G. A. Abrescia, D. I. Stuart, T. Jackson, A. Burman, D. P. King, and D. J. Paton. 2005. Utility of recombinant integrin $\alpha\beta 6$ as a capture reagent in immunoassays for the diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Meth.* 127:697th
- (11) Ferris, N. P., D. P. King, S. M. Reid, G. H. Hutchings, A. E. Shaw, D. J. Paton, N. Goris, B. Haas, B. Hoffmann, E. Brocchi, M. Bugnetti, A. Dekker, and K. De Clercq. 2006. Foot-and-mouth disease virus: A first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.* 117(2-4):130-140
- (12) Foot and mouth disease. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 5th ed. OIE Standards Commission. Paris, France, Office International des Epizooties. Chapter 2.1.1.
- (13) Jackson, T., F. M. Ellard, R. A. Ghazaleh, S. M. Brookes, W. E. Blakemore, A. H. Corteyn, D. I. Stuart, J. W. Newman, and A. M. King. 1996. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 70:5282–5287

- (14) Jackson, T., A. Sharma, R. A. Ghazaleh, W. E. Blakemore, F. M. Ellard, D. L. Simmons, J. W. Newman, D. I. Stuart, and A. M. King. 1997. Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin $\alpha\beta 3$ in vitro. *J. Virol.* 71:8357-8361
- (15) Jackson, T., D. Sheppard, M. Denyer, W. Blakemore, and A. M. King. 2000. The epithelial integrin $\alpha\beta 6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 74:4949–4956
- (16) Jackson, T., A. M. King, D. I. Stuart, and E. Fry. 2003. Structure and receptor binding. *Virus Res.* 91:33–46
- (17) Kärber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Pathol Pharmacol.* 162:480-3.
- (18) Kasza, L., J.A. Shadduck, and G.J. Christofinis. 1972. Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. *Res. Vet. Sci.* 13:46–51
- (19) Martinez, M. A., N. Verdaguer, M. G. Mateu, and E. Domingo. 1997. Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6798–6802
- (20) McKenna, T. S., J. Lubroth, E. Rieder, B. Baxt, and P. W. Mason. 1995. Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J. Virol.* 69:5787–5790
- (21) McPherson, I. A. and M. G. P. Stoker. 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones: an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16:147–151
- (22) Monaghan, P., S. Gold, J. Simpson, Z. Zhang, P. H. Weinreb, S. M. Violette, S. Alexandersen, and T. Jackson. 2005. The $\alpha\beta 6$ integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J. Gen. Vir.* 86:2769–2780
- (23) Neff, S., D. Sa-Carvalho, E. Rieder, P. W. Mason, S. D. Blystone, E. J. Brown, and B. Baxt. 1998. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin $\alpha\beta 3$ as its receptor. *J. Virol.* 72:3587–3594
- (24) Reid, S. M., G. H. Hutchings, N. P. Ferris, and K. De Clercq. 1999. Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterisation of viral RNA in clinical samples. *J. Virol. Meth.* 83:113–123
- (25) Reid, S. M., N. P. Ferris, G. H. Hutchings, A. R. Samuel, and N. J. Knowles. 2000. Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 89 (1):167-176 (10)
- (26) Sa-Carvalho, D., E. Rieder, B. Baxt, R. Rodarte, A. Tanuri, and P. W. Mason. 1997. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.* 71:5115–5123
- (27) Snowdon, W. A. 1966. Growth of foot-and-mouth disease virus in monolayer cultures of calf thyroid cells. *Nature* 210:1079-1080
- (28) Wolf, C., J. Rentsch, and P. Hubner. 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* 47(4):1350-1355.

Die Co-Autoren haben folgenden Anteil an den Arbeiten, die der Publikation zugrunde liegen:

Herr Dr. Ferris führte die vergleichenden Untersuchungen am IAH durch, Herr Dr. Riebe und Herr Lenk etablierten und charakterisierten die Ziegezungenzelllinie und Herr Dr. Haas betreute die Arbeit.

8 Zusammenfassung

Um zu klären, inwieweit Impfstoffe aus der deutschen oder der EU-Vakzinebank auch vor einer Infektion mit solchen MKS-Viren des Serotyps A schützen würden, die sich antigenetisch deutlich vom Impfstamm unterscheiden, wurden Untersuchungen zum Kreuzschutz im Rind durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass MKS-Impfstoffe gegen Serotyp A mit sehr hohen, aber von modernen Vakzinebank-Impfstoffen heute vielfach erreichten homologen Schutzwerten auch gegen relativ weit entfernte Feldvirusstämme noch einen Schutz vermitteln können.

Um die labordiagnostischen Möglichkeiten zur Vorhersage eines möglichen Kreuzschutzes zu verbessern, wurde die Korrelation des gefundenen Schutzes mit den Antikörpertitern untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Titer neutralisierender Antikörper in den Impfseren gegen das Belastungsvirus insgesamt gut mit der Schutzwirkung korrelieren, was bei der Impfstoffauswahl genutzt werden kann.

Um den gefunden Zusammenhang zwischen Schutz und Neutralisationstiter im Fall einer Einschleppung zügig für eine Impfstoffempfehlung ausnutzen zu können, wurde eine neue Zelllinie zur Virusisolierung etabliert. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass auf der untersuchten Zelllinie *ZZ-R 127* (fetale Ziegenzunge) Virusstämme aus allen sieben Serotypen rascher und mit höherer Empfindlichkeit isoliert werden können als mit den bisher verwendeten Zelllinien. Die Virusisolierung auf der Zelllinie *ZZ-R 127* wurde inzwischen im deutschen Referenzlabor für MKS als Standardmethode eingeführt und die Zelle von mehreren ausländischen Laboratorien angefordert.

9 Summary

Homologous and heterologous potency of FMD-Serotype-A vaccines and establishment of a fetal goat tongue cell line (ZZ-R127) for isolation of FMDV

In order to elucidate to what extent vaccines from the German or EU vaccine bank would protect also against infection with FMDV strains of serotype A which clearly deviate from the vaccine strain, homologous and heterologous cattle challenge experiments were carried out. It could be shown that FMD vaccines to serotype A with a homologous potency that is very high but often reached by modern vaccine bank vaccines can protect even against fairly distant challenge strains.

In order to improve the capabilities of diagnostic laboratories to predict cross-protection, the correlation between protection and antibody titre was investigated. It could be shown that the titres of neutralizing antibodies in post-vaccinal sera to the challenge virus generally correlated well with the protection - which supports the choice of a suitable vaccine.

In order to facilitate rapid exploitation of the correlation between protection and neutralization titre, a new cell line for virus isolation was established. It could be shown that the fetal goat cell line *ZZ-R 127* allows to isolate virus strains of all seven serotypes faster and with a higher sensitivity than the cell lines that had been used so far. Meanwhile, virus isolation on *ZZ-R 127* cells was established as a standard method in the German national reference laboratory for FMD and the cell line has been requested by several foreign laboratories.

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung
Abs. Absatz
Ad5 Adenoviren Typ 5
Ag Antigen
Ak Antikörper
Art. Artikel
BEI binäres Ethylenimin
BHK-21-CT Babyhamsterkidney-21-Clone Tübingen Zelllinie
BTY primäre bovine Schilddrüsenzellen
°C Grad Celsius
CCLV Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine/Zellliniensammlung des FLI
CO² Kohlendioxid
CV Challengevirusverdünnungen
D Dalton
DC dendritic cells/dendritischen Zellen
d.h. das heißt
DNS Desoxyribonukleinsäure
DOE Doppelölemulsion
dpi days post infectionem
EDTA Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
ELISA Enzyme-linked-immunosorbent assay
et al. et alii (latein)/und andere
EU Europäische Union
FAO Food and Agriculture Organization
FLI Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
G-H Loop Aminosäurebereich 134-158 des *VPI*; schleifenförmige Verbindung zw. den β -Faltblättern G und H; Hauptantigen des MKSV
GMP Good Manufacturing Practice
gmt group mean titre/Gruppenmitteltiter
Ig Immunglobulin
IB-RS-2 Schweinenierenzelllinie
i.m. intramuskulär
INF Interferon
IRES internal ribosomal entry site
Impro_Con Improvement of foot and mouth disease control
kbp Kilobasenpaare
KID₅₀ Kulturinfektiöse Dosis unter Zugrundelegung des 50%-Endpunktes
log₁₀ Logarithmus zur Basis 10
LPBE Liquid-Phase-Blocking ELISA
max. maximal
MHC Major Histocompatibility Complex
mind. mindestens
MKS Maul- und Klauenseuche
MKSV Maul- und Klauenseuchevirus

MKS-VO Verordnung zum Schutz gegen die Maul- und Klauenseuche
ml Milliliter
µl Mikroliter
NK natürliche Killerzellen
nm Nanometer
NRL Nationales Referenzlabor
OIE Office International des Epizooties
o.g. oben genannt
ORF open reading frame
P1 Vorläuferprotein1
PBS phosphate buffered saline/Phospat gepufferter Salzlösung
PCR Polymerase-Ketten-Reaktion
PD₅₀ Protective Dose 50/Schutzwert
pers. Mittlg. persönliche Mitteilung
pH negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
real-time RT-PCR real-time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
RNS Ribonukleinsäure
SAT South African Territories
SPCE Solid- Phase Competition ELISA
u.a. unter anderem
UTR untranslated region
u.U. unter Umständen
VNT Virusneutralisationstest
VP Virusprotein
z.B. zum Beispiel
ZPE zytopathogener Effekt
z.T. zum Teil
ZZ-R 127 Fetale Ziegenzungenzelllinie

10.2 Veröffentlichungen

Brehm, K.E., Kumar, N., H.-H. Thulke und B. Haas. 2008. High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*. 26(13):1681-1687.

Brehm, K.E., Ferris, N.P., Lenk, M., R. Riebe und B. Haas. 2009. Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Clin. Microbiol.* 47(10):3156–3160.

10.3 Tagungsbeiträge

Katharina Brehm, Matthias Lenk, Roland Riebe and Bernd Haas

Foetal goat tongue cell line is highly sensitive for foot-and-mouth disease virus.

The Global control of FMD - Tools, ideas and ideals – Erice, Italy 14-17 October 2008

Katharina Brehm, Naveen Kumar, Hans-Herman Thulke and Bernd Haas

High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with FMD virus.

The Global control of FMD - Tools, ideas and ideals – Erice, Italy 14-17 October 2008

Katharina Brehm und Bernd Haas

Crossprotection within Serotype A. A One Day Symposium to Mark the 50th Anniversary of the Designation of the Pirbright Laboratory of the Institute for Animal Health as FAO World Reference Laboratory for FMD The Royal Society in London, United Kingdom, 9th May 2008

Katharina Brehm

Cross protection of FMD vaccines in cattle. International Workshop on FMD Vaccine Banks, FMD and CSF Coordination Action - Workpackage 4, Vaccine Reserves

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Surrey, United Kingdom, 4-5th April 2006

10.4 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mir mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei Herrn Prof. Dr. Lothar H. Wieler, Leiter des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin, für die Übernahme der veterinärmedizinischen Betreuung der Dissertation und die Möglichkeit der Einreichung der Dissertation über sein Institut.

Bei Herrn PD. Dr. Martin G. Beer, Leiter des Institutes für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Institutes, möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung sowie die Unterstützung bei der Veröffentlichung bedanken.

Herrn Dr. Bernd Haas danke ich für die exzellente Laborbetreuung sowie seine hilfreiche Unterstützung in theoretischen und praktischen Fragen, insbesondere für die hervorragende Unterstützung bei der Veröffentlichung der erhaltenen Ergebnisse. Viele wertvolle Diskussionen haben meine Ausbildung begleitet und nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht bereichert. Mit seinem umfangreichen Wissen, seiner langjährigen Erfahrung und dem nötigen Enthusiasmus hat er mich nicht nur für das Projekt begeistert, sondern mir auch durch die schwierigen Phasen der Arbeit geholfen.

Den technischen Assistentinnen des MKS Labors, Bianca Nehmzow und Anja Schulz, sei für die Zusammenarbeit und Hilfestellung bei den experimentellen Untersuchungen gedankt.

Herrn Dr. Bernd Hoffmann und Dr. Markus Durban danke ich für die Einführung in die Welt der PCR sowie der kritischen Diskussion der gewonnenen Ergebnisse, die mir ein besseres Verständnis der molekularbiologischen Aspekte einer viralen Infektion ermöglicht haben.

Weiterhin bin ich Thorsten Arnold und Georg Bauer für die zahlreichen Hilfestellungen beim Tierhandling im Stall sehr verbunden.

Frau Dr. Sandra Blome und Dr. Jutta Veits danke ich für die lehrreichen Diskussionen der virologischen Aspekte des Impfstoffdesigns sowie des Tierseuchenrechtes.

Angele Breithaupt bin ich für die anteilige Durchführung der Sektionen und Fotoaufnahmen sehr dankbar.

Mandy Jörn danke ich für ihre wertvolle Photoshop Zuarbeit.

All meinen Freunden und meiner Familie, die mich während meines Promotionsstudiums auf dem Riems begleitet, mich unterstützt und in der Zeit meiner Arbeit ertragen haben - dies war sicherlich nicht immer einfach – bin ich für die moralische Unterstützung von Herzen dankbar und weiß diesen Beitrag sehr zu schätzen.

10.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Greifswald – Insel Riems, 29.11.2010

Katharina Brehm