

Aus dem  
Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Aigner

Angefertigt am  
Helmholtz Zentrum München  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)  
(PD Dr. Markus Brielmeier)

# **Nachweissicherheit von Murinem Norovirus durch Sentinelmonitoring und Einschätzung des Übertragungsrisikos beim Embryotransfer**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Monika Barbara Isolde Kraus geb. Daniel  
aus Bamberg

München, 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Aigner

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Sutter

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Für meinen Sohn  
Simon  
geb. 21.05.2009

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>II.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>II.1.</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>II.2.</b>	<b>Hygienemonitoring von Versuchstierkolonien</b> .....	<b>2</b>
<b>II.3.</b>	<b>Noroviren</b> .....	<b>6</b>
<b>II.4.</b>	<b>Murines Norovirus</b> .....	<b>7</b>
<b>II.5.</b>	<b>Real Time PCR</b> .....	<b>11</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
<b>III.1.</b>	<b>Material</b> .....	<b>14</b>
III.1.1.	Laborchemikalien.....	14
III.1.2.	Medikamente .....	14
III.1.3.	Kits.....	14
III.1.4.	Geräte.....	15
III.1.5.	Maushaltung .....	15
III.1.6.	Virusstocks von MNV-4 und MNV-S99.....	15
III.1.7.	Zelllinien.....	15
<b>III.2.</b>	<b>Mäuse</b> .....	<b>16</b>
<b>III.3.</b>	<b>Versuchstierhaltung und Hygienemonitoring</b> .....	<b>16</b>
<b>III.4.</b>	<b>Erstellung einer Verdünnungsreihe von MNV-S99 und MNV-4 und Inokulation von Virus in Mäuse</b> .....	<b>17</b>
<b>III.5.</b>	<b>Probenentnahme und Lagerung</b> .....	<b>19</b>
III.5.1.	Kot .....	19
III.5.2.	Blut .....	20
III.5.3.	Organe.....	20
<b>III.6.</b>	<b>Serologische Untersuchungen</b> .....	<b>20</b>
<b>III.7.</b>	<b>Isolierung der Virus-RNA aus den zu untersuchenden Proben</b> .....	<b>20</b>
III.7.1.	Zellkulturüberstand .....	20
III.7.2.	Kot .....	21
III.7.3.	Organe.....	21
III.7.4.	Blut .....	22

<b>III.8.</b>	<b>Isolierung von Virus aus dem Kot.....</b>	<b>22</b>
III.8.1.	Virusisolierung aus der Tierhaltung .....	22
III.8.2.	Kotaufbereitung .....	22
III.8.3.	Virusanzucht und –vermehrung in der Zellkultur .....	22
III.8.4.	Virusquantifizierung .....	23
<b>III.9.</b>	<b>Konventionelle PCR .....</b>	<b>24</b>
III.9.1.	Master Mix .....	24
III.9.2.	Temperaturprotokoll.....	24
III.9.3.	Gelelektrophorese .....	25
III.9.4.	Agarosegel.....	25
III.9.5.	Laufbedingungen und Photographische Darstellung.....	25
<b>III.10.</b>	<b>Real Time PCR .....</b>	<b>25</b>
III.10.1.	Master Mix .....	25
III.10.2.	Temperaturprotokoll.....	26
III.10.3.	Standard .....	27
III.10.4.	Einstellung und Evaluierung der Standardkurve.....	27
III.10.5.	Berechnungsgrundlage der Kopienzahl in den Proben .....	27
III.10.6.	Umrechnung zweier Plasmide .....	27
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>30</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Etablierung eines Nachweisverfahrens: RT-qPCR.....</b>	<b>30</b>
IV.1.1.	Berechnung und Erstellung des DNA-Standards .....	30
IV.1.2.	Kalibrierung der RT-qPCR mit einem DNA-Standard.....	31
IV.1.3.	Effektivität der Reversen Transkription.....	34
IV.1.4.	Einfluß von Kot auf die gemessene Kopienzahl .....	37
<b>IV.2.</b>	<b>Infektionsdynamik von Laborvirus .....</b>	<b>40</b>
IV.2.1.	Direkte Inokulation von Mäusen mit den Laborvirusstämmen MNV-4 und MNV-S99 .....	40
IV.2.2.	MNV-4 Langzeitausscheidung.....	45
IV.2.3.	Variabilität der Virusausscheidung .....	47
<b>IV.3.</b>	<b>Überprüfung der Übertragung von Laborvirus über gebrauchte Einstreu, Ausscheidungsverhalten und Serokonversion von Sentinels .....</b>	<b>52</b>
IV.3.1.	Infektion von Mäusen zur Produktion kontaminierter Einstreu .....	52
IV.3.2.	Titration der zur Infektion von Einstreu-Sentinels nötigen Menge kontaminierter Einstreu.....	53

IV.3.3.	Inokulationsversuch Sentinelmonitoring Teil 1 .....	54
IV.3.4.	Inokulationsversuch Sentinelmonitoring Teil 2 .....	55
<b>IV.4.</b>	<b>Feldversuch Sentinelscreening.....</b>	<b>58</b>
IV.4.1.	Monitoring-Protokoll.....	58
IV.4.2.	Probennahme .....	58
IV.4.3.	Einteilung der Sentinels in starke und schwache Ausscheider.....	59
IV.4.4.	Virusausscheidung und Serokonversion in den Sentinels.....	60
<b>IV.5.</b>	<b>Virusisolierung aus der Tierhaltung .....</b>	<b>64</b>
IV.5.1.	Screeningergebnisse .....	64
IV.5.2.	Quantifizierung des Virus und dessen Passagen .....	66
<b>IV.6.</b>	<b>Organuntersuchungen.....</b>	<b>67</b>
IV.6.1.	Untersuchung der Organe von mit Laborvirus inokulierten Mäusen.....	67
IV.6.2.	Untersuchung der Organe von mit Feldvirus natürlich infizierten Mäusen	70
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
<b>V.1.</b>	<b>Etablierung der Real Time PCR.....</b>	<b>74</b>
<b>V.2.</b>	<b>Direkte Inokulation von Mäusen mit den Laborvirusstämmen MNV-4 und MNV-S99.....</b>	<b>77</b>
<b>V.3.</b>	<b>MNV-4 Langzeitausscheidung.....</b>	<b>79</b>
<b>V.4.</b>	<b>Variabilität der Virusausscheidung.....</b>	<b>80</b>
<b>V.5.</b>	<b>Überprüfung von Murinem Norovirus über gebrauchte Einstreu, Ausscheidungsverhalten und Serokonversion .....</b>	<b>81</b>
V.5.1.	MNV-4.....	81
V.5.2.	Feldversuch Sentinelmonitoring .....	82
V.5.3.	Attenuierung von MNV.....	83
<b>V.6.</b>	<b>Virusisolierung aus der Tierhaltung .....</b>	<b>85</b>
<b>V.7.</b>	<b>Untersuchung der Organe inokulierter und natürlich infizierter Mäuse .....</b>	<b>86</b>
V.7.1.	Untersuchung der Organe von mit Laborvirus inokulierten Mäusen.....	87
V.7.2.	Untersuchung der Organe von mit Feldvirus natürlich infizierten Mäusen	89
<b>VI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>VII.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>95</b>
<b>VII.1.</b>	<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>

<b>VII.2.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis: .....</b>	<b>99</b>
<b>VIII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>101</b>
<b>IX.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>103</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>105</b>

## II. Einleitung

### II.1. Fragestellung

Seit 2003 ist das Maus Norovirus als potentiell Pathogen in Mäusen bekannt [1]. Da die Infektion mit MNV Versuchsergebnisse beeinflussen kann [2], werden Versuchstierkolonien auf die Anwesenheit einer MNV Infektion hin überwacht. Hierbei kommen verschiedene Untersuchungsmethoden und -strategien zum Einsatz. Da über den zeitlichen Verlauf einer MNV Infektion, die Replikation des Virus in verschiedenen Organen, die Dynamik der Virusausscheidung und die Übertragungswege und -wahrscheinlichkeit bisher nur unzureichende Daten vorliegen, stellt sich die Frage nach der Zuverlässigkeit des Nachweises. Die Etablierung eines sensitiven und spezifischen direkten Nachweisverfahrens (RT-qPCR) ist Voraussetzung für den quantitativen direkten Virusnachweis.

Eines der Ziele dieser Arbeit ist es, die Effizienz des Nachweises von Virus im Kot per RT-qPCR für das Hygienemonitoring zu überprüfen und eine Empfehlung für das Sammeln von Kotpellets im Rahmen des Hygienemonitorings zu entwickeln. Außerdem soll überprüft werden, ob sowohl der serologische Nachweis aus Blut als auch der direkte Nachweis von Virus im Kot von Sentinels durch die *Real Time PCR* ein geeignetes Verfahren für den Nachweis von MNV in einer Maushaltung sind. Die PCR- basierenden Methoden sollen mit der Nachweiszufverlässigkeit von Einstreu-Sentinels verglichen werden.

Des Weiteren ist es im Hinblick auf eine Beurteilung der Sicherheit eines Embryotransfers (ET) zur Sanierung von MNV positiven Kolonien essentiell zu wissen, ob und in welcher Menge MNV in den für den ET wichtigen Organen (Ovar und Nebenhoden) während einer Infektion zu finden ist. Deshalb beschäftigen wir uns mit der Fragestellung, ob Mäuse, die im Kot auf MNV positiv getestet wurden, das Virus beim Embryotransfer übertragen können, indem wir von infizierten Mäusen Ovar und Nebenhoden entnehmen und auf MNV untersuchen.



## II.2. Hygienemonitoring von Versuchstierkolonien

Infektionen können für ein Einzeltier sehr belastend sein, doch auch Versuchstiere, die einen gesunden Eindruck machen, sind keine Garantie für Pathogenfreiheit, denn viele Infektionen laufen subklinisch ab, so dass eine Abwesenheit von klinischen Symptomen kein Zeichen für das Nicht-Vorhanden-Sein einer Infektion ist [3]. Trotzdem können subklinische Infektionen einen Einfluss auf die Ergebnisse von Tierversuchen haben: Sie können Verhaltensweisen, Wachstumsraten, Organgewichte oder Immunreaktionen verändern [4].

Durch aus Tieren gewonnene oder in ihnen passagierte biologische Materialien, wie Transplantate, Tumoren, Zellen für die Kultur oder Seren, können Tiere kontaminiert oder Versuchsergebnisse verfälscht werden, oftmals ohne dass es bemerkt wird [3]. Durch Infektionen, ob apparent oder inapparent, wird die Variabilität von Ergebnissen erhöht und folglich eine Aufstockung der Anzahl von Tieren in einer Versuchsgruppe nötig. Die Standardisierung des Infektionsstatus von Versuchstieren und ein adäquates Hygienemonitoring zur Erkennung von Pathogenen sind also essentiell für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen und damit eine Methode zur Verringerung der Anzahl von Tieren, die in Versuchen eingesetzt werden. Dadurch, sowie durch die Vermeidung von Leiden des Einzeltieres, ist es ein Beitrag zum Tierschutz.

Nur durch ein gutes Monitoringprogramm kann eine weite Verbreitung von Pathogenen über Landes- und Kontinentalgrenzen hinaus verhindert werden, da nationale und internationale Transporte von Versuchstieren zunehmen und deshalb die Notwendigkeit besteht, ein hohes Gesundheitsniveau aufrecht zu erhalten.

In den Empfehlungen der FELASA zum Hygienemonitoring von Nagetier- und Kaninchenkolonien [5] wird ein vierteljährliches Monitoring angeraten (Tabelle 1). Pathogene mit einem hohen Einschleppungsrisiko sollten nach den aktuellen Umständen sogar öfter überprüft werden. Beprobt werden entweder Stichproben, bestehend aus Tieren direkt aus dem Bestand, die dort geboren wurden oder lange Zeit dort verbracht haben, oder Wächtertiere (Sentinels), ergänzt durch auffällige, erkrankte Tiere. In unten abgebildeter Tabelle ist die nötige Stichprobengröße bezogen auf die erwartete Prävalenz des Pathogens und den individuell erstrebenswerten Vertrauensbereich abgebildet. Es wird eine Mindest-Stichprobengröße von 10 Tieren pro mikrobieller Einheit empfohlen. Bei einem Bestand von über 100 Tieren wird bei Stichprobenentnahme nach dem Zufallsprinzip durch Routineuntersuchung von 10 Tieren mit 95%iger Sicherheit eine Infektion mit einer Prävalenz von 30% erfasst (Tabelle 2).

**Tabelle 1 Empfohlene Mindestfrequenz des Monitorings und Stichprobengröße für Nagetier- und Kanincheneinheiten [5]**

Sampling frequency	Age	No. of animals	Virology	Bacteriology	Parasitology	Pathology
Every 3 months	> 8 weeks	10	+	+	+	+

**Tabelle 2 Verhältnis von Stichprobengröße zu Prävalenz [5]**

Relation of sample size to prevalence rate

Suspected prevalence rate (%)	Sample sizes at different confidence levels		
	95%	99%	99.9%
10	29	44	66
20	14	21	31
30	10	13	20
40	6	10	14
50	5	7	10

Example: 10 animals should be monitored to detect at least one positive animal if the suspected prevalence rate of an infection is 30% (confidence level: 95%)

Ist aufgrund der Größe der mikrobiellen Einheit oder der genetischen Beschaffenheit der Mäuse (z.B. immundefiziente Mäuse, bei denen die Durchführung einer serologischen Untersuchung irreführend wäre aufgrund der Unfähigkeit Antikörper zu bilden) die Möglichkeit nicht gegeben, Mäuse aus dem laufenden Betrieb zu testen, kann ein Sentinelmonitoringprogramm sinnvoll sein.

Sentinels (Wächtertiere) werden als Indikator für den Gesundheitszustand einer Mauspopulation eingesetzt. Es handelt sich meist um immunkompetente Wild-Typ-Mäuse, die stellvertretend für eine große Anzahl von Versuchsmäusen auf Pathogene untersucht werden. Es ist notwendig, die Sentinels mit den in der zu untersuchenden Tierpopulation vorhandenen Pathogenen in Kontakt zu bringen. Das kann, je nach den individuellen Umständen in einer Tierhaltung, auf unterschiedlichen Wegen geschehen. Bei der Haltung von Mäusen in offenen Käfigen können Sentineltiere an Stellen des Raumes eingesetzt werden, an denen eine hohe Exposition mit Pathogenen vermutet wird. Da die Übertragung vieler Pathogene über die Luft nicht effizient ist, kann dem Sentinel schmutzige Einstreu, Futter und Wasser, das vorher von den zu überwachenden Tieren genutzt wurde, zur Verfügung gestellt werden oder er lebt mit den zu überwachenden Tieren in einem Käfig, so dass ein direkter Kontakt des Sentinels mit den zu überwachenden Tieren zustande kommt. Individuelle Lösungen müssen angestrebt werden, wenn die mikrobiellen Einheiten sehr klein sind, z.B. in *IVCs* (*individually ventilated cages*) und Isolatoren, so dass eine Stichprobennahme und das Einsetzen von Kontaktsentinels ausgeschlossen sind.

Ein Vorteil des Sentinelsystems gegenüber der Stichprobennahme ist, dass keine Tiere aus der zu überwachenden Kolonie entnommen werden müssen, was bei sehr kleinen

mikrobiellen Einheiten oder sehr wertvollen (transgenen) Tieren ein entscheidender Faktor sein kann. Durch das Sentinelsystem kann mit der Untersuchung weniger Einzeltiere oftmals eine größere Anzahl von Tieren überwacht werden als durch eine Stichprobe, da Sentinels gezielt mit Ausscheidungen der zu untersuchenden Tiere in Kontakt gebracht werden und so eine große Anzahl von Tieren in einem kurzen Zeitraum beprobt werden kann. Allerdings kann durch den nur kurzen Kontakt mit Kot, Futter, Wasser und/oder Luft die Übertragung von Pathogenen fehlschlagen. Werden die individuellen Übertragungswege einzelner Pathogene nicht berücksichtigt, können Infektionen leicht übersehen werden [6].

Die Standardvorgehensweise für die Untersuchung von Stichproben oder Sentinels, die sich im Allgemeinen nach den Empfehlungen der FELASA richtet [5], lässt sich grob so darstellen:

Bakterien und Pilze werden nachgewiesen, indem Proben aus dem oberen Respirations- (Nasopharynx, Trachea), dem Darm- (Darminhalt) und dem Genitaltrakt (Präputium, Vagina) auf Platten ausgestrichen und kultiviert werden. Da Proben dieser Art zahlreiche nicht pathogene Bakterien enthalten, werden zusätzlich Selektivböden verwendet, um auch anspruchsvollere Bakterien kultivieren zu können. Das normale Vorgehen ist die Inkubation unter aeroben Bedingungen, zum Nachweis einiger Pathogene ist zusätzlich eine mikroaerophile oder anaerobe Atmosphäre notwendig. Serologische Methoden bergen im Bereich der Bakteriendiagnostik aufgrund der komplexen Antigenstruktur ein hohes Risiko an falsch positiven Ergebnissen.

Ektoparasiten werden direkt durch Adspektion und Abklatschpräparate, intestinale Endoparasiten durch nasse Präparation von Darm und Kot, durch Anreicherungsverfahren wie Flotations- Sedimentations-, und Filterverfahren und Mikroskopie nachgewiesen. Obwohl für die serologische Untersuchung gerne ältere Tiere verwendet werden, sind diese häufig weniger geeignet für den Nachweis von Parasiten per mikroskopischer Untersuchung, da sie oftmals schon Resistenzen gegen bestimmte parasitäre Erreger gebildet haben.

Für das virologische Monitoring ist der indirekte Nachweis von Antikörpern durch eine serologische Untersuchung das Mittel der Wahl. Adäquate Methoden sind der *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) sowie der *Immunfluorescence Antibody Assay* (IFA). In den USA wird außerdem der *Multiplex Fluorescent Immunoassay* (MFI) verwendet, ein Test der einen hohen Probendurchsatz erlaubt und trotzdem hochsensitiv und -spezifisch ist [7]. In einigen Fällen wird außerdem der *Hämagglutination Inhibition Test* (HI), der sehr spezifisch aber weniger sensitiv ist, angewendet. Ist eine Bestätigung des Ergebnisses notwendig, werden auch arbeits- und kostenintensivere Methoden, wie das *Western Blot* Verfahren oder die Polymerasekettenreaktion (PCR), angewendet.

Im Moment noch als Sonderfall zu sehen, weil meist sehr teuer und zeitintensiv zu etablieren, ist der direkte Nachweis von Pathogen-Nukleinsäure durch die *Real Time PCR*.

Sie wird, wenn für das jeweilige Pathogen vorhanden, in Einzelfällen und als Bestätigungsmethode genutzt. Eine genaue Beschreibung der Methode ist in Abschnitt II.5 zu finden.

Bei der serologischen Diagnostik muss ein Zeitverzug zwischen Infektion und Nachweiszeitpunkt von, je nach Pathogen, einigen Tagen bis Wochen eingerechnet werden, da der Organismus Zeit benötigt, um spezifische Antikörper zu bilden. Die akute Infektion und Ausscheidung des Virus können zu diesem Zeitpunkt schon der Vergangenheit angehören, wie es beim Maus Hepatitis Virus der Fall ist [[8, 9], eigene unveröffentlichte Daten]. Außerdem muss bei vielen Pathogenen dem Umstand Rechnung getragen werden, dass sie nicht kontinuierlich ausgeschieden werden. Das gilt für Parasiten, die oftmals einem zyklischen Lebensrhythmus folgen und intermittierend ausgeschieden werden wie *Syphacia* spp. [10], sowie für die Ausscheidung von Viren oder Bakterien, die intermittierend sein kann oder überhaupt nur kurzzeitig stattfindet wie die des Maus Hepatitis Virus, die 2 bis 3 Wochen nach Infektion nicht mehr nachzuweisen ist [[8, 9], eigene unveröffentlichte Daten]. Diese Untersuchungen werden oftmals, wie von der FELASA empfohlen, alle drei Monate wiederholt und als Gesundheitszeugnis niedergeschrieben. Bei Import von lebenden Tieren aus einem unbekanntem Bestand in den eigenen Tierstall ist anzuraten, nicht nur das letzte Gesundheitszeugnis zu beurteilen, sondern sich die Gesundheitszeugnisse eines längeren Zeitraumes zusenden zu lassen. Es ist zu berücksichtigen, dass ein negativer Report sich lediglich auf ein Einzeltier bezieht, das zu einem Zeitpunkt auf bestimmte Pathogene negativ getestet wurde, jedoch bedeutet er nicht, dass diese Pathogene nicht in der Tierhaltung vorhanden sind oder waren. Nach den FELASA-Empfehlungen gilt ein Pathogen erst als eliminiert, wenn über 18 Monate und mindestens 6 Untersuchungstermine alle Ergebnisse negativ waren.

### II.3. Noroviren

Das Norovirus gehört zur Familie der Caliciviridae und ist ein unbehülltes, einzelsträngiges, positiv Strang RNA Virus mit einer Größe von 27 bis 35nm. Das Genus Norovirus ist unterteilt in 5 Genogruppen (Abbildung 1). Humane Noroviren befinden sich in den Gruppen I, II und IV. Bovine Noroviren gehören zu Gruppe III, das Porcine Norovirus zu Gruppe II und das Murine Norovirus beschreibt Gruppe V [11].

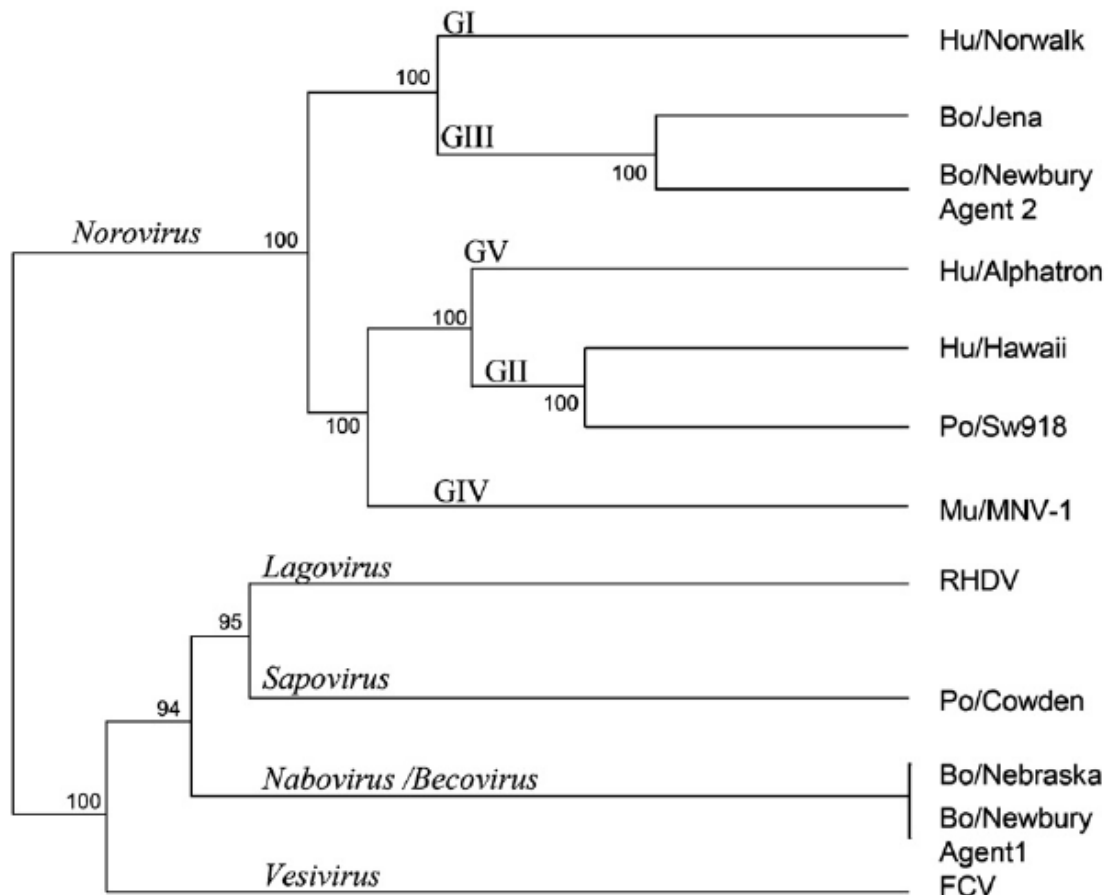


Abbildung 1 Einteilung der Caliciviridae

**Zu beachten:** Mu/MNV-1 beschreibt Genogruppe V, in der Abbildung fehlerhaft als GIV bezeichnet. [11]

Das Murine Norovirus ist eng verwandt mit dem humanen Norovirus. Die Erkrankung durch das humane Norovirus zeichnet sich aus durch Bauchkrämpfe, Übelkeit, Erbrechen und extremen Wasserverlust, was sie gefährlich für sehr junge, sehr alte und immunsupprimierte Menschen macht [12]. Bei den unterschiedlichen Tierarten erzeugen die tierartsspezifischen Noroviren ein sehr weites Spektrum an klinischen Symptomen, wie Erkrankungen des Verdauungstraktes (Menschen, Schweine, Rinder, Hunde), vesikuläre Läsionen, Störungen in der Reproduktion (Schweine, Meeressäuger), Stomatitis,

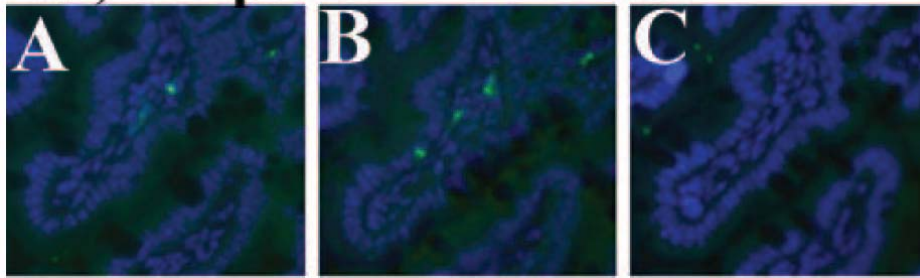
Erkrankungen des oberen Respirationstraktes und systemische Erkrankungen (Katze), sowie haemorrhagische Erkrankungen (Kaninchen) [11].

#### II.4. Murines Norovirus

Das erste Murine Norovirus wurde 2003 nachgewiesen. Es wurde als sporadisch auftretendes, letales Pathogen bei immunkomprimierten Rag2<sup>-/-</sup>/Stat1<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen entdeckt. Bei intracerebraler Inokulation führte es bei diesen Mäusen zu Encephalitis, Vaskulitis der cerebralen Gefäße, Meningitis, Pneumonie und Hepatitis. Außerdem war es letal für Infαβγ<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse [1]. Es hat einen Tropismus für Makrophagen und Dendritische Zellen und ist das erste Norovirus, das in der Zellkultur auf diesen Zellen, gewonnen aus dem Knochenmark von Mäusen, angezüchtet werden kann [13]. Die Anzucht humaner Noroviren ist bislang nicht gelungen. Damit ist das Murine Norovirus das erste Norovirus-Modell, mit dem Replikation und Immunologie von Noroviren auch *in vitro* untersucht werden können [14].

Die Prävalenz (bezogen auf die jeweils untersuchten Tiere) von MNV in Versuchstierhaltungen unterscheidet sich in verschiedenen Regionen und Tierhaltungen. Bisherige Publikationen ergaben eine Prävalenz von 22,1% [15] bzw. 32,4% [16] in Nordamerika, von 23% [17] bzw. 15% [18] in Südkorea und in Deutschland von 20,3% [19], 31,8% [20], bzw. 64,3% [21]. Damit ist MNV das am höchsten prävalente Virus bei Versuchsmäusen und etwa 10fach höher als das am nächsten prävalente Virus, das Maus Hepatitis Virus mit 5,5% [20].

Durch eine Infektion mit dem Murinen Norovirus werden bei immunkompetenten Mäusen keine klinischen Symptome hervorgerufen. Es ist derzeit noch nicht hinreichend geklärt, inwieweit MNV bei immunkompetenten Mäusen histopathologische Veränderungen induziert. In einer Studie von 2007 wurde nachgewiesen, dass 24 Stunden nach oraler Infektion von 129S6/SvEvTac Wildtyp Mäusen mit 1\*10<sup>7</sup>PFU MNV-1 eine Erhöhung von Entzündungszellen im Duodenum, sowie eine Ausbreitung des Virus in Darm, Milz und Leber messbar war (Abbildung 2).



**Abbildung 2 Immunofluoreszenzassay**

**ProPol Antigen (grün) konnte in Lamina Propria Zellen des proximalen Dünndarms von 129 Mäusen 24 hpi dargestellt werden [22]**

Außerdem wurden drei Tage nach Inokulation eine Hypertrophie der roten Pulpa sowie aktivierte Lymphozyten in der weißen Pulpa der Milz festgestellt. Innerhalb von 7 Tagen wurde MNV-1 von immunkompetenten Mäusen aus den meisten Geweben jedoch eliminiert [22]. In einer weiteren Studie konnte dagegen auch acht Wochen nach Infektion noch Virus in Milz, Lymphknoten und Jejunum von immunkompetenten Hsd:ICR Mäusen nachgewiesen werden [15]. In den beiden Studien wurden unterschiedliche Virenstämme und -passagen verwendet. Diese Beobachtungen decken sich mit unseren Erfahrungen, dass Feldvirus sich anders als in der Zellkultur passagiertes Virus verhält.

Durch die initiale Replikation von MNV im unteren Verdauungstrakt [22] und den Tropismus des Virus für Makrophagen und Dentritische Zellen [13] und damit den Einfluss auf das Immunsystem, ist für Studien, in denen diese Organe oder Zelltypen eine Rolle spielen, ein Frei sein der Versuchsmäuse von MNV von besonderer Bedeutung, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Virus auszuschließen. So konnte bei Koinfektion von *Helicobacter bilis* mit MNV bei der *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) empfänglichen *Mdr1a<sup>-/-</sup>* Maus bereits eine Verstärkung der Krankheitssymptome und der pathologischen Veränderungen in der Mukosa des proximalen Colons und des Lymphgewebes gezeigt werden [2].

Häufig wird in größeren Maushaltungen das Hygienemonitoring auf Basis des Screenings von Sentinels durchgeführt. In einer Studie von 2006 wurde festgestellt, dass für das Monitoring von Murinem Norovirus *Used Bedding Sentinels* gut geeignet sind, da die Sentinels, in Paaren gehaltene weibliche Hsd:ICR Mäuse, nach 12 Wochen sowohl Virus ausschieden, als auch serokonvertiert waren. Allerdings blieb von 5 untersuchten Sentinelpaaren eines serologisch und im direkten Kot-PCR-Nachweis negativ, obwohl die zu überwachenden Mäuse nachweislich Virus mit dem Kot ausgeschieden hatten [23]. Es scheint also möglich, was unsere eigenen Beobachtungen bestätigen, dass eine Infektion in einem Mausbereich übersehen werden kann.

## Genomaufbau

Das Genom des Murinen Norovirus ist etwa 7,4 Kilobasen lang und besteht aus vier *Open Reading Frames* (ORF1, ORF2, ORF3 und ORF4), die sich an den Enden teilweise überlappen. Am 3'-Ende ist die Virus RNA polyadenyliert. ORF1 kodiert für ein Polyprotein, das aus sechs Nicht-Strukturproteinen besteht. ORF2 kodiert für das Hauptkapsidprotein VP1 (*viral protein 1*), das aus zwei Domänen, nämlich dem Hüllbereich (S für *shell*) und einem hervorstehenden Bereich (P für *protruding*) besteht. Der S Bereich ist im Gegensatz zum P Bereich hochkonserviert. Dieser ist noch einmal aufgeteilt in die Bereiche P1 und P2, wovon der P2 Bereich, der die Virusoberfläche bildet, besonders variabel ist. ORF3 kodiert für ein kleines Basisprotein, das einen Einfluss auf die Stabilität des Kapsidproteins hat. Über ORF4 ist noch wenig bekannt. Er liegt innerhalb von ORF2 [24].

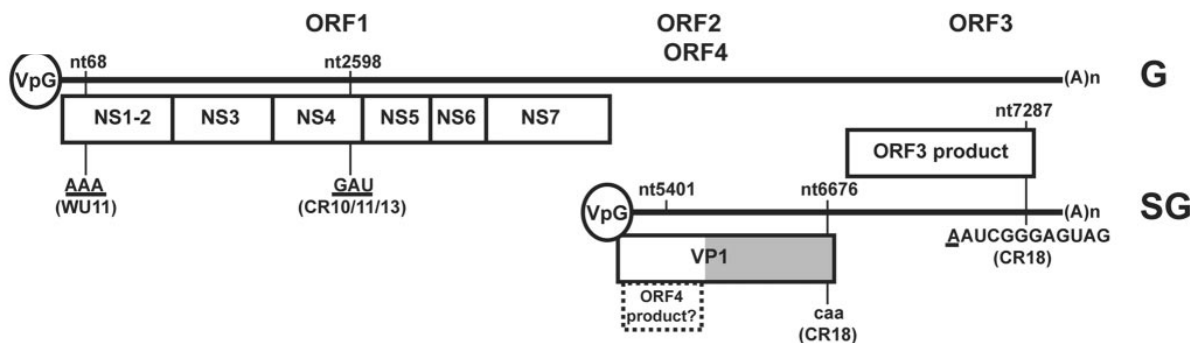


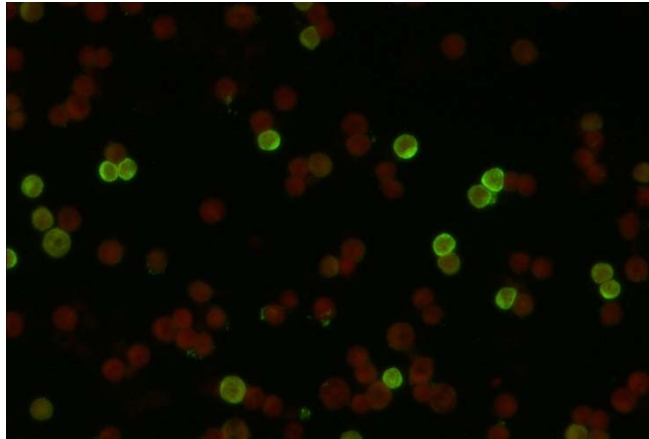
Abbildung 3 Genomaufbau des Murinen Norovirus [24]

## Diagnostik

Zwischen humanen Norovirus Stämmen besteht eine geringe Kreuzreaktivität. Kommerzielle Kits zum Nachweis von Antikörpern sind deshalb wenig verlässlich, so dass die bevorzugte Nachweismethode die der RT-PCR ist [25].

Im Gegensatz dazu können Antikörper gegen die Murinen Noroviren aufgrund ihrer guten Kreuzreaktivität [15, 24] serologisch durch den ELISA (*Enzyme-Linked-Immunosorbant-Assay*) oder den IFA (Immunfluoreszenz-Assay) (Abbildung 4) sehr gut nachgewiesen werden [26]. Da diese Methoden auf dem Nachweis von Antikörpern gegen MNV im Blut des zu untersuchenden Tieres basieren, sind sie indirekte Methoden des Virusnachweises. Es wurde ein *Multiplexed Fluorescent Immunoassay* (MFI) [27] für das Murine Norovirus entwickelt, das in den USA im Einsatz ist. Diese Methode auf Basis der Immunfluoreszenz wurde in den letzten Jahren so weit verfeinert, dass eine höhere Durchsatsrate und eine genauso hohe Sensitivität wie bei den oben genannten Methoden erreicht werden kann. In Deutschland werden von kommerziellen Laboren bis dato der klassische Immunfluoreszenz-Assay und der ELISA als quantitative Nachweismethoden angeboten.





**Abbildung 4 IFA: Mikroskopische Aufnahme der spezifischen Immunfluoreszenz im Zytoplasma von MNV-infizierten Kulturzellen nach Markierung mit Fluoreszein-gekoppelten spezifischen Immunglobulinen (Konjugat). Nicht infizierte Zellen sind rot gefärbt. Quelle:<http://biodoc-online.de/spektrum.html> mit freundlicher Genehmigung**

Da im Genom des Murinen Norovirus einige hochkonservierte Regionen vorhanden sind [21, 24], die für das Primerdesign genutzt werden können, ist als direkter Nachweis des Virus in Kot und Organen von Mäusen die RT-PCR (Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion) und die RT-qPCR (quantitative Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion) sehr gut geeignet.

Ein Vorteil der PCR gegenüber den indirekten Methoden ist der Nachweis des Vorhandenseins von Virus zum Zeitpunkt der Probennahme. Allerdings kann, im Gegensatz zum Nachweis von Antikörpern im Blut, nach Entfernen des Virus aus dem Körper ein früheres Vorhandensein dessen nicht mehr nachgewiesen werden. Der serologische Nachweis hingegen setzt eine Reaktion des Körpers auf das Virus voraus, ist diese aus irgendeinem Grund nicht gegeben, werden falsch negative Screeningergebnisse produziert und ein Nachweis kann auf diesem Wege nicht vorgenommen werden.

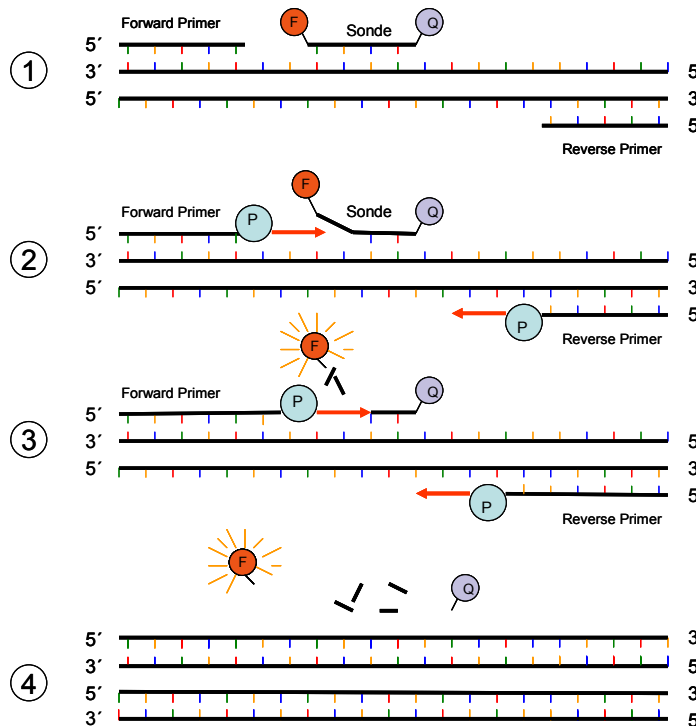
## II.5. Real Time PCR

Nachdem die *Real Time PCR* in dieser Arbeit eine besondere Rolle spielt, soll die relativ neue Methode der quantitativen *Real Time PCR* hier genauer beschrieben werden. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur schnellen Vervielfältigung definierter Sequenzen einer DNA. Um RNA in einer PCR einzusetzen, muss diese durch eine reverse Transkriptionsreaktion in DNA umgeschrieben werden.

Zur quantitativen Spezifizierung von RNA-Fragmenten kann die Reverse Transkriptase *Real Time PCR* (RT-qPCR) verwendet werden. Die Vorteile dieser Methode gegenüber der konventionellen RT-PCR liegen in der höheren Genauigkeit der Quantifizierung und der schnelleren Verfügbarkeit der Ergebnisse.

Die gebräuchlichsten Methoden zur Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte sind die Verwendung von interkalierenden Farbstoffen, die sich in die doppelsträngige DNA einlagern und damit eine Fluoreszenz hervorrufen oder von FRET-Sonden (*Fluorescence resonance energy transfer*), die sich spezifisch an bestimmte Sequenzen der DNA-Einzelstränge anlagern und ein Fluoreszenzsignal abgeben.

Die Methode unserer Wahl ist die der TaqMan®-Sonde, die auf dem FRET-System basiert (Abbildung 5). Die Sonde hybridisiert an einer Sequenz, die zwischen den zwei spezifischen Primern liegt und ist somit auch für jede zu amplifizierende Sequenz spezifisch. An ihren beiden Enden befinden sich ein Reporter bestehend aus einem Fluoreszenzfarbstoff und ein *Quencher*, der die Fluoreszenz des Reporters blockiert, solange sich beide in unmittelbarer Nähe befinden, so dass bei intakter Sonde kein Reportersignal freigegeben wird. Während der Amplifikation des DNA Stranges wird durch die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase die Sonde hydrolysiert, der Reporter entfernt sich vom *Quencher* und gibt ein Fluoreszenzsignal ab. Die Fluoreszenzstärke steigt somit proportional zur Amplifikatmenge an und wird vom *Real Time* Gerät gemessen.



**Abbildung 5 Prinzip der TaqMan®Sonde**

**F** Fluoreszenzfarbstoff; **Q** Quencher; **P** Polymerase

**1** Hybridisierung von Primer und Sonde

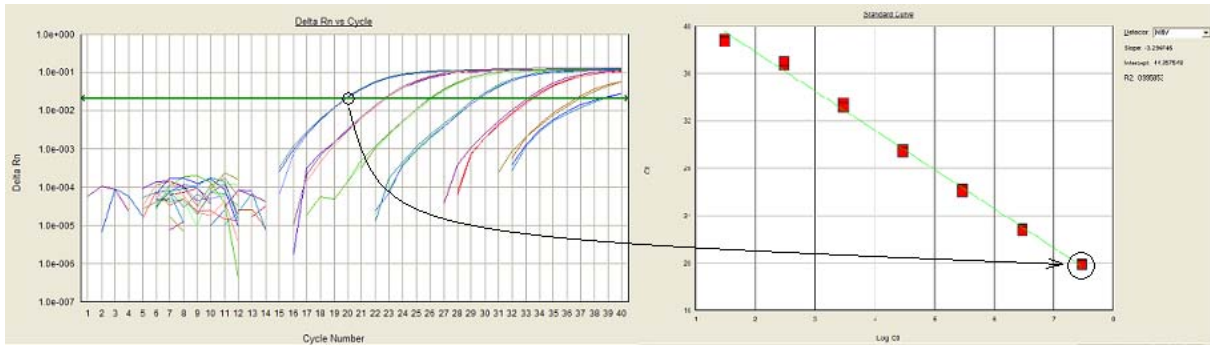
**2** Primer-Extension und Sondensverdrängung

**3** Hydrolyse der Sonde, Beginn der Fluoreszenzmessung

**4** Vollständige Synthese des PCR-Produktes

Die Quantifizierung erfolgt durch Einsetzen eines Standards mit bekannter Kopienzahl. Als Standard kann ein Plasmid eingesetzt werden, in das die zu quantifizierende RNA-Sequenz als DNA-Komplement inkloniert wurde oder die RNA selbst. Durch photometrische Messung und darauf basierende Berechnung der Anzahl der Plasmid- oder RNA-Kopien kann eine Standardkurve, bestehend aus einer Verdünnungsreihe mit bekannter Kopienzahl, erstellt werden.

Durch Festsetzung eines Schwellenwertes, des *Thresholds*, kann der Quantifikationszyklus ( $C_q$ ) jeder Verdünnungsstufe des Standards, der durch dessen Schnittpunkt mit der Amplifikationskurve definiert wird, bestimmt werden (Abbildung 6). Die Gerade, die nach Auftrag der Quantifikationszyklen einer jeden Verdünnungsstufe gegen die jeweilige Kopienzahl (logarithmiert) entsteht, wird als Standardkurve bezeichnet. Sie sollte einer Geraden mit der Steigung  $-3,32$  nahe kommen, was einer Effizienz von 100% und damit während der exponentiellen Phase einer Verdoppelung des *Templates* bei jedem Amplifikationszyklus entspräche. Außerdem ist eine Abweichung von der Regressionsgeraden, die als  $R^2$ -Wert bezeichnet wird, von 1 anzustreben. Der  $R^2$  Wert spiegelt somit die Linearität der Standardkurve wieder.



**Abbildung 6 Bestimmung von Quantifikationszyklus (Cq, links) und Standardkurve (rechts)**

**Links: Fluoreszenz vs. Zyklus, grün: *Threshold*; Rechts: Quantifikationszyklus (Cq) vs. eingesetzter Kopienzahl (log) (Ansicht 7500System v 1.2.2 Software)**

***Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR PCR Experiments (MIQE)***

Es gibt zwar keine allgemein vorgeschriebenen Richtlinien zu Nomenklatur, Ausführung und Interpretation der Quantitativen *Real Time PCR*, bei der Publikation von Daten wird aber mehr und mehr die Einhaltung der *MIQE Guidelines* [28] vorausgesetzt. Die Ausführung des RT-qPCR Assays und die Nomenklatur der Doktorarbeit sind daran angelehnt.

### III. Material und Methoden

#### III.1. Material

##### III.1.1. Laborchemikalien

Ampuwa® (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)

Biozym DNA Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hess.Oldendorf, Deutschland)

*Dulbecco's minimum essential medium* (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

FKS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

*Loading buffer* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

Milli-Q Wasser (Milli-Q PLUS UF, Millipore, Billerica, MA, USA)

Minisart® Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Primer und Sonde: Konz: *Synthesis Scale* 0,04µmol, *Purification* HPLC, lyophilisiert (Metabion international AG, Martinsried, Deutschland)

Pursept-A Xpress (Merz Hygiene GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland)

*RNaseZap* (Ambion/Applied Biosystems Austin, TX, USA)

SP6 RNA Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

**Tabelle 3 TBE-Puffer: pH 8,3**

10x	
Tris base	0,89mM
Borsäure	0,89mM
EDTA	20mM

**Tabelle 4 TE-Puffer: pH 7,4**

10x	
Tris Cl	0,1M
EDTA	10mM

##### III.1.2. Medikamente

Rompun (Bayer, Leverkusen, Deutschland)

Vetranquil (Sanovi Serva, Düsseldorf, Deutschland)

Ketamin (WDT, Garbsen, Deutschland)

Natriumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Novalgin (Aventis Pharma Deutschland GmbH)

##### III.1.3. Kits

*Agpath-ID™ One-Step RT-PCR Kit* (Ambion, Kassel, Deutschland)

*MinElute Reaction Cleanup Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland)

*QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
*QIAGEN®OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
*QuantiTect Probe RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
*RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
Precellys Keramik-Kit 1.4/2.8mm (PepLab, Erlangen, Deutschland)

#### **III.1.4. Geräte**

Eppendorf *Centrifuge* 5415R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)  
Micro-Dismembrator S (230V, 50-60Hz, B.Braun Biotech International)  
Photospektrometer (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)  
*Real Time* Gerät (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)  
Schüttelgerät *FastPrep®* -24 (MP Biomedicals Europe, 67402 Illkirch, Frankreich)  
Schüttler (Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)  
Thermocycler (TPersonalThermocycler, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)

#### **III.1.5. Maushaltung**

Filter Top Käfig Typ II Makrolon® (verschiedene Hersteller)  
Holzspäne (Lignocel ¾, Rettenmeier, Rosenberg, Deutschland)  
IVCs (VentiRacks™; BioZone, Margate, UK)  
Mausdiät (1314, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland)

#### **III.1.6. Virusstocks von MNV-4 und MNV-S99**

MNV-4 wurde uns freundlicherweise von Robert S. Livingston, RADIL, Missouri, USA und MNV-S99 von Birthe Müller, RKI, Berlin zur Verfügung gestellt. Die Viren wurden vor Verwendung zur Aufbewahrung bei -80°C eingefroren.

#### **III.1.7. Zelllinien**

RAW264.7 Zellen wurden von LCG PROMOCHEM GMBH, Wesel, Deutschland, bezogen. Es handelt sich um eine Maus-Monozyten/Makrophagenzelllinie, die aus Abelson-Mausleukämie-Virus-haltigem Aszites gewonnen wurde.

### III.2. Mäuse

Es wurden Auszuchtmäuse der Linie Crl:CD1(Icr)/Dcm (*Dcm = Department of Comparative Medicine*), die an unserer Einrichtung im Barrierebereich gezüchtet wurden, verwendet.

Für den Inokulationsversuch Sentinelmonitoring wurden vier Wochen alte männliche und weibliche Inzuchttiere der Linie C57BL/6J, bezogen von Charles River Deutschland (Sulzfeld, Deutschland) genutzt.

Im Feldversuch wurden Sentinels aus oben genannter eigener Zuchtkolonie eingesetzt. Bei den durch diese Sentinels zu überwachenden Versuchsmäusen handelte es sich um Mäuse verschiedener experimenteller Zuchten, überwiegend transgene Mäuse auf C57BL/6J Hintergrund, die auch für die Organentnahmen verwendet wurden.

### III.3. Versuchstierhaltung und Hygienemonitoring

Die Zuchtmäuse, von denen die Sentinels stammten, wurden in Barrierebereichen in Käfigen Typ II Makrolon® bei einer Temperatur von 20 bis 24°C, einer Luftfeuchte von 50 bis 60%, 15 Luftwechseln pro Stunde und einem 12/12-Stunden Lichtregime gehalten. Bei Arbeiten im Zucht-Barrierebereich trugen die Mitarbeiter autoklavierte Kleidung, Einmalhandschuhe, Kopfhäuben und Mundschutz. Der Zucht-Barrierebereich konnte nur durch eine Schleuse mit Nassdusche betreten werden. Die Mäuse wurden mit Silikon gepolsterten desinfizierten Pinzetten in einer als Umsetzstation genutzten Klasse 2 Sicherheitswerkbank in frische Käfige umgesetzt. Alle Materialien wurden vor der Benutzung autoklaviert oder chemisch desinfiziert.

Die Mäuse für die Experimente mit künstlicher Infektion und die entsprechenden Kontrollmäuse wurden in einzeln belüfteten Käfigen (IVCs, VentiRacks™; BioZone, Margate, UK) bei einer Temperatur von 22°C, einer Luftfeuchte von von 50 bis 60% und einem 12/12-Stunden Lichtregime gehalten. Die Mitarbeiter trugen autoklavierte Kleidung, Einmalhandschuhe, Kopfhäuben und Mundschutz. Alle Materialien wurden vor der Verwendung autoklaviert oder chemisch desinfiziert. Jede Manipulation der Tiere wurde in einer Klasse 2 Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Die Mäuse für die Feldversuche wurden in offenen Käfigen Typ II Makrolon® bei einer Temperatur von 21 bis 23°C, einer Luftfeuchte von 50 bis 60% und einem 12/12-Stunden Lichtregime gehalten. Die Mitarbeiter mussten sich, um den Tierbereich zu betreten, durch eine Luftschleuse einduschen und trugen autoklavierte Kleidung, Einmalhandschuhe, Kopfhäuben und Mundschutz. Alle Materialien wurden vor der Verwendung autoklaviert oder chemisch desinfiziert.

In allen Haltungsbereichen wurden als Einstreu Holzspäne (Lignocel ¾, Rettenmeier, Rosenberg) verwendet. Alle Mäuse wurden mit einer kommerziell erhältlichen Standarddiät

für Nager (Altromin 1314 TPF, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage) gefüttert. Den Mäusen wurde filtriertes (Filtergröße 0,2µm) teilentmineralisiertes Wasser ad libitum angeboten.

Das routinemäßige Hygienemonitoring stellte sich wie folgt dar:

Im Zuchtbereich wurden die Maus Kolonien alle sechs Wochen von einer externen Firma mikrobiologisch untersucht, indem männliche Crl:CD1(Icr)/Dcm Sentinels verwendet wurden. Es wurden Aliquots in einer Menge von circa 5cm<sup>3</sup> schmutziger Einstreu von jedem Käfig eines Racks entnommen und in einer sterilen Box mit einer äquivalenten Menge an frischer steriler Einstreu gemischt. Über einen Zeitraum von 12 Wochen wurde die daraus hervorgegangene Mischung dem Sentinelkäfig des entsprechenden Racks zugeteilt und anschließend die Sentinels seziert und untersucht.

In den übrigen Tierhaltungen wurden viermal jährlich jeweils zwei männliche Crl:CD1(Icr)/Dcm Sentinels mit einem Alter von ca. 8 Wochen in den jeweiligen Raum des Tierstalles eingesetzt. Sie wurden einzeln in offenen Käfigen gehalten und nach einem Zeitraum von 11 bis 14 Wochen serologisch und bakteriologisch untersucht. Ihnen wurde während des Untersuchungszeitraumes aus der schmutzigen Einstreu jedes im Raum befindlichen besetzten Käfigs mindestens zweimal eine gepoolte Probe der schmutzigen Einstreu zugeführt.

Die serologischen Untersuchungen wurden gemäß den Empfehlungen der FELASA (*Federation of Laboratory Animal Science Associations*) [5] mit der Ergänzung von *Leptospira serogroups ballum, canicola, hebdomadis* und *icterohaemorrhagiae*, K virus, Lactate dehydrogenase virus, Polyoma virus, Mouse thymic virus, Hantaviruses und dem Murinen Norovirus durchgeführt. Die Empfehlungen der FELASA für die Untersuchung von Bakterien, Mykoplasmen und Pilzen wurden ergänzt durch *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae*. Außerdem wurden die Sentinels auf Existenz folgender Parasiten getestet: *Aspicularis sp.*, *Syphacia sp.*, Coccidien, *Giardia spp.*, *Spironucleus muris*, *Trichomonas*, Protozoan flagellates (i.e. *Enteromonas*) und Arthropoden.

In den Zuchtbereichen wurden die Mäuse auf oben erwähnte Infektionserreger durchgehend negativ getestet.

#### **III.4. Erstellung einer Verdünnungsreihe von MNV-S99 und MNV-4 und Inokulation von Virus in Mäuse**

##### **Erstellung einer Verdünnungsreihe von MNV-S99 und MNV-4**

Erstellung der Verdünnungsreihen von MNV-S99 und MNV-4 zur oralen Inokulation:

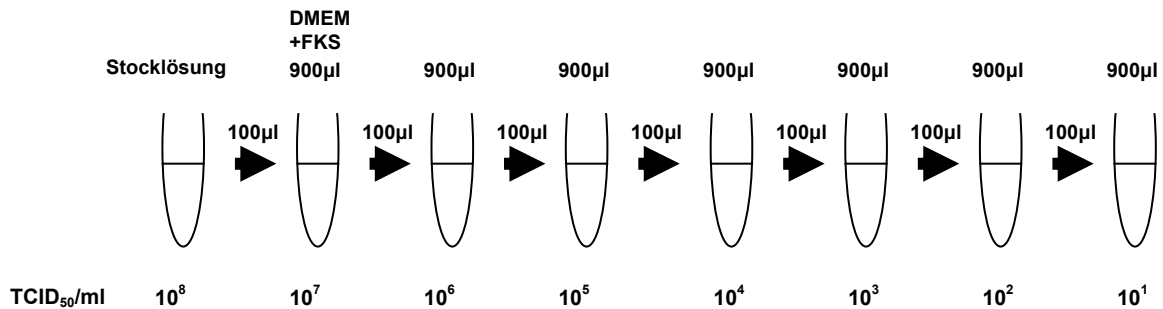
Der Virusstock von MNV-S99 hatte eine TCID<sub>50</sub>/ml von 10<sup>8</sup>, der Virusstock von MNV-4 hatte eine TCID<sub>50</sub>/ml von 10<sup>11</sup>.

Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:10 Verdünnungsschritten wie folgt erstellt:



Der oben genannte Virusstock von MNV-4 wurde vor Erstellung der Verdünnungsreihe bereits 1:1000 mit DMEM + 10% FKS verdünnt.

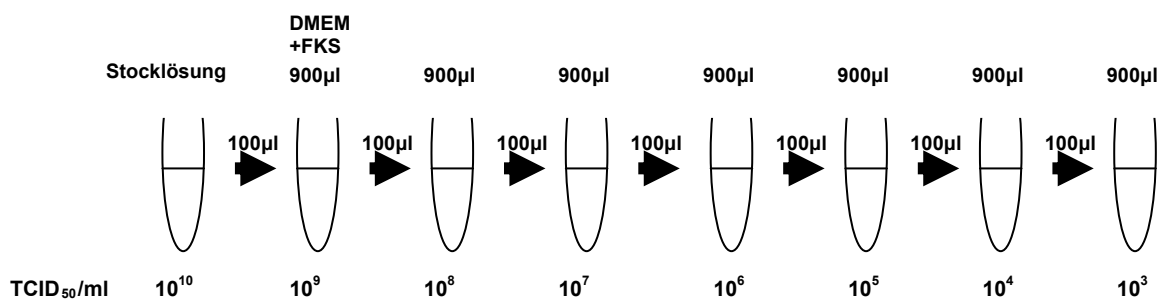
Aus dieser Stockverdünnung mit einer TCID<sub>50</sub>/ml von 10<sup>8</sup> und einem Volumen von 1ml wurde eine Teilmenge von 100µl entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit 900µl DMEM + 10% FKS gegeben. Nach gründlichem Mischen der entstandenen Lösung wurde dieser Schritt weitere sechsmal wiederholt, bis acht Verdünnungsstufen bis zu einer Verdünnung von 10<sup>1</sup> TCID<sub>50</sub>/ml vorhanden waren (Abbildung 7).



**Abbildung 7 Erstellung einer Verdünnungsreihe von MNV-S99 zur oralen und intrauterinen Inokulation und von MNV-4 zur oralen Inokulation**

Erstellung der Verdünnungsreihen von MNV-S99 und MNV-4 zur intrauterinen Inokulation:

Da für die intrauterine Inokulation ein geringeres Inokulationsvolumen (1µl statt 100µl) benötigt wurde, wurde eine Verdünnungsreihe mit 100fach höherer Viruskonzentration, nämlich mit einer TCID<sub>50</sub>/ml von 10<sup>10</sup> bis 10<sup>3</sup> wie oben genannt erstellt. Der Virusstock von MNV-4 wurde dafür vorher 1:10 verdünnt, so dass 1ml einer Stocklösung mit einer TCID<sub>50</sub>/ml von 10<sup>10</sup> entstand (Abbildung 8).



**Abbildung 8 Erstellung einer Verdünnungsreihe von MNV-4 zur intrauterinen Inokulation**

Da MNV-S99 in der Konzentration 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml vorlag, konnte den Mäusen intrauterin von diesem Virus die Verdünnungsstufen 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/Maus bis 10<sup>0</sup> TCID<sub>50</sub>/Maus inokuliert werden.

Für die Kontrollgruppe wurde DMEM + 10% FKS verwendet.

## **Inokulation von Mäusen**

### **Intrauterine Inokulation:**

Für die Intrauterine Inokulation wurden, wie für einen Routine-Blastozystentransfer, acht Wochen alte, weibliche pseudogravide Auszuchtmäuse der Linie Crl:CD1(Icr)/Dcm verwendet. Um pseudogravide Mäuse zu erhalten, wurden die Tiere mit vasktomierten Männchen verpaart, auf Scheinträchtigkeit geprüft und 2,5 Tage später für die Inokulation verwendet. Die Mäuse wurden unter Narkose intrauterin mit dem Virus inokuliert. Als Narkose wurde ihnen, je nach Gewicht, ca. 0,15ml eines Rompun:Vetranquil:Ketamin-Gemisches (0,39ml:0,12ml:0,39ml in 2,10ml 0.9% NaCl) intraperitoneal injiziert.

Nach Erreichen des Chirurgischen Toleranzstadiums wurde auf Kniehöhe ein Hautschnitt von 0,5mm Länge gesetzt und anschließend die Muskulatur auf 0,5mm Länge durchtrennt. Ovar, Eileiter und Uterus wurden am Fettgewebe vorgelagert und mit einer Klemme fixiert. In der Mitte des Uterus wurde mit der Kanüle ein Loch gestochen, die zu inokulierende Virusmenge von 0,5µl eingebracht und die Organe zurückverlagert. Der Muskelschnitt wurde vernäht und der Hautschnitt mit Wundklammern verschlossen. Das Tier wurde zum Aufwachen auf die Wärmeplatte gelegt und zur postoperativen Analgesie oral mit Novalgin versorgt.

### **Orale Inokulation:**

Zur oralen Inokulation wurde den Mäusen 100µl des Virus mit Knopfkanülen inokuliert. Sie wurden im Nacken so fixiert und hochgehoben, dass der Kopf gestreckt war. Um in den Magen zu gelangen, wurde die Kanüle in die Maulhöhle eingeführt, bis der Kehlkopf berührt und damit der Schluckreiz ausgelöst wurde. Die Kanüle wurde so weit eingeführt, bis ein leichter Widerstand zu spüren war und die zu inokulierende Virusmenge eingebracht werden konnte.

## **III.5. Probenentnahme und Lagerung**

### **III.5.1. Kot**

Kot wurde mit Einmalpinzetten aus den Käfigen der Mäuse entnommen. Außer bei der Entnahme von Sammelproben aus mit mehreren Mäusen besetzten Käfigen wurden in Gruppen sitzende Mäuse am Tag vor der Kotentnahme einzeln in frische Käfige gesetzt. Unmittelbar nach der Entnahme der Kotpellets wurden die Tiere in ihre ursprünglichen Gruppen zurückgesetzt.

Für den Versuch IV.6.2, Organentnahme von mit MNV natürlich infizierten Mäusen, wurde der Kot direkt aus dem Dickdarm entnommen, indem der Apex Caeci entfernt, der Kot herausgedrückt und in einem Eppendorf Gefäß aufgefangen wurde.

War die sofortige Isolierung der RNA aus den Kotproben nicht möglich, wurden sie bei

-20°C eingefroren. Bei längerfristiger Lagerung (> 7 Tage) wurden die Kotpellets bei -80°C eingefroren.

### **III.5.2. Blut**

Blut für die Isolierung von RNA wurde nach Töten des Tieres gewonnen, indem unmittelbar nach Töten des Tieres mit CO<sub>2</sub> mit einer Spritze Blut direkt aus dem Herzen entnommen wurde, bis dieses entblutet war. Die Probe wurde in ein Eppendorf Gefäß gegeben und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Zur Blutentnahme für die Serologie wurden die Mäuse unter einer Rotlichtlampe wenige Minuten erwärmt damit ein guter Blutfluss im Schwanz gewährleistet war und zur Fixierung in eine Blutentnahmeröhre gesetzt, so dass der Schwanz frei war und leicht fixiert werden konnte. Den Mäusen wurde 150µl Blut aus der lateralen Schwanzvene entnommen, das Blut im Serumröhrchen ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Serum wurde bis zum Versand kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20°C gelagert.

### **III.5.3. Organe**

Zur Entnahme von Organen wurden die Tiere durch Genickbruch oder mit CO<sub>2</sub> getötet. Es wurde das entsprechende Organ freigelegt, das vollständige Ovar oder der Nebenhoden, ein vollständiger Mesenteriallymphknoten und ein Stück des Caecums von ca. 2\*2\*2mm<sup>3</sup> Größe entnommen, in ein 1,8ml Kryoröhrchen gegeben und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

## **III.6. Serologische Untersuchungen**

Die serologischen Untersuchungen der Abschnitte IV.2.1 Direkte Inokulation von Mäusen mit den Laborvirusstämmen MNV-4 und MNV-S99, IV.2.2 MNV-4 Langzeitausscheidung und IV.3 Überprüfung der Übertragung von Laborvirus über gebrauchte Einstreu, Ausscheidungsverhalten und Serokonversion von Sentinels wurden durchgeführt in Kollaboration mit Jeffrey Needham, The Microbiology Laboratories, North Harrow, Middlesex, United Kingdom.

Die Serologischen Untersuchungen des Abschnitts IV.4 Feldversuch Sentinelscreening wurden in kommerziellen Untersuchungslabors durchgeführt.

## **III.7. Isolierung der Virus-RNA aus den zu untersuchenden Proben**

### **III.7.1. Zellkulturüberstand**

Es wurde 140 µl Zellkulturüberstand entnommen und entsprechend dem *QIAamp Viral RNA Mini Kit* die Isolation der gesamten RNA durchgeführt.

### III.7.2. Kot

Es wurde eine Kotsuspension hergestellt, indem die gesammelten Kotpellets mit der entsprechenden Menge Milli Q Wasser, nämlich, je nach Kotvolumen zwischen 300 und 500µl, versetzt wurden, so dass nach Zentrifugation ein Überstand von ca. 140µl entstand. Die Suspension wurde bei 1400rpm und 20°C für 20 Minuten geschüttelt und 8 Minuten bei 8000rpm zentrifugiert. Virus RNA wurde aus den 140µl Überstand mit dem *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

### III.7.3. Organe

Die Organproben wurden nach Entnahme sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Bis zur Homogenisation mit der Schwingmühle wurden alle Schritte auf Trockeneis durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Schüttelbehälter für den Micro-Dismembrator S (230V, 50-60Hz, B.Braun Biotech International) wurden diese gründlich mit destilliertem Wasser gespült und mit Pursept-A Xpress (Merz Hygiene GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland) eingesprüht, sowie nach dem Trocknen mit *RNaseZap* (Ambion/Applied Biosystems Austin, TX, USA) behandelt. Nach der Reinigung und Dekontamination wurden die Behälter auf Trockeneis eingefroren und der *Buffer RLT* aus dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) hineinpipetiert. Nach vollständigem Gefrieren des Puffers wurden die ebenfalls gefrorenen Kugeln und das aufzureinigende Organ zugegeben und bei 2000rpm für 45 Sekunden homogenisiert.

Zur Entnahme des homogenisierten Organs wurde der Inhalt des Schüttelbehälters nach dem Auftauen mit der Pipette entnommen und in 1,5ml Eppendorf Gefäße gegeben. Die RNA-Isolation aus den Organen wurde anschließend entsprechend dem *RNeasy Mini Kit* Protokoll für die Isolation der gesamten RNA aus Gewebe durchgeführt.

Alternativ wurden die Organe in einem Schüttelgerät *FastPrep®-24* homogenisiert. Dafür wurden in die Einmal-Schütteltubes (Precellys Keramik-Kit 1.4/2.8mm, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) je nach Gewicht des Organes 350µl (<20mg) oder 600µl (20-30mg) des RLT Puffers gegeben, die gefrorenen Organe dazugegeben und unmittelbar bei 5,5m/s 60 Sekunden geschüttelt. Das Homogenisat wurde abzentrifugiert, mit der Pipette 300µl oder 500µl entnommen und in 1,5ml Eppendorf Gefäße gegeben. Anschließend wurde die RNA-Isolation aus den Organen entsprechend dem *RNeasy Mini Kit* Protokoll für die Isolation der gesamten RNA aus Gewebe durchgeführt.

#### **III.7.4. Blut**

Die Mäuse wurden getötet, entblutet und einige Tropfen Blut mit Milli Q Wasser auf 140µl aufgefüllt. Anschließend wurde das verdünnte Blut bei 1400rpm und 20°C für 20 Minuten geschüttelt (Eppendorf Thermomixer Comfort) und 8 Minuten bei 8000rpm zentrifugiert.

Die RNA wurde gemäß dem *QIAamp Viral RNA Mini Kit* isoliert.

Alle beschriebenen Proben wurden sofort in der PCR eingesetzt oder bei -20°C eingefroren. Längerfristig wurden sie bei -80°C gelagert.

#### **III.8. Isolierung von Virus aus dem Kot**

##### **III.8.1. Virusisolierung aus der Tierhaltung**

Zur Isolierung eines Murinen Norovirus aus der Versuchstierhaltung des Helmholtz-Zentrums wurde ein Raum aus einem Barrierebereich ausgewählt, der mit offenen Käfigen ausgestattet war. In diesem Raum war zum Zeitpunkt der Probennahme nach der vierteljährlichen Untersuchungen des Routine-Monitorings das Murine Norovirus vorhanden. Der Besatz des Raumes bestand aus transgenen Mäusen auf C57BL/6J Hintergrund, die zur Zucht sowie für Experimente gehalten wurden.

##### **III.8.2. Kotaufbereitung**

Das Feldvirus aus der Maushaltung des Helmholtz-Zentrums wurde aus Kotpellets isoliert und in der Zellkultur vermehrt. Die Sammelprobe von 20 Kotpellets wurde mit Milli Q Wasser versetzt, so dass eine 20 %ige Suspension entstand. Die Suspension wurde 20min bei 1400rpm in einem Schüttler (Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 8 Minuten bei 8000rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde entnommen und zweimal zur Entfernung von Bakterien und Pilzen durch einen Minisart® Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einer Mikroporengröße von 0.20µm filtriert.

##### **III.8.3. Virusanzucht und –vermehrung in der Zellkultur**

Zur Vermehrung des Virus wurde ein Milliliter des Kotfiltrats auf RAW 264.7 Zellen, ausgesät in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in DMEM, ergänzt durch 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in luftbefeuchteter Umgebung gegeben.

Die Zellen hatten eine Konfluenz von ca. 50%.

Nach vier Tagen konnte eine weitgehende Ablösung der Zellen beobachtet werden, so dass das Virus geerntet wurde, indem die verbleibenden Zellen abgeschabt und das Medium entnommen wurde. Dieses wurde drei Mal bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut um

die Zellstruktur zu zerstören und das Virus freizusetzen und anschließend bei 3000rpm 5min zentrifugiert, so dass sich ein Pellet bildete. Der virushaltige Überstand wurde entnommen und durch einen Minisart® Filter mit einer Mikroporengröße von 0,20µm filtriert. Der so entstandene Virusstock wurde bis zur Verwendung bei -80°C in Aliquots von 1,5ml eingefroren.

Zur weiteren Verwendung wurde der jeweilige Virusstock bei 37°C aufgetaut. Zur erneuten Anzucht wurden die Viren in DMEM, ergänzt durch 20% hitzeinaktiviertes FKS resuspendiert und auf RAW 264.7 Zellen gegeben. Die Vermehrung des Virusstocks wurde in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in luftbefeuchteter Umgebung in DMEM, ergänzt durch 10% FKS durchgeführt.

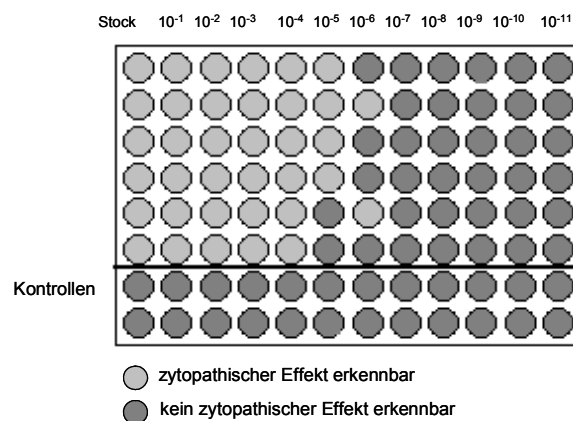
### III.8.4. Virusquantifizierung

Die Quantifizierung des Virus wurde sowohl durch Virustitration auf RAW 264.7-Zellen sowie durch RT-qPCR durchgeführt.

#### Virustitration

Zur Titration wurden RAW 264.7 Zellen in einer Konzentration von 1\*10<sup>4</sup>/well auf 96-well Platten ausgesät und über Nacht in Kultur genommen. Nach Abnahme des Kulturmediums (DMEM + 10% FKS) wurden 12er Reihen einer 96-well-Platte mit je 100µl des Virusstocks und seiner 10 fachen Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-11</sup> infiziert. Jede Bestimmung eines Titers wurde mindestens in doppelter Ausfertigung angesetzt. Der Zytopathische Effekt (ZPE) wurde am fünften Tag bestimmt (Abbildung 9). Die *mean tissue culture infective dose* (TCID<sub>50</sub>) wurde für jeden Virusstock nach der Spearman-Kaerber Methode berechnet (Formel 1).

Bestimmung des Zytopathischen Effektes und Berechnung mit der Spearman-Kaerber Methode:



**Abbildung 9 Bestimmung des Zytopathischen Effekts durch Inkubation und anschließender Beurteilung der Verdünnungsreihe auf einer 96-well Platte**

$$\text{Höchste Verdünnungsstufe mit 100\% ZPE} + \frac{1}{2} - \frac{\text{Gesamtanzahl wells mit ZPE}}{\text{Anzahl wells pro Verdünnungsstufe}}$$

**Formel 1 Berechnung der TCID<sub>50</sub> nach Spaerman-Kaerber**

**Real time PCR**

Die Virus-RNA wurde aus 140µl des reinen Virusstockes mit dem *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Daraus entstand ein Eluat von 60µl. Von diesem Eluat wurden 5µl in der *Real Time PCR* eingesetzt. Zur Berechnung der Kopienzahl/Ansatz wurde die Kopienzahl/5µl mit 12 multipliziert.

**III.9. Konventionelle PCR**

**III.9.1. Master Mix**

Ausgeführt wurde die PCR mit dem *QIAGEN®OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) und einem Volumen von 25µl Reaktionslösung.

Die verwendeten Primer und der Master Mix waren wie folgt:

<b>forward Primer</b>	<b>5`-CAG ATC ACA TGC TTC CAA-3`</b>
<b>reverse Primer</b>	<b>5`-AGA CCA CAA AAG ACT CAT CAC -3`</b>

**Tabelle 5 Master Mix gel based PCR (Angaben in µl)**

Anzahl der Proben	1,0
<b>Primer 1 600nM</b>	<b>1,5</b>
<b>Primer 2 600nM</b>	<b>1,5</b>
<b>Q-Solution</b>	<b>5,0</b>
<b>dNTP-Mix</b>	<b>1,0</b>
<b>5x One Step Puffer</b>	<b>5,0</b>
<b>One Step Enzyme Mix</b>	<b>1,0</b>
<b>RNAse free Water</b>	<b>7,0</b>
<b>Probenvolumen</b>	<b>3,0</b>

**III.9.2. Temperaturprotokoll**

Das Temperaturprotokoll war folgendes: Reverse Transkription bei 50°C für 30 Minuten, initiale Denaturation bei 95°C für 15 Minuten, für Denaturation, Hybridisierung der Primer und Elongation wurden 40 Zyklen mit 94°C für 15 Sekunden, 55°C für 60 Sekunden und 72°C für 60 Sekunden eingesetzt und für die finale Elongation 72°C für 10 Minuten.

**Tabelle 6 Temperaturprotokoll gel based PCR**

Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit [Min:Sec]	Bemerkung
	50	30	Reverse Transkription
1 x	95	15:00	Initiale Denaturierung
40 x	94	01:00	Denaturierung
	55	01:00	Primer- Hybridisierung
	72	01:00	Elongation
1 x	72	10:00	Finale Elongation

### III.9.3. Gelelektrophorese

50µl des PCR Produkts wurden mit 10µl *Loading buffer* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) gemischt und 12µl dieser Mischung auf ein 1.5% Agarosegel aufgetragen. Durch Elektrophorese wurden die Produkte aufgetrennt und mit UV-Licht sichtbar gemacht.

### III.9.4. Agarosegel

Es wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt. In einem Erlenmeyerkolben wurden zu 150ml TBE-Puffer 2,25g Agarose gegeben und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Die Lösung wurde zum Abkühlen in einen kalten Erlenmeyerkolben gegeben und 20µl Ethidiumbromid hinzupipettiert. Der Inhalt wurde in eine Form gekippt und vor Benutzung ca. eine Stunde zum Abkühlen und Festwerden bei Raumtemperatur inkubiert.

### III.9.5. Laufbedingungen und Photographische Darstellung

Die Proben wurden bei 120 Volt Spannung ca. 45 Minuten in einer Gelkammer laufen gelassen, um die PCR Produkte aufzutrennen.

Die Banden wurden durch UV Licht sichtbar gemacht und anschließend fotografiert.

## III.10. Real Time PCR

### III.10.1. Master Mix

Die PCR wurde entweder mit dem *QuantiTect Probe RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) und einem Volumen von 20µl durchgeführt oder mit dem *Agpath-ID™ One-Step RT-PCR Kit* (Ambion, Kassel, Deutschland) und einem Volumen von 25µl. Die Negativkontrolle bestand aus RNase-freiem Wasser. Die endgültige Reaktionsmischung beinhaltete 4 bzw. 5µl der *Template* RNA. Die Produktlänge betrug 92 Basenpaare.



Eingesetzt wurden in beiden Assays folgende Primer und Sonde:

<b>forward Primer</b>	<b>5`-AGA GGA ATC TAT GCG CCT GG-3`</b>
<b>reverse Primer</b>	<b>5`-GGA GGC GGC CAG AGA CCA-3`</b>
<b>Sonde</b>	<b>5`-Fam-CGC CAC TCC GCA CAA ACA GCC C-Dabcyl-3`</b>

Die zwei Assays setzten sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 7 Master Mix 1 *Real Time PCR* (*Agpath-ID™ One-Step RT-PCR Kit*, Angaben in  $\mu$ l)**

<b>Anzahl der Proben</b>	<b>1,0</b>
<b>Puffer</b>	<b>12,5</b>
<b>Primer 1 800 nM</b>	<b>2,5</b>
<b>Primer 2 800 nM</b>	<b>2,5</b>
<b>Sonde 120nM</b>	<b>1,5</b>
<b>Enzymmix</b>	<b>1,0</b>
<b>Probenvolumen</b>	<b>5,0</b>

**Tabelle 8 Master Mix 2 *Real Time PCR* (*QuantiTect Probe RT-PCR Kit*, Angaben in  $\mu$ l)**

<b>Anzahl der Proben</b>	<b>1,0</b>
<b>Puffer</b>	<b>10,0</b>
<b>Primer 1 250 nM</b>	<b>1,0</b>
<b>Primer 2 250 nM</b>	<b>1,0</b>
<b>Sonde 100 nM</b>	<b>1,0</b>
<b>Enzymmix</b>	<b>0,1</b>
<b>Wasser</b>	<b>1,9</b>
<b>Probenvolumen</b>	<b>5,0</b>

### III.10.2. Temperaturprotokoll

Das Temperaturprotokoll war wie folgt: Reverse Transkription 30 Minuten bei 50°C, RT Inaktivierung/DNA Polymerase Aktivierung 15 Minuten bei 95°C, und 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 55°C für 60 Sekunden zur Amplifikation.

**Tabelle 9 Temperaturprotokoll *Real Time PCR***

<b>Zyklenzahl</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [Min:Sec]</b>	<b>Bemerkung</b>
	50	30	Reverse Transkription
1 x	95	15:00	Initiale Denaturierung
40 x	95	00:15	Denaturierung
	55	01:00	Primer-Hybridisierung

### III.10.3. Standard

Zur Bestimmung der Anzahl der Amplifikate wurde das PCR-Produkt

5'CAGATCACATGCTTCCCACATGTCATGTGTGATGTGCGCACCCCTGGAGCCCATTCAAC  
TCCCTCTTCTTGATGTGCGTTCGAGTTCTTTGGCATGCTACCCAGGATCAGGAGGAATCT  
ATGCGCCTGGTCTGCATGCTGTACACGCCACTCCGCACAAACAGCCCGGGTGATGAGT  
CTTTTGTGGTCTA-3'

in ein Plasmid (pCR®II-TOPO) inkliniert (Bezeichnung: Plasmid München) und in einer Verdünnung von  $3 \cdot 10^8$  Kopien/5µl bis  $3 \cdot 10^3$  Kopien/5µl verwendet.

### III.10.4. Einstellung und Evaluierung der Standardkurve

Der *Threshold* wurde nach einem Vergleich mehrerer Läufe sowie dem Vergleich der logarithmierten Standardkurve und deren Parameter, dem „*Slope*“ sowie dem „ $R^2$ “, auf 0,20 gesetzt. Zudem wurde der *Threshold* in den exponentiell ansteigenden Abschnitt der Standardkurve gesetzt (IV.1.2).

### III.10.5. Berechnungsgrundlage der Kopienzahl in den Proben

Eine Kotprobe wurde mit Milli Q Wasser so versetzt (III.7.2), dass ein Überstand von 140µl entstand. Aus dem Überstand wurde mit dem *QIAamp Viral RNA Mini Kit* die Virus-RNA isoliert. Die RNA wurde aus der Säule mit 60µl Puffer eluiert. Aus den 60µl Eluat wurden 5µl in der *Real Time PCR* als *Template* eingesetzt. Um die Kopienzahl in einer eingesetzten Probe zu berechnen wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Kopien pro eingesetztes } \textit{Template}^*(60/5)$$

Für Kotproben ergab sich also ein Multiplikationsfaktor von 12 für die Berechnung der Kopienzahl in einer Kotprobe.

Organproben wurden, je nach Gewicht, in 350µl bzw. 600µl Puffer gegeben, homogenisiert (III.7.3) und mit dem *RNeasy Mini Kit* die Virus-RNA isoliert. Die RNA wurde in 40µl Puffer eluiert. Aus den 40µl Eluat wurden 5µl in der *Real Time PCR* als *Template* eingesetzt. Um die Kopienzahl in einer eingesetzten Probe zu berechnen wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Kopien pro eingesetztes } \textit{Template}^*(40/5)$$

Für Organproben ergab sich also ein Multiplikationsfaktor von 8 für die Berechnung der Kopienzahl in einer Organprobe.

### III.10.6. Umrechnung zweier Plasmide

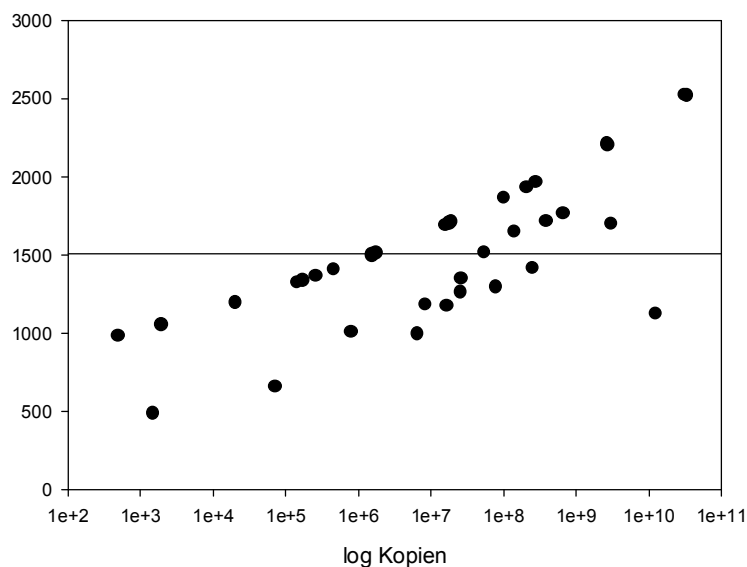
Zu Beginn der Arbeiten wurde ein Plasmid als Standard eingesetzt, das vom RKI in Berlin mit Angabe der Konzentration von  $1 \cdot 10^9$  Kopien/ml zur Verfügung gestellt worden war (Bezeichnung: Plasmid Berlin). Die Konzentration an Nukleinsäure war aufgrund der geringen Konzentration photospektrometrisch nicht überprüfbar. Wir erstellten zusätzlich ein

eigenes Plasmid als Standard (Plasmid München) und stellten fest, dass die Angabe aus Berlin fehlerhaft sein musste. Um die früheren Ergebnisse verwenden zu können, wurde ein Korrekturfaktor festgelegt.

Die Läufe der RT-qPCR mit dem Plasmid, das uns vom RKI in Berlin zur Verfügung gestellt wurde (Plasmid Berlin), wurden mit dem *QuantiTect Probe RT-PCR Kit* (Qiagen) und einem Volumen von 20µl durchgeführt, Läufe der qRT-PCR mit dem selbst hergestellten Plasmid (Plasmid München) wurden mit dem *Agpath-ID™ One-Step RT-PCR Kit* (Ambion) und einem Volumen von 25µl durchgeführt.

Die Plasmide München und Berlin wurden mehrmals beide im selben *Real Time PCR* Lauf mit dem *Agpath-ID™ One-Step RT-PCR Kit* (Ambion) und einem Volumen von 25µl durchgeführt. Nach Evaluierung unseres eigenen Plasmids (Plasmid München) wurden zur Berechnung des Korrekturfaktors zwei Läufe mit insgesamt 37 unterschiedlichen, als unbekannt angegebenen Proben und fünf Negativkontrollen sowohl mit dem Plasmid München als auch mit dem Plasmid Berlin ausgewertet. Es handelte sich bei den als unbekannt eingesetzten Proben um eine Verdünnungsreihe des Plasmids Berlin sowie Kot- und Staubproben, in denen unterschiedliche Mengen an MNV zu erwarten waren.

Es wurde der Quotient der Ergebnisse, die durch Auswertung mit dem Münchner Plasmid entstanden, und der Ergebnisse, die nach Auswertung mit dem Berliner Plasmid entstanden, gebildet. Aus den daraus resultierenden Einzelergebnissen wurde der Mittelwert gebildet, der den Korrekturfaktor ergab. Je höher die Anzahl der Kopien in den Proben war, desto höhere Einzelergebnisse des Quotienten ergaben sich. Der Mittelwert aus diesen Ergebnissen ergab einen Wert von  $1,5 \cdot 10^3$  (Abbildung 10).



**Abbildung 10 Berechnung des Umrechnungsfaktors**  
**Umrechnungsfaktor vs. Kopienzahl (Basis Plasmid München)**

Dieser Wert wurde als Korrekturfaktor festgelegt und die Ergebnisse aller mit dem Berliner Plasmid getesteten Proben wurden mit diesem Faktor multipliziert. So konnten die Proben, die mit dem Berliner Plasmid als Standard gemessen wurden, im Vergleich zu den später getesteten Proben besser eingeschätzt werden.

## IV. Ergebnisse

### IV.1. Etablierung eines Nachweisverfahrens: RT-qPCR

Zum Nachweis von Virus RNA in organischen Materialien wurde ein Nachweisverfahren, die Quantitative Reverse Transkriptase PCR, etabliert. Um den Qualitätskriterien der Sensitivität, Spezifität und der Reproduzierbarkeit zu entsprechen, wurden einige Tests zur Validierung der Methode durchgeführt. Es wurde ein DNA-Standard kalibriert, die Effektivität der Reversen Transkriptionsreaktion durch einen RNA-Standard getestet und der Einfluss von Kot auf die gemessene Kopienzahl ermittelt.

#### IV.1.1. Berechnung und Erstellung des DNA-Standards

Der DNA Standard bestand aus einem Plasmid pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> mit einem *Insert* (III.10.3) von 90 Basenpaaren (bp) und damit einer Gesamtgröße von 4063 bp. Die Berechnung zum Einsatz des DNA Plasmids als Standard mit einer Kopienzahl von  $3 \cdot 10^8$  Kopien/5 $\mu$ l bis  $3 \cdot 10^3$  Kopien/5 $\mu$ l fand wie folgt statt.

Die Plasmidmasse eines Moleküls wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Masse (g)} = \text{bp} \cdot 1,096 \cdot 10^{-21} \text{g} = 4063 \cdot 1,096 \cdot 10^{-21} \text{g} = 4,45 \cdot 10^{-18} \text{g}$$

Für die Plasmidmasse ergab sich ein Wert von  $4,45 \cdot 10^{-18}$ g. Da die Stammlösung auf eine Konzentration von  $3 \cdot 10^8$  Kopien/5 $\mu$ l eingestellt wurde, wurde die Anzahl der Kopien mit der Masse eines Moleküls multipliziert und diese, da sich die Kopienzahl von  $3 \cdot 10^8$  Kopien in 5 $\mu$ l befinden sollte, durch 5 geteilt.

$$3 \cdot 10^8 / 5 \mu\text{l} \cdot 4,45 \cdot 10^{-18} \text{g} = 13,35 \cdot 10^{-10} \text{g} / 5 \mu\text{l} = 2,67 \cdot 10^{-10} \text{g} / \mu\text{l}$$

In 1  $\mu$ l Stammlösung sollte sich also  $2,67 \cdot 10^{-10}$ g DNA befinden.

Die Konzentration des hergestellten Plasmids (Grundstock) wurde photospektrometrisch gemessen und ergab einen Wert von 91,5  $\mu$ g/ml =  $91,5 \cdot 10^{-9}$ g/ $\mu$ l. Um die für ein Volumen der Stammlösung von 100 $\mu$ l benötigte Verdünnung zu errechnen, wurde die Formel

$$c_1 \cdot v_1 = c_2 \cdot v_2$$

$$91,5 \cdot 10^{-9} \text{g} / \mu\text{l} \cdot v_1 = 2,67 \cdot 10^{-10} \text{g} / \mu\text{l} \cdot 100 \mu\text{l}$$

verwendet und nach  $v_1$ , dem benötigten Volumen des Grundstockes, aufgelöst.

$$v_1 = (2,67 \cdot 10^{-10} \text{g} / \mu\text{l} \cdot 100 \mu\text{l}) / 91,5 \cdot 10^{-9} \text{g} = 0,029 \mu\text{l}$$

Das benötigte Volumen des Grundstockes, um  $3 \cdot 10^8$  Kopien in 5 $\mu$ l zu erhalten, ergab also einen Wert von 0,029 $\mu$ l. Um eine Stammlösung von  $3 \cdot 10^8$ /5 $\mu$ l zu erhalten, wurde das Plasmid drei mal 1:10 verdünnt, 29 $\mu$ l Plasmid mit 71 $\mu$ l TE-Puffer versetzt und in mehreren Aliquots eingefroren.

#### IV.1.2. Kalibrierung der RT-qPCR mit einem DNA-Standard

Um den *Threshold*, der für die Vergleichbarkeit zukünftiger RT-qPCR Läufe essentiell war, auf einen in unserem Assay zu verwendenden Wert festzusetzen, wurde der Verlauf des Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n$ ) der Standards aus fünf RT-qPCR Läufen mit dem mehrerer Proben verglichen. Der *Threshold* wurde mit dem Wert 0,20 so festgesetzt, dass *Slope* und  $R^2$ -Wert in allen fünf Läufen nahe dem Optimum lagen und dass nur Proben, die eine klar verlaufende Kurve des Fluoreszenzsignals mit exponentiellem Anstieg und Plateauphase ausbildeten, den *Threshold* schnitten und so als positive Probe angezeigt wurden (Abbildung 11). Der Zyklus, an dem der *Threshold* die Amplifikationskurve schneidet wird als *Ct* (*Threshold cycle*) oder, nach den aktuellen *MIQE Guidelines* [28] als *Cq* (*Quantification cycle*), bezeichnet. Der *Slope*, der die Steigung der Geraden, gebildet aus den Schnittpunkten der Fluoreszenzkurve mit dem *Threshold* und der eingesetzten Kopienzahl der Verdünnungsstufen des Plasmids, beschreibt, soll einem Optimalwert von -3,32 nahe kommen. Dieser entspricht einer Effizienz von 100%, was bedeutet, dass sich die DNA bei jedem Zyklus verdoppelt. Die vertretbare Effizienz der PCR bewegt sich im Bereich von 90-110%, was einem *Slope* von -3,1 bis -3,6 entspricht. Der  $R^2$ -Wert beschreibt die Abweichung der Einzelwerte von der Regressionsgeraden und soll sich 1 annähern.

Um einen Standard zu kalibrieren wurden aus oben genannten auf  $3 \cdot 10^8$  Kopien pro 5  $\mu$ l eingestellten Aliquots (IV.1.1), sechs Verdünnungsreihen mit  $3 \cdot 10^8$  Kopien bis  $3 \cdot 10^3$  Kopien pro 5  $\mu$ l erstellt. Die Verdünnungsreihen wurden in sechs RT-qPCR Läufen als Doppelansatz, also in 12 Ansätzen gemessen. Diese zwölf Ansätze des Standards aus den sechs RT-qPCR Läufen wurden mit dem *Threshold* von 0,20 ausgewertet (Beispiel eines Laufes in Abbildung 12) und die *Cq*-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen am Schnittpunkt mit dem *Threshold* gegen die Kopienzahl der jeweiligen Verdünnungsstufe im Zehnerlogarithmus aufgetragen (Darstellung des in Abbildung 12 genannten Beispiels in Abbildung 13). Nach Auswertung der sechs RT-qPCR Läufe (Abbildung 14) lag der  $R^2$ -Wert mit 0,97 und der *Slope* mit -3,17 nahe dem Optimalwert. Die Standardabweichungen der *Cq*-Werte aus den verschiedenen RT-qPCR Läufen bewegten sich in einem sehr gut vertretbaren Bereich zwischen 0,44 und 1,25 (Tabelle 10). Folglich kann bei einer Konfidenz von 95% mit einer Übereinstimmung der künftig erhobenen *Cq*-Werte von  $\pm 0,37$  bei  $3 \cdot 10^8$  Kopien/*Template* bis  $\pm 0,79$  bei  $3 \cdot 10^3$  Kopien/*Template* zum Durchschnitts-*Cq*-Wert der jeweiligen Verdünnungsstufe des Standards gerechnet werden (Tabelle 10).

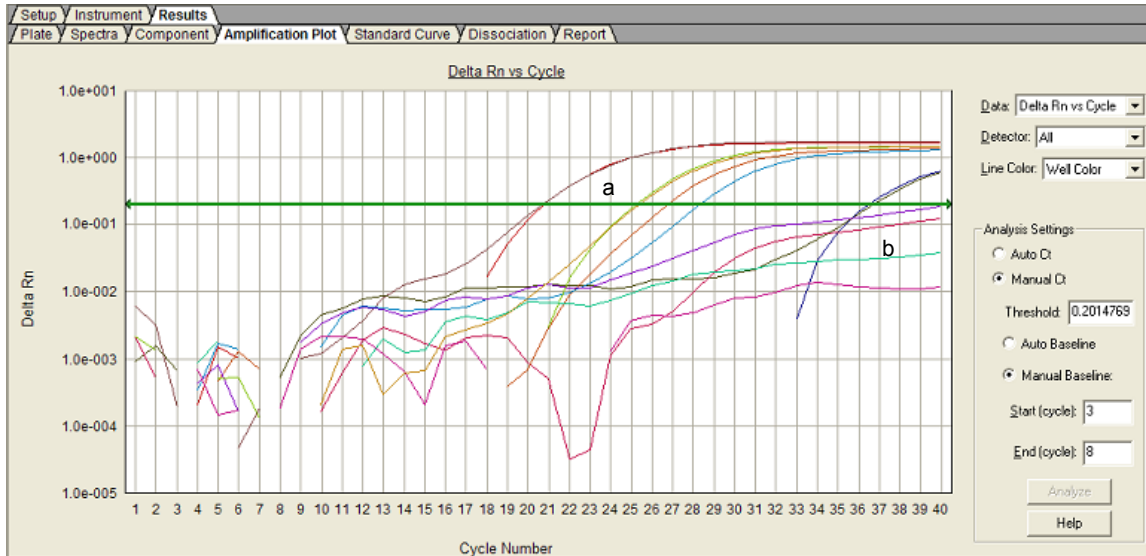


Abbildung 11 Festlegung des *Threshold* durch Vergleich positiver (a) und negativer (b) Proben  
Nur die Proben mit exponentieller Phase und Plateauphase schneiden den *Threshold* (grün)  
und werden als positiv gewertet. (Ansicht 7500System v 1.2.2 Software)

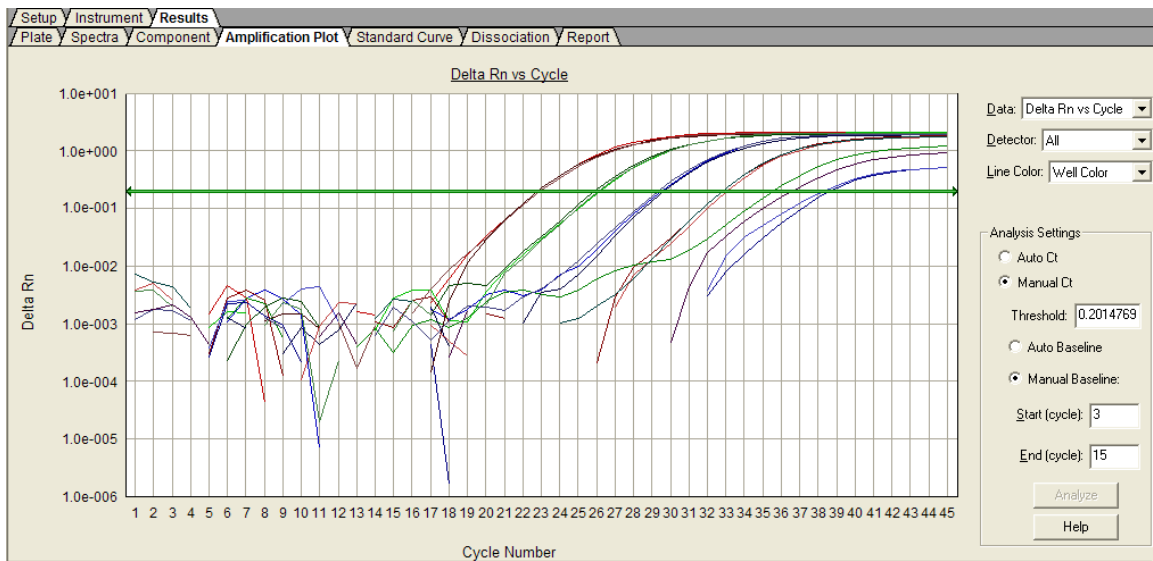


Abbildung 12 Amplifikationskurve der Verdünnungsstufen des Standards, *Threshold* von 0,20  
Delta Rn stellt die Stärke des normalisierten Fluoreszenzsignals dar. (Ansicht 7500System v  
1.2.2 Software)

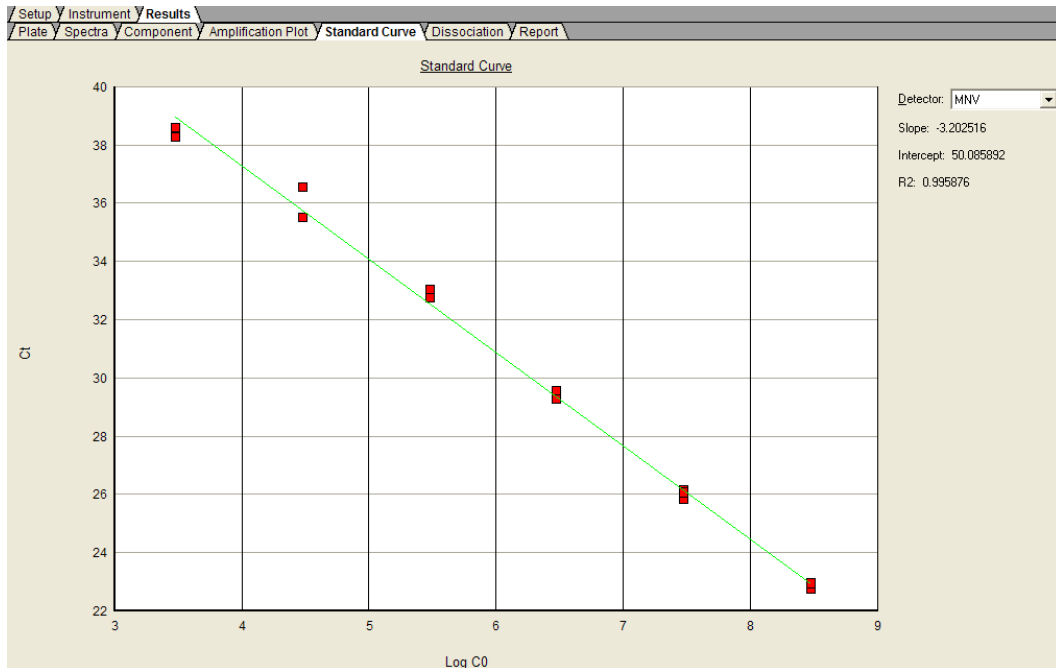


Abbildung 13 Standardkurve: Ansicht der oben genannten Verdünnungsreihe des Standard (Abbildung 12)

Dargestellt als Cq (=Ct) vs. Eingesetzte Kopienzahl (log). Slope von -3,20; R2-Wert von 0,996 (Ansicht 7500System v 1.2.2 Software)

Standard MNV PCR

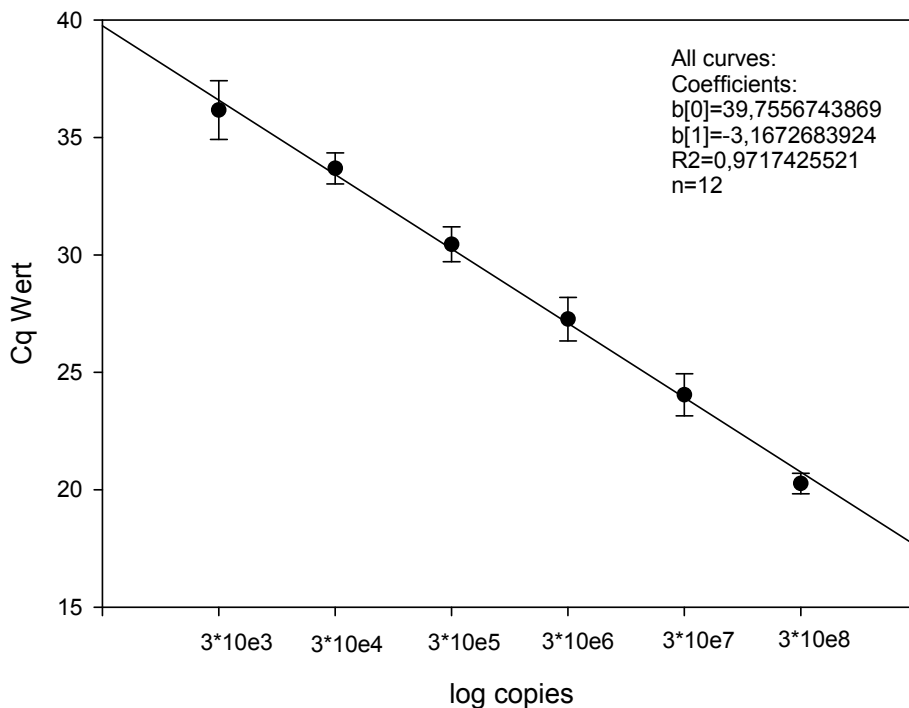


Abbildung 14 Vergleich von zwölf Verdünnungsreihen des Standards aus sechs qRT-PCR Läufen

Ausgewertet mit einem *Threshold* von 0,20. Auftrag der Cq Werte der einzelnen Verdünnungsstufen am Schnittpunkt mit dem *Threshold* gegen die eingesetzte Kopienzahl der jeweiligen Verdünnungsstufe (logarithmiert). R2 gibt die Abweichung der Punkte von der Regressionsgeraden an, die sich 1 annähern sollte. b[1] (entspricht dem *Slope*) gibt die Steigung der Regressionsgeraden an, die -3,32 nahe kommen sollte.



**Tabelle 10 Statistische Auswertung der DNA-Verdünnungsreihen**

Cq	3,00E+03	3,00E+04	3,00E+05	3,00E+06	3,00E+07	3,00E+08
mean	36,17	33,69	30,45	27,27	24,04	20,27
median	36,08	33,76	30,52	27,16	24,14	20,43
std.dev.	1,25	0,66	0,74	0,93	0,89	0,44
95% confidence	0,79	0,42	0,47	0,59	0,64	0,37
99%confidence	1,12	0,59	0,67	0,83	0,92	0,54

#### IV.1.3. Effektivität der Reversen Transkription

Bei der Reversen Transkription wird RNA, in diesem Fall die isolierte RNA des murinen Norovirus, durch ein Enzym, die Reverse Transkriptase, in DNA umgeschrieben, um anschließend in der PCR amplifiziert und quantitativ gemessen zu werden. Um die Effektivität der Reversen Transkription zu bestimmen, wurde zuerst aus dem zur Kalibrierung der PCR verwendeten DNA-Standard, unserem selbst generierten Plasmid, ein RNA-Standard per In-Vitro-Transkription hergestellt. Der RNA-Standard wurde in die RT-qPCR eingesetzt und mit der gleichen Kopienzahl des DNA-Standards verglichen.

#### In-Vitro-Transkription

Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym Xba I linearisiert. Das entstandene Produkt wurde mit dem *MinElute Reaction Cleanup Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und die Konzentration photospektrometrisch (SmartSpec™Plus, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemessen.

Zur In-Vitro-Transkription wurde das *Cold Assay* der SP6 RNA Polymerase Version Jan.2006 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Dazu wurde ein *Template* von 5,56µl, entsprechend 1µg DNA eingesetzt.

Anschließend wurde die RNA mit dem *MinElute Reaction Cleanup Kit* aufgereinigt und die Konzentration photospektrometrisch gemessen. Es wurden zwei Aliquots mit  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$ g/µl erstellt und eine größere Anzahl von Aliquots auf die Grundverdünnung von  $3 \cdot 10^8$  Kopien/5µl wie folgt eingestellt.

Das ungefähre Molekulargewicht von ssRNA in Dalton wird mit der Formel

$$MW_{ssRNA} \text{ (Da)} = (\text{nucleotides} \cdot 320,5) + 159 = (336 \cdot 320,5) + 159 = 107847 \text{ Da}$$

berechnet. Unsere cRNA hat eine Größe von 336 Basenpaaren. Daraus ergibt sich also ein Molekulargewicht von 107847 Dalton. Um das in Dalton angegebene Molekulargewicht in Gramm umzurechnen wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Masse eines Moleküls in Kilogramm} = \text{Molekulargewicht in Dalton} \cdot 1,6601 \cdot 10^{-27}$$

$$MW(\text{kg}) = 107847 \text{ Da} \cdot 1,6601 \cdot 10^{-27} = 1,8 \cdot 10^{-22} \text{ kg} = 1,8 \cdot 10^{-19} \text{ g}$$

Ein Molekül der cRNA hat also eine Masse von  $1,8 \cdot 10^{-19}$ g.

Um eine Kopienkonzentration (entspricht der Anzahl von Molekülen) von  $3 \cdot 10^8$  Kopien/5 $\mu$ l in der Stammlösung zu erhalten, wurde zuerst die Masse der gewünschten Anzahl von Kopien durch Multiplikation dieser mit der Masse eines Moleküls wie folgt berechnet.

$$3 \cdot 10^8 \cdot 1,8 \cdot 10^{-19} \text{g} = 5,4 \cdot 10^{-11} \text{g}$$

Da diese Masse in 5  $\mu$ l Lösung benötigt wird, musste pro 1 $\mu$ l Lösung 1/5 der Masse eingesetzt werden.

$$5,4 \cdot 10^{-11} \text{g} / 5 \mu\text{l} = 1,08 \cdot 10^{-11} \text{g} / \mu\text{l}$$

Im Photospektrometer wurde eine Konzentration des erstellten Grundstockes von 200 $\mu$ g/ml gemessen, dass entspricht  $2 \cdot 10^{-7}$ g/ $\mu$ l. Um durch eine logarithmische Verdünnung eine Stammlösung erstellen zu können, wurde der gemessene Grundstock folglich durch 1:0,54fache Verdünnung auf  $1,08 \cdot 10^{-7}$ g/ $\mu$ l eingestellt.

Durch 1:1000fache Verdünnung wurde der Grundstock auf  $3 \cdot 10^8$  Kopien eingestellt und davon mehrere Aliquots als Stammlösung bei -80°C eingefroren.

### Effizienz der Reversen Transkription

Zur Überprüfung der Effektivität der reversen Transkriptionsreaktion wurde auf eine 96 well Platte jeweils eine Verdünnungsreihe des RNA- und des DNA-Standards gleicher Kopienzahl im Doppelansatz, sowie einige unbekannte Proben aufgetragen, gemessen und verglichen. Da der Schritt der Reversen Transkriptase Reaktion nur den RNA-Standard betrifft, konnte durch den Vergleich der zwei Standards nach Durchlaufen von RT-Reaktion und Polymerasekettenreaktion festgestellt werden, ob es durch den ersten Reaktionsschritt, der reversen Transkription, zu einer Konzentrationsverschiebung und damit einer Erniedrigung der Sensitivität und der Effizienz der gesamten RT-qPCR Reaktion kommt.

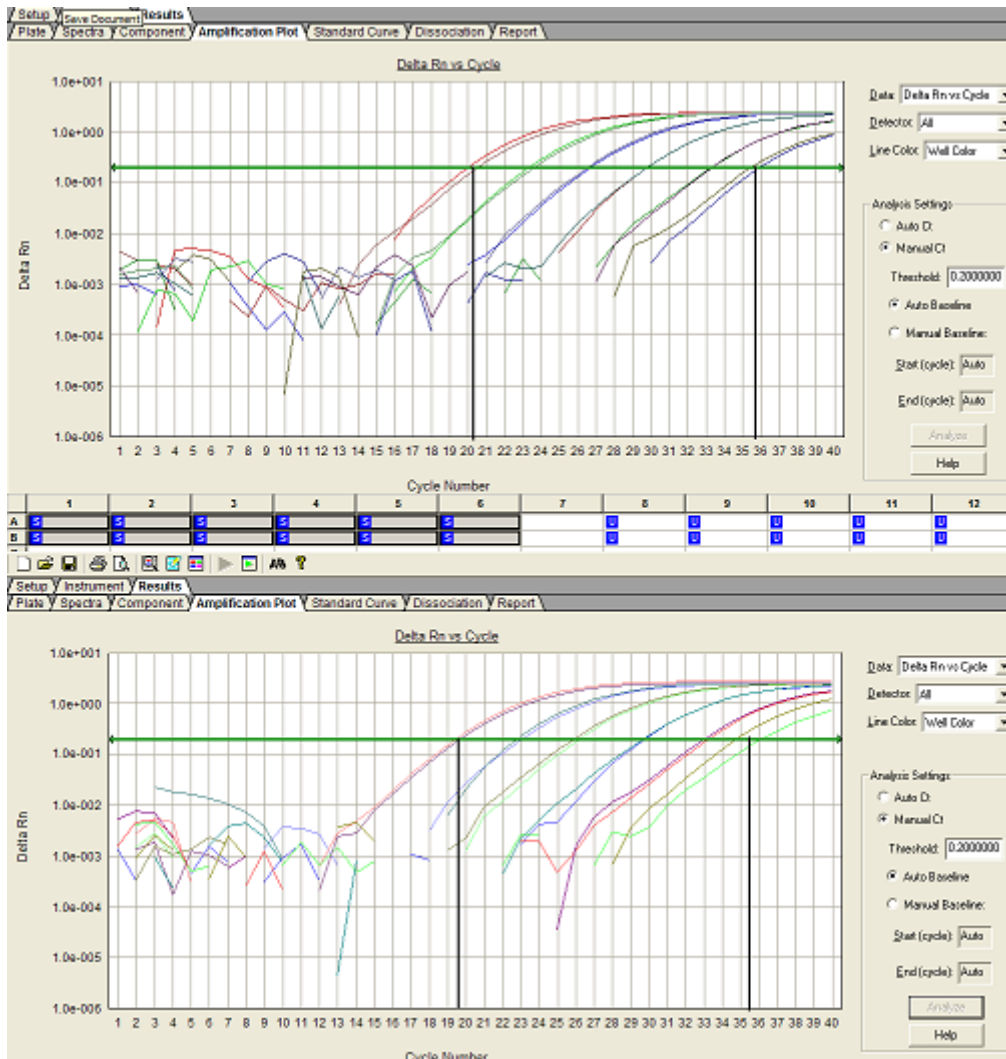
Durch das Auftragen auf die gleiche Platte wurde gewährleistet, dass beide Standards unter exakt gleichen Bedingungen untersucht wurden.

Bei gleich gesetztem *Threshold* wurde der Cq-Wert der jeweiligen Verdünnungsstufen (Abbildung 15) verglichen und gegen die logarithmisierte Kopienzahl aufgetragen (Abbildung 16).

Die Cq-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen von RNA und DNA-Standard lagen mit weniger als einem Zyklus Differenz nahe beieinander. Legte man die lineare Ansicht der beiden Standards aufeinander, war nur eine geringe Abweichung zu erkennen (Abbildung 16). Obwohl die Standardabweichung der jeweiligen Einzelwerte aus zwei Verdünnungsreihen jedes Standards (DNA und RNA) im niedrigeren Kopienbereich höher war, war die Abweichung der Geraden untereinander im höheren Kopienbereich größer als im niedrigen Bereich, jedoch immer kleiner einem Quantitationszyklus.

Die Effizienz der reversen Transkriptionsreaktion läge bei einem Verhältnis der Cq Werte jeder Verdünnungsstufe der DNA- zu denen der RNA-Standardkurve von 1 bei 100 Prozent.

In unserem Versuch lag das Verhältnis der Cq-Werte jeder einzelnen Verdünnungsstufe zwischen 0,997 und 0,963 (Tabelle 11). Somit konnte die Effizienz der Reversen Transkriptionsreaktion als sehr gut bewertet werden. Nahezu jedes RNA Molekül stand nach der reversen Transkription als DNA Molekül für die Amplifikation in der PCR zur Verfügung. Da die RNA-Standardkurve das von uns zu untersuchende *Target* besser abbildet, wurde für die folgenden Untersuchungen der RNA-Standard eingesetzt.



**Abbildung 15 Vergleich der Cq Werte der RNA- (oben) mit denen der DNA-Standardkurve (unten) (Ansicht 7500System v 1.2.2 Software)**

DNA vs RNA Standard

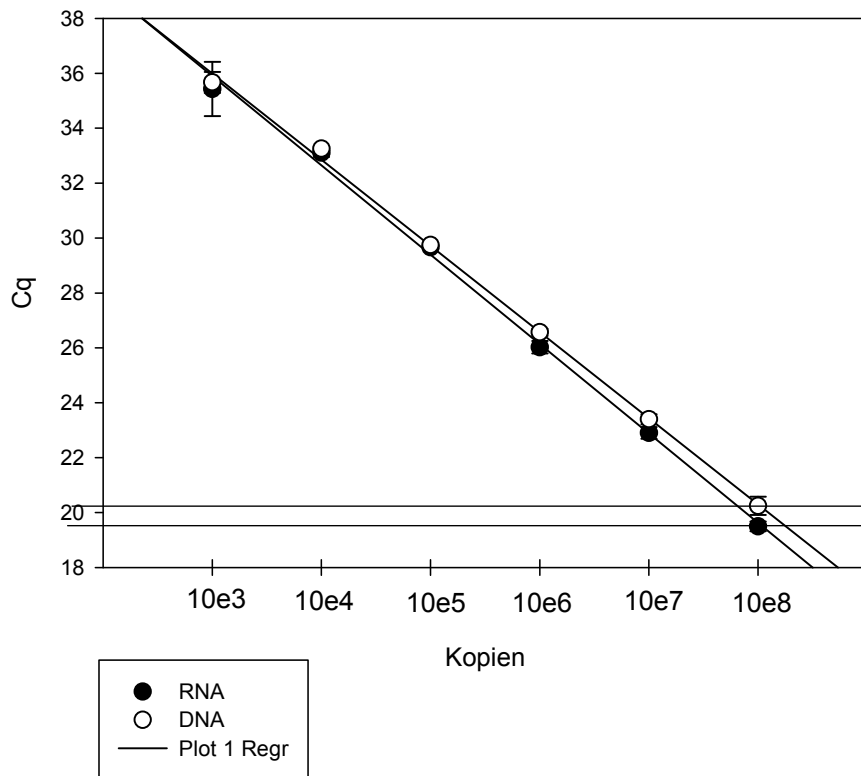


Abbildung 16 Vergleich der Cq Werte der RNA- mit denen der DNA-Standardkurve (lineare Ansicht)

Tabelle 11 Vergleich der Cq Werte der RNA- mit denen der DNA-Standardkurve und Berechnung des Verhältnisses der Standards

Quantitationszyklus		Kopien	Verhältnis DNA/RNA
DNA	RNA		
36,13	35,94	3000	0,993
34,73	35,40		
33,22	33,27	30000	0,996
33,00	33,24		
29,69	29,75	300000	0,997
29,63	29,74		
26,18	26,66	3000000	0,979
25,86	26,48		
23,05	23,53	30000000	0,979
22,75	23,27		
19,62	20,48	300000000	0,963
19,37	20,01		

#### IV.1.4. Einfluß von Kot auf die gemessene Kopienzahl

Eines der Ziele dieser Arbeit ist es, die Effizienz des Nachweises von Virus im Kot per RT-qPCR für das Hygienemonitoring zu überprüfen. Kot enthält jedoch sogenannte PCR-Inhibitoren und RNAsen aus Bakterien und anderen Kotbestandteilen, deren Einfluss auf die

Virus RNA, die reverse Transkription und die PCR nicht bekannt sind. Um den Einfluss von Kotbestandteilen auf die Effektivität der RT-qPCR zu bestimmen, wurde eine quantitative Messung der aus reinem Virus gewonnenen RNA mit RNA aus mit Kot versetztem Virus verglichen.

Dafür wurden eine Verdünnungsreihe von reinem Virusstock (MNV-Neuherberg, Passage 2) und eine Verdünnungsreihe von Virusstock mit Kot erstellt (Tabelle 12).

Pro Verdünnungsstufe wurden 9 Kotpellets aus einem MNV negativen Bereich der Tierhaltung zugegeben. Um ein gleichmäßiges Aufquellen zu gewährleisten, wurde dem Kot jeweils 250µl Flüssigkeit, bestehend aus MNV-Virusstock und Milli Q Wasser in unterschiedlichem Verhältnis, zugesetzt. Die Verdünnung wurde wie folgt angesetzt:

**Tabelle 12 Zusammensetzung der Verdünnungsreihe mit Kot**

Kotpellets (Stk)	MNV (µl)	H2O (µl)
9	250	0
9	50	200
9	25	225
9	10	240
9	5	245
9	2	248
9	0	250

Es wurde die gleiche Verdünnungsreihe ohne Zugabe der Kotpellets erstellt und genau gleich behandelt.

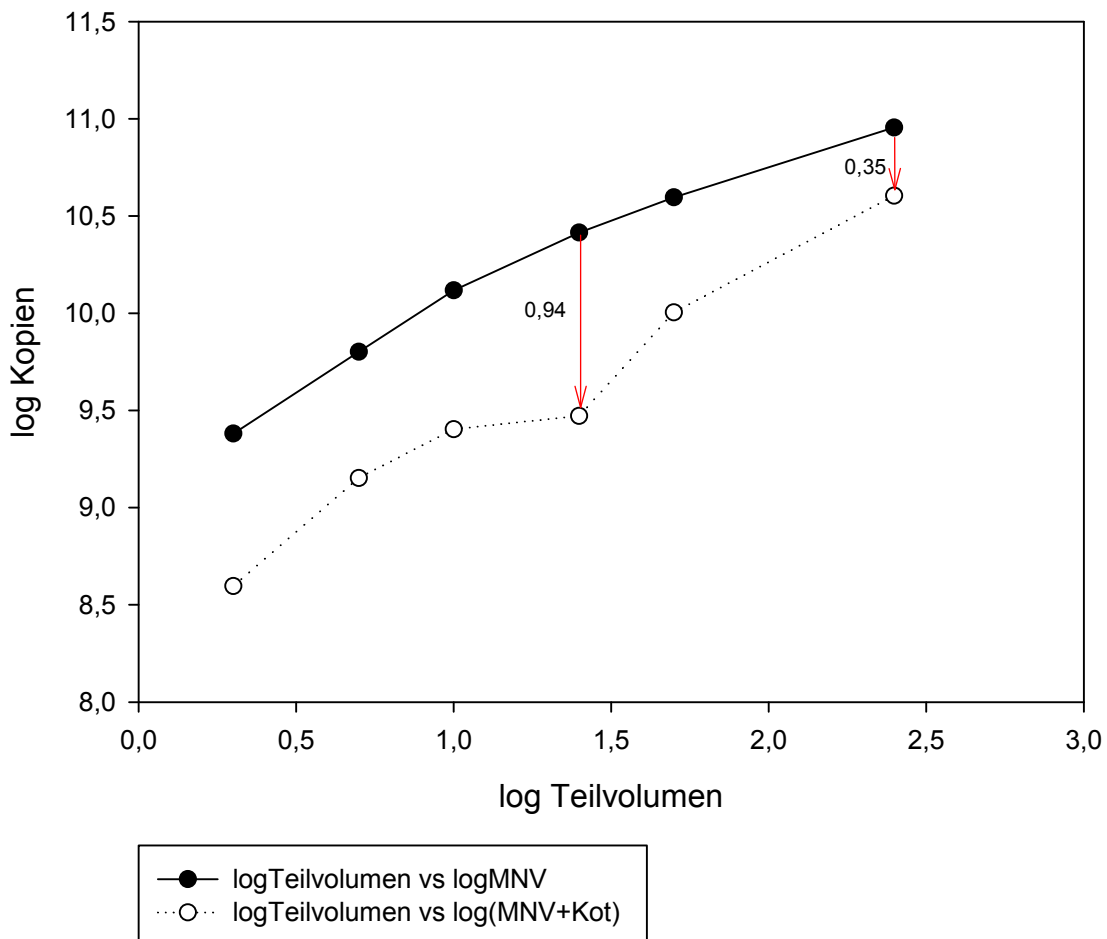
Nach 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 500µl Milli Q Wasser versetzt, geschüttelt (20min, 1400rpm), zentrifugiert (8min, 8000rpm) und aufgereinigt. Beide Verdünnungsreihen wurden auf derselben 96-well-Platte aufgetragen und in der RT-qPCR quantifiziert.

Mit zunehmender Kopienzahl stieg die Differenz der absoluten Anzahl gemessener Kopien zwischen den beiden Verdünnungsreihen. Der Hemmungsfaktor, der die Verringerung der Kopienzahl einer Viruskonzentrationsstufe nach Inkubation mit Kot beschreibt und mit der Formel  $MNV/(MNV+Kot)$  berechnet wurde, lag zwischen 2,24 und 8,78. Um den Hemmungsfaktor in Logarithmusstufen darzustellen (log Hemmungsfaktor), wurde die Formel  $\log(MNV)-\log(MNV+Kot)$  verwendet. Er bewegte sich bei allen Verdünnungsstufen zwischen 0,35 und 0,94 Logarithmusstufen, so dass man annehmen kann, dass durch den Einfluss von Kot die Verringerung der Kopienzahl einer Probe nicht mehr als eine log-Stufe beträgt (Tabelle 13, Abbildung 17).

**Tabelle 13 Berechnung des Hemmungsfaktors durch Einfluss von Kot auf MNV**

**Absolut gemessene Virus-Kopienzahl der einzelnen Verdünnungsstufen und Hemmungsfaktor zwischen den Verdünnungsreihen mit und ohne Kotpellets. Der Hemmungsfaktor sagt aus, um welchen Faktor die Kopienzahl durch den Zusatz von Kot verringert wurde. Der logarithmische Hemmungsfaktor sagt aus, um wie viele Logarithmusstufen die Kopienzahl durch den Zusatz von Kot verringert wurde.**

MNV (µl)	Kopien reines MNV	Kopien MNV+Kot	Hemmungsfaktor MNV/(MNV+Kot)	log Hemmungsfaktor log(MNV)-log(MNV+Kot)
250	9,02E+10	4,02E+10	2,24	0,35
50	3,94E+10	1,01E+10	3,90	0,59
25	2,60E+10	2,96E+09	8,78	0,94
10	1,31E+10	2,53E+09	5,18	0,71
5	6,33E+09	1,42E+09	4,46	0,65
2	2,40E+09	3,95E+08	6,08	0,78
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00	



**Abbildung 17 Darstellung der Verdünnungsstufen mit und ohne Kotpellets**

**Schwarze Linie: reine Virusaufreinigung, gepunktete Linie: Kot mit Virus versetzt. Rote Pfeile: log Hemmungsfaktor (Verringerung der Kopienzahl in Logarithmusstufen durch Zusatz von Kot)**

## **IV.2. Infektionsdynamik von Laborvirus**

Zu Beginn der Studien standen uns zwei Virusstämme, nämlich MNV-S99 aus Berlin und MNV-4 aus den USA zur Verfügung. Beide Virusstämme waren schon mehrfach in der Zellkultur passagiert worden, so dass es sich um Laborvirus handelte. Um diese zwei MNV-Stämme und später die Infektionsdynamik von Laborvirusstämmen zu testen, wurden folgende Versuche unternommen:

1. Es wurden Mäuse mit jeweils einem der Virusstämme oral oder intrauterin inokuliert und daraufhin Ausscheidung und Serokonversion ermittelt. Dieser Versuch diente zur Austestung des Virus und zur Entscheidungsfindung, welcher der MNV-Stämme in den darauf folgenden Versuchen verwendet werden sollte.
2. Da noch keine Erfahrungen und kaum Daten zur Infektionsdynamik von MNV-4 vorlagen, wurden Mäuse mit MNV-4 so inokuliert, dass eine Infektion zu erwarten war. Um die Infektionsdynamik nach einer künstlichen Infektion einschätzen zu können, wurde die Ausscheidung der Mäuse wöchentlich über einen längeren Zeitraum ermittelt.
3. Es wurden Kotpellets von dauerausscheidenden Mäusen untersucht, um die Dynamik der Ausscheidung über einen Zeitraum von Stunden bzw. Tagen zu ermitteln und eine Empfehlung für das Sammeln von Kotpellets im Rahmen des Hygienemonitoring zu erstellen.

### **IV.2.1. Direkte Inokulation von Mäusen mit den Laborvirusstämmen MNV-4 und MNV-S99**

Um die notwendige Infektionsdosis zur Erzeugung einer Ausscheidung des Virus mit dem Kot sowie einer Serokonversion zu ermitteln, wurden Mäuse mit verschiedenen Dosen von MNV-S99 und MNV-4 auf zwei Inokulationswegen inokuliert. Der orale Inokulationsweg wurde ausgewählt, da er die natürliche Route der Infektion darstellt und die intrauterine Inokulation simuliert den Weg des Embryos beim Embryotransfer.

Oral wurden jeweils zwei Mäuse pro Dosis inokuliert. Pro Virus wurden acht Verdünnungsstufen mit einer  $TCID_{50}/ml$  von  $10^8$  bis  $10^1$ , sowie eine Kontrolle mit DMEM erstellt und inokuliert. Das Inokulationsvolumen betrug  $100\mu l$  pro Maus. Für die intrauterine Inokulation wurde für MNV-S99 eine Verdünnungsreihe mit einer  $TCID_{50}/ml$  von  $10^8$  bis  $10^4$  erstellt und jeweils vier Mäuse inokuliert, sowie für MNV-4 acht Verdünnungsstufen mit einer  $TCID_{50}/ml$  von  $10^{11}$  bis  $10^4$  und jeweils drei Mäuse inokuliert. Es wurden  $0,5\mu l$  Virussuspension pro Uterushorn eingebracht, also  $1,0\mu l$  pro Maus. Es wurde einmal wöchentlich an Tag 7, 14, 21, 28 und 42p.i. Kot gesammelt und mit RT-qPCR auf

Virusausscheidung getestet sowie an den Tagen 14, 21, 28 und 42p.i. Blut entnommen und mit ELISA auf Serokonversion getestet.

**IV.2.1.1. Ausscheidung und Serokonversion nach oraler Inokulation mit MNV-S99  
(Tabelle 14)**

Nach oraler Inokulation mit MNV-S99 wurde bis Tag 14 eine Erhöhung der Zahl an ausscheidenden Mäusen nachgewiesen. Es schieden an Tag 14 jeweils eine Maus der Inokulationsgruppen  $10^1$  und  $10^2$  TCID<sub>50</sub> und alle Mäuse der darüberliegenden Inokulationsgruppen aus. Außerdem wurde ein starker Rückgang (d14 12/16, d21 5/16) der Ausscheidung verzeichnet, bis an Tag 42 nur noch eine Maus der höchsten Inokulationsgruppe Virus ausschied.

Eine Serokonversion wurde ab Tag 14 in der höchsten Dosisstufe von  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/Maus nachgewiesen. Dieser Status blieb bis Tag 42 bestehen, an Tag 28 wurde zusätzlich eine von zwei Mäusen der Dosisstufe  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/Maus positiv getestet, an Tag 42 eine von zwei Mäusen der Dosisstufe  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/Maus.

**Tabelle 14 Ausscheidung und Serokonversion nach oraler Inokulation mit verschiedenen Dosen von MNV-S99**

Orale Inokulation MNV-S99

Virusdosis/Maus (TCID <sub>50</sub> )		Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 42
10e7	Ausscheidung	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
10e6		1/2	2/2	2/2	1/2	0/2
10e5		1/2	2/2	1/2	0/2	0/2
10e4		0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
10e3		1/2	2/2	0/2	0/2	0/2
10e2		0/2	1/2	0/2	0/2	0/2
10e1		0/2	1/2	0/2	0/2	0/2
10e0		1/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DMEM		0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
10e7	Serologie	n.a.	2/2	2/2	2/2	2/2
10e6		n.a.	0/2	0/2	1/2	0/2
10e5		n.a.	0/2	0/2	0/2	0/2
10e4		n.a.	0/2	0/2	0/2	0/2
10e3		n.a.	0/2	0/2	0/2	1/2
10e2		n.a.	0/2	0/2	0/2	0/2
10e1		n.a.	0/2	0/2	0/2	0/2
10e0		n.a.	0/2	0/2	0/2	0/2
DMEM		n.a.	0/2	0/2	0/2	0/2



**IV.2.1.2. Ausscheidung und Serokonversion nach intrauteriner Inokulation mit MNV-S99 (Tabelle 15)**

Nach intrauteriner Inokulation mit MNV-S99 konnte keine Ausscheidung nachgewiesen werden. Eine Serokonversion wurde erst ab Tag 28 bei zwei von vier Mäusen der höchsten Dosisstufe festgestellt, an Tag 42 bei vier von acht Mäusen der zwei höchsten Dosisstufen ( $10^4$  und  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/Maus).

**Tabelle 15 Ausscheidung und Serokonversion nach intrauteriner Inokulation mit verschiedenen Dosen von MNV-S99**

Intrauterine Inokulation MNV-S99

Virusdosis/Maus (TCID <sub>50</sub> )		Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 42
10e7	Ausscheidung	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10e6		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10e5		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10e4		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10e3		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10e2		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10e1		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10e0		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
DMEM		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10e7	Serologie	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10e6		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10e5		n.a.	0/4	0/4	2/4	2/4
10e4		n.a.	0/4	0/4	0/4	2/4
10e3		n.a.	0/4	0/4	0/4	0/4
10e2		n.a.	0/4	0/4	0/4	0/4
10e1		n.a.	0/4	0/4	0/4	0/4
10e0		n.a.	0/4	0/4	0/4	0/4
DMEM		n.a.	0/4	0/4	0/4	0/4

#### IV.2.1.3. Ausscheidung und Serokonversion nach oraler Inokulation mit MNV-4 (Tabelle 16)

Nach oraler Inokulation von MNV-4 wurden an Tag 7 und Tag 14 Kotproben aus allen Dosisgruppen ab  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/Maus aufwärts positiv getestet. An Tag 42 wurde immer noch Ausscheidung ab  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/Maus nachgewiesen, sowie bei einer Maus, die mit  $10^1$  TCID<sub>50</sub> inokuliert worden war. Eine Serokonversion wurde ab Tag 14 ab  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/Maus festgestellt. Ab Tag 21 bis Tag 42 waren jeweils beide Mäuse der zwei höchsten Dosisgruppen und eine Maus der zwei nächstniedrigeren Dosisgruppen serokonvertiert.

**Tabelle 16 Ausscheidung und Serokonversion nach oraler Inokulation mit verschiedenen Dosen von MNV-4**

		Orale Inokulation MNV-4				
Virusdosis/Maus (TCID <sub>50</sub> )		Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 42
10e7	Ausscheidung	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2
10e6		2/2	2/2	2/2	2/2	1/2
10e5		1/2	2/2	1/2	2/2	2/2
10e4		2/2	2/2	1/2	2/2	2/2
10e3		2/2	2/2	0/2	2/2	0/2
10e2		1/2	1/2	0/2	0/2	0/2
10e1		0/2	0/2	0/2	0/2	1/2
10e0		0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
DMEM		0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
10e7		Serologie	n.a.	1/2	2/2	2/2
10e6	n.a.		2/2	2/2	2/2	2/2
10e5	n.a.		0/2	1/2	1/2	1/2
10e4	n.a.		1/2	1/2	1/2	1/2
10e3	n.a.		0/2	0/2	0/2	0/2
10e2	n.a.		0/2	0/2	0/2	0/2
10e1	n.a.		0/2	0/2	0/2	0/2
10e0	n.a.		0/2	0/2	0/2	0/2
DMEM	n.a.		0/2	0/2	0/2	0/2

#### IV.2.1.4. Ausscheidung und Serokonversion nach intrauteriner Inokulation von MNV-4 (Tabelle 17)

Nach intrauteriner Inokulation mit MNV-4 konnte an Tag 7 eine Ausscheidung schon ab einer Inokulationsdosis von  $10^1$  TCID<sub>50</sub>/Maus nachgewiesen werden. Im Verlauf der nächsten drei Untersuchungstermine war die niedrigste positiv getestete Kotprobe von einer Maus aus der Dosisgruppe  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/Maus, an Tag 42 wurden nur noch 2 Kotproben von Mäusen aus den Dosisgruppen  $10^2$  und  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/Maus positiv getestet.

Eine Serokonversion wurde an Tag 14 ab Dosisgruppe  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/Maus bei je einer Maus pro Inokulationsgruppe festgestellt. An den Tagen 21 und 28 war jeweils eine weitere Maus in der höchsten Inokulationsgruppe serokonvertiert. An Tag 42 wurde eine Serokonversion ab Dosisgruppe  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/Maus festgestellt.

**Tabelle 17 Ausscheidung und Serokonversion nach intrauteriner Inokulation mit verschiedenen Dosen von MNV-4**

Intrauterine Inokulation MNV-4

Virusdosis/Maus (TCID <sub>50</sub> )		Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 42
10e7	Ausscheidung	3/3	2/3	0/3	0/3	1/3
10e6		1/3	1/3	2/3	1/3	0/3
10e5		2/3	1/3	1/3	1/3	0/3
10e4		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10e3		1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10e2		0/3	0/3	0/3	0/3	1/3
10e1		1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
10e0		0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
DMEM		0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
10e7	Serologie	n.a.	1/3	2/3	2/3	2/3
10e6		n.a.	1/3	1/3	1/3	1/3
10e5		n.a.	1/3	1/3	1/3	1/3
10e4		n.a.	0/3	0/3	0/3	1/3
10e3		n.a.	0/3	0/3	0/3	0/3
10e2		n.a.	0/3	0/3	0/3	0/3
10e1		n.a.	0/3	0/3	0/3	0/3
10e0		n.a.	0/3	0/3	0/3	0/3
DMEM		n.a.	0/2	0/2	0/2	0/2

#### **IV.2.2. MNV-4 Langzeitausscheidung**

Da in den vorherigen Versuchen die Ausscheidungsdynamik nur bis Tag 42 beobachtet werden konnte und um den längerfristigen Verlauf des Ausscheidungsverhaltens nach einer Infektion mit Murinem Norovirus zu beobachten, wurden acht weibliche Auszuchtmäuse der Linie Crl:CD1(Icr)/Dcm im Alter von vier (n=4) und acht (n=4) Wochen dreimal im Abstand von je zwei Tagen oral mit  $10^{10}$  TCID<sub>50</sub> MNV-4 inokuliert. Die Virusausscheidung der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 40 Wochen beobachtet. Die Mäuse wurden über den ganzen Zeitraum einzeln in IVCs gehalten und sie wurden einmal wöchentlich auf frische autoklavierte Einstreu gesetzt. Für den Virusnachweis wurden in der ersten Woche täglich Kotpellets gesammelt, von Woche 2 bis 7, in Woche 21 und von Woche 26 bis 40 wöchentlich.

Alle Mäuse schieden ab dem ersten Tag der Probenentnahme Virus aus. Bis Woche 3 wurden Kopienzahlen zwischen  $4 \cdot 10^5$  und  $1 \cdot 10^9$  Viruskopien/Kotansatz gemessen. Von Woche 4 bis Woche 7 und in Woche 21 pendelte sich der Bereich der Ausscheidung innerhalb von zwei Logarithmusstufen von  $6 \cdot 10^4$  Kopien/Kotansatz bis  $6 \cdot 10^6$  Kopien/Kotansatz ein (Abbildung 18). Von Woche 26 bis Woche 35 waren alle Mäuse durchgehend Virusausscheider. Ab Woche 36 wurde die Ausscheidung intermittierend (Abbildung 19). Die Spannweite der Kopienzahl im Kot bewegte sich bei positiv getesteten Mäusen nach Woche 21 zwischen  $1 \cdot 10^4$  und  $1 \cdot 10^7$  Viruskopien/Kotansatz (Abbildung 18). Bei allen bis Woche 40 lebenden Mäusen war zu mindestens einem Messzeitpunkt kein Virus im Kot nachweisbar. Im Laufe der 40 Wochen starben drei Mäuse aus unbekanntem Gründen.

In Woche 3 und Woche 37 wurden die Mäuse auf Serokonversion geprüft. Zu beiden Zeitpunkten wurden alle Mäuse positiv getestet.

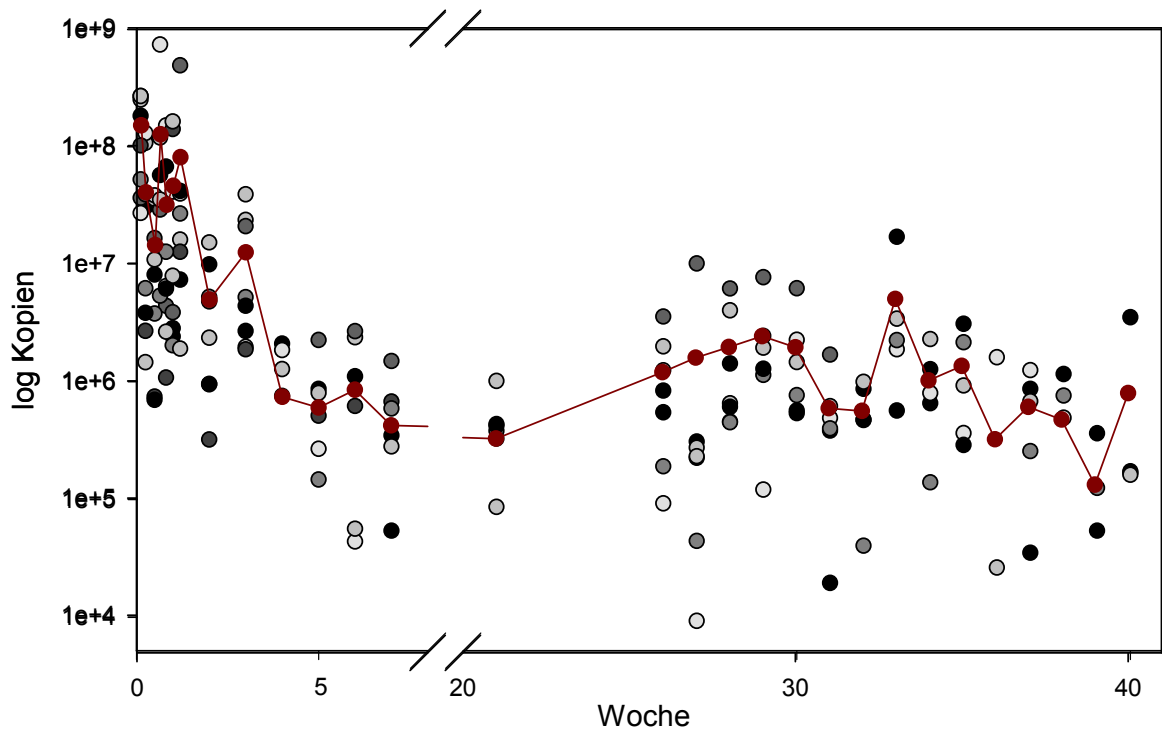


Abbildung 18 Menge der Virusauscheidung (log)

Darstellung der Viruskopien über einen Zeitraum von 40 Wochen (n=8). Die rote Linie stellt die Durchschnittliche Ausscheidung pro Tag dar. Jeder Punkt stellt die ausgeschiedenen Viruskopien einer Maus zu einem Zeitpunkt dar.

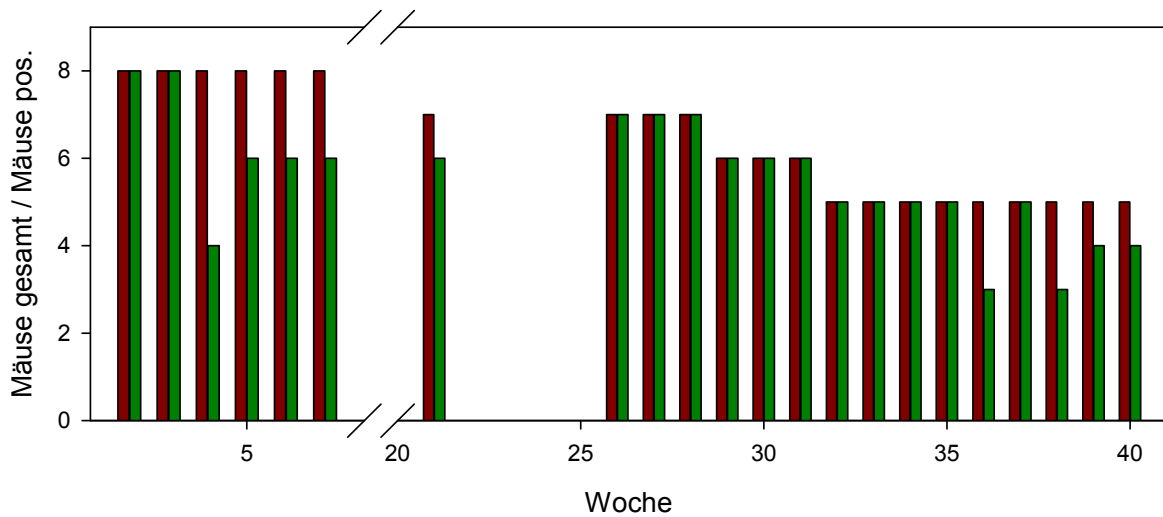


Abbildung 19 Gesamtzahl der Mäuse (rot) im Vergleich zu den Virus ausscheidenden Mäusen (grün) über einen Zeitraum von 40 Wochen

### IV.2.3. Variabilität der Virusausscheidung

Um herauszufinden, wie hoch die Variabilität der Ausscheidung von Virus zwischen verschiedenen Mäusen sowie innerhalb eines Zeitraumes ist und daraus eine Empfehlung für das Sammeln von Kotpellets im Rahmen des Hygienemonitorings zu entwickeln, wurde an drei Tagen innerhalb von 8 Stunden Kot von fünf Mäusen gesammelt. Diese Mäuse wurden aus vorherigen Versuchen ausgewählt. Alle hatten über einen Zeitraum von mindestens 15 Wochen kontinuierlich Virus ausgeschieden. Vier der Mäuse waren über MNV-4-haltige Einstreu mit MNV infiziert worden, eine Maus war drei Mal oral mit  $10^{10}$  TCID<sub>50</sub> MNV-4 inokuliert worden.

Es wurde die Variabilität der Ausscheidung innerhalb von 8 Stunden pro Tag untersucht. Die Mäuse wurden ab 8.00Uhr in mit Papiertüchern ausgelegte Käfige gesetzt. Stündlich, bis inklusive 16.00Uhr wurde jedes einzelne Kotpellet, das jede Einzelmaus abgesetzt hatte, gesammelt und gezählt. Aus jeweils ein bis drei Kotpellets, je nach Vorhanden sein, wurde die RNA für die RT-qPCR isoliert und damit die Pellets auf Existenz von Virus untersucht.

### Berechnung eines Sammelmodus für Kotproben

Durch das Sammeln von Kotproben von je fünf Mäusen an drei Tagen war für jeden Zeitpunkt ein Datensatz von 15 Einzeldaten vorhanden (Tabelle 18).

Zu jedem Zeitpunkt wurden zwischen 67% und 93% der Mäuse positiv auf MNV-Ausscheidung getestet (Abbildung 20). Im Mittel wurden 85% der Mäuse positiv getestet. Daraus folgt, dass nach Sammeln des in einer Stunde ausgeschiedenen Kotes von Dauerausscheidern mit 85%iger Wahrscheinlichkeit ein positives Tier als solches erkannt werden kann (Sensitivität = 85%), also werden im Mittel nach Sammeln des Kotes aus einer Stunde 15% der Dauerausscheider übersehen.

Auf Basis oben genannter Daten (Sensitivität 85%) wurde eine Empfehlung für die benötigte Dauer des Kotsammelns mit einer Wahrscheinlichkeit, das Virus zu übersehen, von unter 5%, erstellt.

Nach k Stunden ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Virus nicht entdeckt wird  $0,15^k$ . Möchte man eine Wahrscheinlichkeit, das Virus nicht zu entdecken von kleiner 5%, lautet die Gleichung

$$0,15^k < 0,05$$

Nach k aufgelöst, heißt die Gleichung

$$k > \log_{0,15} 0,05 = \log_{10} 0,05 / \log_{10} 0,15 = 1,57$$

Folglich wäre schon bei Sammeln des Kotes nach über 1,57 Stunden (1h, 34min) die Wahrscheinlichkeit, Ausscheider zu übersehen, kleiner 5%, oder die Wahrscheinlichkeit, alle Ausscheider zu erkennen, größer 95%.

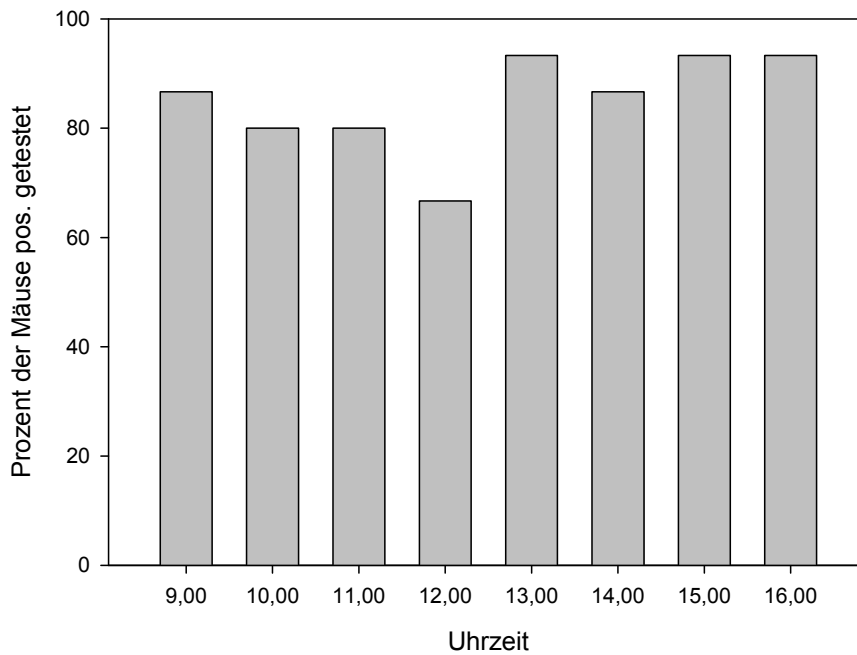
## Ergebnisse

Schon nach 2 Stunden sammeln liegt die Wahrscheinlichkeit, Ausscheider zu übersehen, nur noch bei 2,25% und die Wahrscheinlichkeit, alle Ausscheider zu erkennen, bei 97,75%.

**Tabelle 18 Untersuchung der Kotproben von fünf Mäusen an drei Tagen**

Maus Nummer		Uhrzeit							
		9.00	10.00	11.00	12.00	13.00	14.00	15.00	16.00
Tag 1	1	+	-	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	-	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	-	+	+	+	+
	5	+	+	+	-	+	+	+	+
Tag 2	1	+	+	-	+	+	-	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	-	+	+	-	+
	5	+	+	+	+	+	-	+	+
Tag 3	1	+	-	+	-	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	-	-	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+
Anzahl positiv getesteter Mäuse		13	12	12	10	14	13	14	14

**Ausscheider pro Stunde in Prozent**

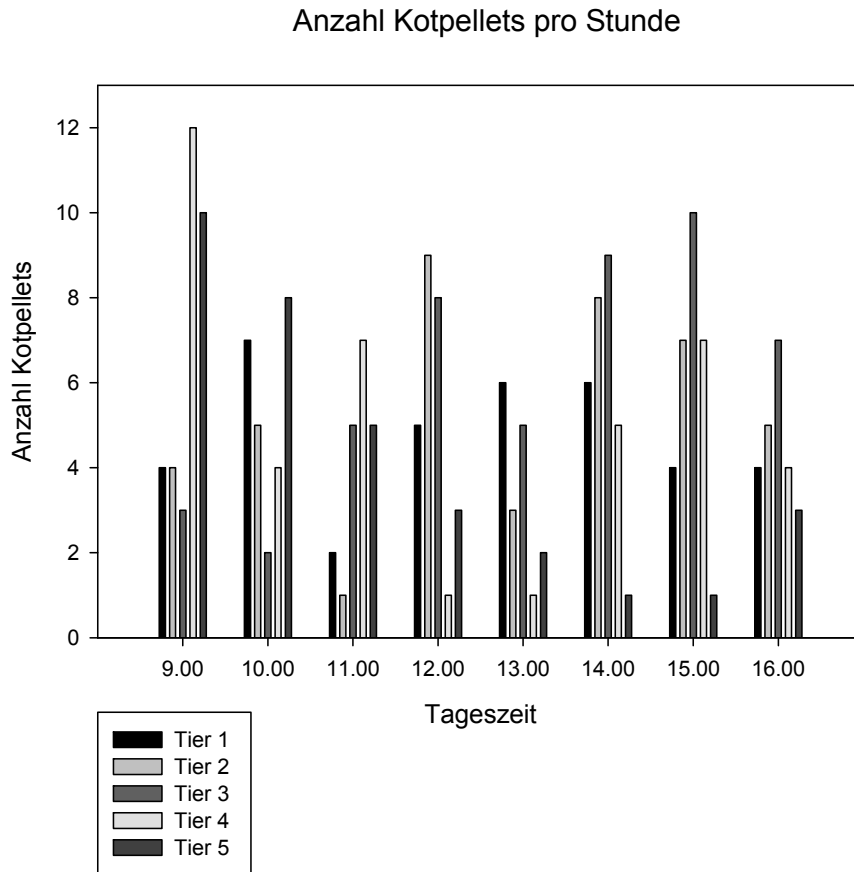


**Abbildung 20 Anteil der Mäuse, die innerhalb einer Stunde positiv auf Virusausscheidung getestet wurden.**

**100% entspricht 15 Mäusen (5 Mäuse\*3 Tage)**

**Stündlich ausgeschiedene Anzahl an Kotpellets innerhalb eines Tages** (Abbildung 21)

Eine einzelne Maus setzte im Laufe einer Stunde zwischen einem und 12 Kotpellets ab. Die größte Spanne an ausgeschiedenen Pellets innerhalb einer Stunde war um 9.00Uhr zu erkennen: Maus 3 setzte drei Pellets, Maus 4 jedoch zwölf Pellets ab. Die größte Spanne an ausgeschiedenen Pellets zwischen zwei Zeitpunkten bei einer Maus zeigte Maus 4 mit zwölf Pellets um 9.00Uhr, jedoch nur einem Pellet um 12.00Uhr.



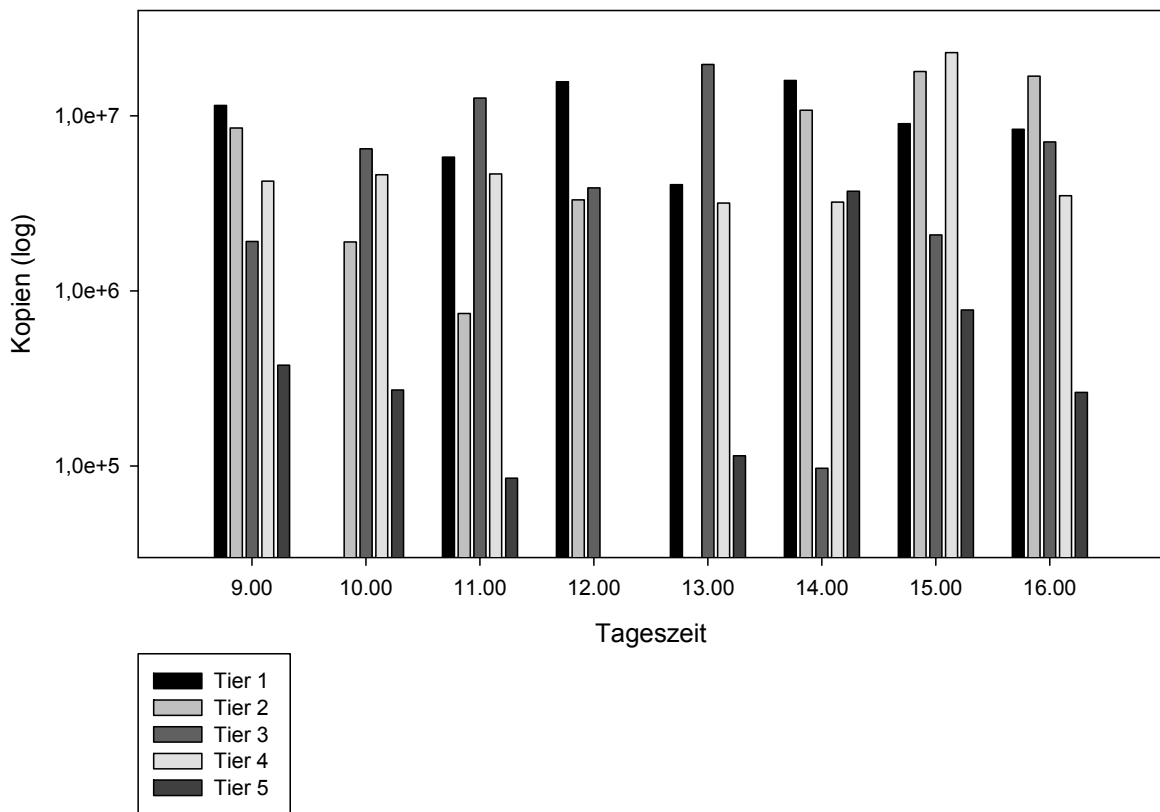
**Abbildung 21** Anzahl der von jedem Einzeltier ausgeschiedenen Kotpellets innerhalb einer Stunde am Beispiel eines Tages



**Ausgeschiedene Kopienzahl pro Maus während einer Stunde (Abbildung 22)**

Es war eine hohe Spanne an ausgeschiedenen Kopien bei der Einzelmaus pro Stunde zu erkennen, die bei Maus 4 zwischen 0 Kopien (12.00Uhr) und  $2 \cdot 10^7$  Kopien/Kotansatz (15.00Uhr) lag. Ähnlich verhielt es sich bei Betrachtung der ausgeschiedenen Kopien zwischen den einzelnen Mäusen zu einem Zeitpunkt. Um 15.00Uhr war die höchste Spanne an ausgeschiedenen Kopien pro Kotansatz/Maus zu erkennen, nämlich zwischen  $7 \cdot 10^5$  Kopien/Kotansatz (Maus 5) und  $2 \cdot 10^7$  Kopien/Kotansatz (Maus 4).

Variation in der Virusausscheidung während eines Tages



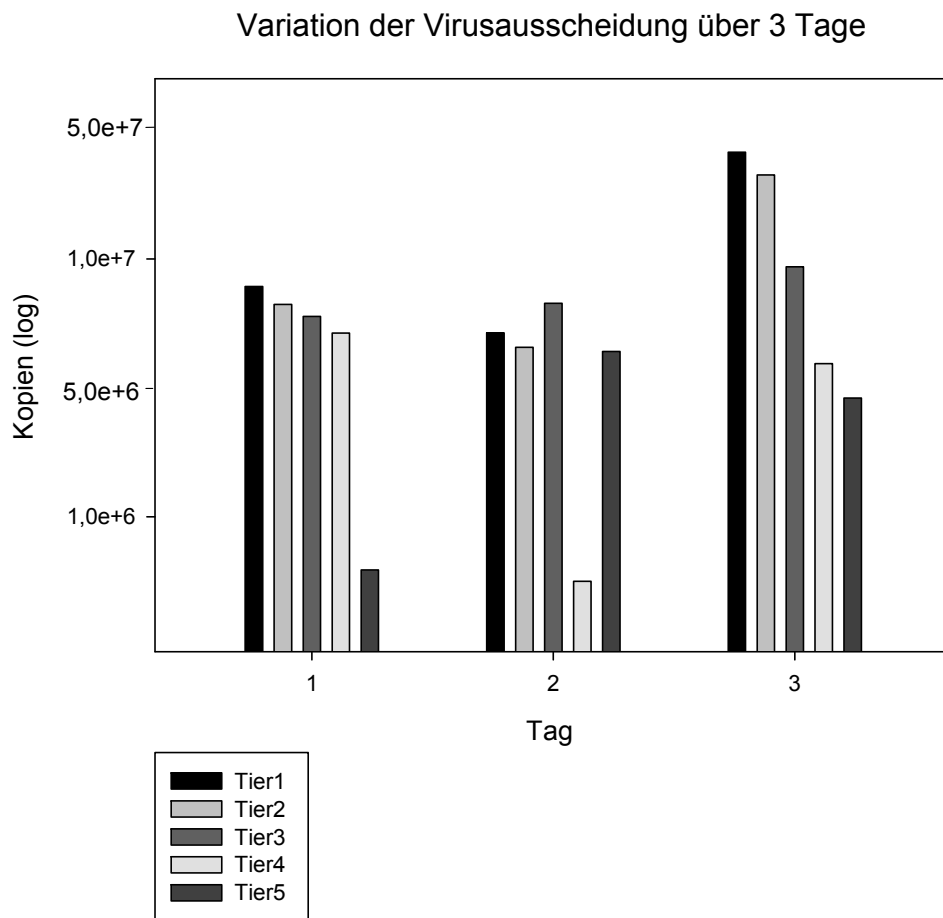
**Abbildung 22 Anzahl der in der RT-qPCR gemessenen Kopienzahl/Kotansatz innerhalb einer Stunde am Beispiel eines Tages**

**Betrachtung der Ausscheidungsdaten über den Zeitraum von drei Tagen**

(Abbildung 23)

Innerhalb der drei untersuchten Tage lag die durchschnittlich gemessene Kopienzahl pro Maus und Stunde zwischen  $6 \cdot 10^5$  und  $2,6 \cdot 10^7$  Kopien/Kotansatz.

Maus 5 zeigte an Tag 1 mit durchschnittlich  $6 \cdot 10^5$  Kopien/Kotansatz/Stunde die niedrigste Ausscheidung. An Tag 3 zeigte Maus 1 mit durchschnittlich  $2,6 \cdot 10^7$  Kopien/Kotansatz/Stunde die höchste Ausscheidung.



**Abbildung 23** Anzahl der Kopien/Kotansatz, die von einem Tier an einem Tag zwischen 8.00 Uhr und 16.00 Uhr durchschnittlich pro Stunde ausgeschieden wurden.

### **IV.3. Überprüfung der Übertragung von Laborvirus über gebrauchte Einstreu, Ausscheidungsverhalten und Serokonversion von Sentinels**

Um die Übertragung von MNV auf Sentinels zu untersuchen, wurde eine standardisierte Sentinelkolonie gezielt mit MNV enthaltender Einstreu inokuliert. Die Sentinels wurden einzeln in IVCs gehalten und wöchentlich mit virushaltiger Einstreu versorgt. Wir verwendeten dafür MNV-4, dessen Infektionsdynamik in vorherigen Versuchen untersucht worden war.

Im ersten Teil des Experiments wurden vier Versuchsgruppen, bestehend aus einem Inzucht- (C57BL/6) und einem Auszuchtstamm (CrI:CD1(Icr)/Dcm), sowie männlichen und weiblichen Mäusen, gebildet, um eventuell vorhandene stamm- oder geschlechterspezifische Unterschiede in der Virusempfänglichkeit und -ausscheidung aufzuzeigen. Außerdem sollte das optimale Zeitfenster für den serologischen sowie den direkten Nachweis über die Kot-PCR gefunden werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse stellten wir uns im zweiten Teil des Experiments die Frage nach dem Einfluss der Käfig-Besatzdichte auf Infektion, Serokonversion und Virusausscheidung.

#### **IV.3.1. Infektion von Mäusen zur Produktion kontaminierter Einstreu**

Weibliche Auszuchtmäuse der Linie CrI:CD1(Icr)/Dcm wurden als Virusproduzenten für die mit murinem Norovirus kontaminierte Einstreu verwendet. Die Mäuse wurden einzeln oder in Gruppen von drei oder vier Tieren pro Käfig gehalten.

In jeden Käfig wurde zur Infektion der Virusproduzenten MNV-4 kontaminierte Einstreu gegeben. Die kontaminierte Einstreu stammte von Mäusen, die dreimal oral mit einer Dosis von  $10^{10}$  TCID<sub>50</sub> pro Maus inokuliert worden waren.

Die Virusproduzenten wurden wöchentlich auf Virusausscheidung getestet. Sobald eine Ausscheidung über einen Zeitraum von zwei Wochen nachgewiesen werden konnte, wurden die Mäuse auf sauberer, steriler Einstreu gehalten. So sollte bei den Virusproduzenten eine natürliche Infektion simuliert werden.

Um von jeder Maus individuell Kotpellets sammeln und sofort per RT-PCR auf MNV-4 testen zu können, wurden die Mäuse wöchentlich einmal über Nacht einzeln in saubere autoklavierte Käfige gesetzt. Die schmutzigen Käfige wurden aufgehoben bis die Untersuchungen durchgeführt worden waren und nur die Einstreu aus MNV-positiven Käfigen wurde für die Experimente genutzt.

MNV-freie schmutzige Einstreu für die Kontrollgruppen wurde von oben erwähnten Zuchttieren aus dem Zucht-Barrierebereich gewonnen.

### IV.3.2. Titration der zur Infektion von Einstreu-Sentinels nötigen Menge kontaminierter Einstreu

Zur Bestimmung der zur Infektion von Sentinels notwendigen Menge an virushaltiger Einstreu wurde ein Vorversuch mit unterschiedlichen Volumina kontaminierter Einstreu unternommen. Sechs Mäuse (weibliche Auszuchtmäuse der Linie Crl:CD1(lcr)/Dcm) wurden einmal wöchentlich mit unterschiedlichen Volumina der kontaminierten Einstreu in Kontakt gebracht. Es wurden 20cm<sup>3</sup>, 50cm<sup>3</sup> oder 100cm<sup>3</sup> kontaminierter Einstreu mit schmutziger nicht kontaminierter Einstreu auf 1000cm<sup>3</sup> aufgefüllt und pro Volumengruppe je zwei Mäuse damit in Kontakt gebracht. Einmal wöchentlich wurden die Mäuse auf sterile saubere Einstreu gesetzt, am nächsten Tag wurde Kot gesammelt und sie wurden unmittelbar auf neue kontaminierte Einstreu gesetzt. Der Kot wurde anschließend mit der RT-PCR auf Viruspartikel untersucht.

Wie in Tabelle 19 dargestellt, konnte nach Beschickung der Käfige mit 20cm<sup>3</sup> kontaminierter Einstreu keine Ausscheidung im Kot nachgewiesen werden. Nach Beschickung der Käfige mit 50cm<sup>3</sup> kontaminierter Einstreu schied eine von zwei Mäusen beim ersten Untersuchungstermin Virus aus. Es konnte zu keinem späteren Zeitpunkt Virusausscheidung nachgewiesen werden. Eine Maus aus der 100cm<sup>3</sup> Gruppe wurde über den Zeitraum von 14 Wochen (Ausnahme Woche 9) in der RT-PCR positiv getestet. Der Kot der zweiten Maus aus der 100cm<sup>3</sup> Gruppe zeigte nur in der ersten Woche ein positives Ergebnis. Als Konsequenz des Vorversuchs mit einer Erfolgsrate von 50% nach Kontakt mit 100cm<sup>3</sup> kontaminierter Einstreu wurde entschieden, die Sentinels im weiteren Versuch wöchentlich mit 100cm<sup>3</sup> kontaminierter schmutziger Einstreu in Kontakt zu bringen.

**Tabelle 19 Titration der zur Infektion von Einstreu-Sentinels nötigen Menge kontaminierter Einstreu**

#### Ausscheidung von Murinem Norovirus nach Kontakt mit unterschiedlichen Volumina kontaminierter Einstreu

Menge kontaminierter Einstreu	Woche												
	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	
20ccm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50ccm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100ccm	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

### IV.3.3. Inokulationsversuch Sentinelmonitoring Teil 1

Vier Wochen alte weibliche und männliche Auszuchtmäuse der Linie CrI:CD1(lcr)/Dcm sowie vier Wochen alte weibliche und männliche Inzuchtmäuse der Linie C57BL/6 (Charles River Deutschland, Sulzfeld) wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen einzeln in individuell belüfteten Käfigen gehalten. Die Versuchsgruppen der Studie wurden wie in Tabelle 20 dargestellt, aufgeteilt.

**Tabelle 20 Darstellung der Versuchsgruppen zum Inokulationsversuch Sentinelmonitoring Teil1**

Versuchstiere			Kontrolltiere		
Anzahl	Mauslinie	Geschlecht	Anzahl	Mauslinie	Geschlecht
20	CrI:CD1(lcr)/Dcm	♀	5	CrI:CD1(lcr)/Dcm	♀
20	CrI:CD1(lcr)/Dcm	♂	5	CrI:CD1(lcr)/Dcm	♂
20	C57BL/6	♀	5	C57BL/6	♀
20	C57BL/6	♂	5	C57BL/6	♂

Jede Maus wurde wöchentlich auf 100cm<sup>3</sup> der MNV kontaminierten Einstreu oben genannter Einstreuspendertiere gesetzt. Diese wurde mit 900cm<sup>3</sup> schmutziger, nicht kontaminierter Einstreu aus dem Barrierebereich gemischt, um das Standardprotokoll unseres Sentinelmonitoringprogrammes zu simulieren, bei dem die Sentinels jede Woche ca. 1000cm<sup>3</sup> schmutzige Einstreu aus einem bestimmten Bereich des Tierraumes erhalten. Einmal wöchentlich wurde jede Maus über Nacht auf frische autoklavierte Einstreu gesetzt, um am nächsten Morgen Kotpellets sammeln zu können. Die Mäuse wurden anschließend auf neue mit MNV kontaminierte Einstreu gesetzt.

Die Kontrollmäuse wurden genauso behandelt und auf 1000cm<sup>3</sup> MNV-freie schmutzige Einstreu gesetzt.

Von Woche 2 bis Woche 5 wurde wöchentlich von jeder Maus Blut genommen, bis zum Ende der 12-wöchigen Studie jede zweite Woche.

Der wöchentlich gesammelte Kot wurde bis zu drei Tagen bei 4°C aufbewahrt und im Laufe der Woche durch RT-PCR auf MNV getestet.

Das Blut wurde zentrifugiert und das Serum bis zum baldigen Versand bei 4°C aufbewahrt.

### Virusausscheidung und serologische Ergebnisse Teil 1

Von 80 mit MNV-4 über die Einstreu in Kontakt gekommenen Mäusen aus allen Versuchsgruppen konnte nach vier Wochen bei einer männlichen CD-1 Maus Virusausscheidung in der PCR nachgewiesen werden. Nach vier Wochen wurden 5 Mäuse aus jeder Gruppe getötet, um Organe zu entnehmen. In Woche 5 und 6 zeigte eine Maus

aus der Gruppe der C57BL/6 Männchen Virusausscheidung. Da bis Woche 6 mit nur zwei Mäusen eine unerwartet niedrige Zahl an Mäusen Virusausscheidung zeigte, wurde die Probennahme ausgesetzt und erst in Woche 12 erneut getestet. Zu diesem Zeitpunkt schied keine weitere Maus Virus aus (Tabelle 21).

**Tabelle 21 Ausscheidung von murinem Norovirus nach Kontakt mit MNV-4 infizierter Einstreu**

	Stamm	Geschlecht	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W12
Sentinels	C57BL/6	♂	0/20	0/20	0/20	0/20	1/15	1/15	0/10
	C57BL/6	♀	0/20	0/20	0/20	0/20	0/15	0/15	0/10
	CD-1	♂	0/20	0/20	0/20	1/20	0/15	0/15	0/10
	CD-1	♀	0/20	0/20	0/20	0/20	0/15	0/15	0/10
Kontrollen	C57BL/6	♂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	C57BL/6	♀	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	CD-1	♂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	CD-1	♀	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Einstreu		1	2	3	4	5	6	12

Zwei weibliche CD-1 Mäuse zeigten in Woche 1, zwei männliche CD-1 Mäuse zeigten in Woche 1 und 2 Serokonversion. Die OD-Werte lagen in allen Fällen um den Schwellenwert von 0,3. Da bereits die negativen Ausscheidungsdaten vorlagen, wurde beschlossen, die Untersuchung der bereits gewonnenen Serumproben auszusetzen und erst in Woche 6 erneut zu testen. In Woche 6 war bei einem der beiden männlichen CD-1 Mäuse eine Serokonversion nachzuweisen. Auch diese lag nahe dem Schwellenwert. In Woche 12 wurde unter den verbleibenden Sentinels keine Maus positiv getestet (Tabelle 22). Die serologisch positiv getesteten Mäuse zeigten keine Virusausscheidung.

**Tabelle 22 Serokonversion von Sentinels nach Kontakt mit MNV-4 infizierter Einstreu**

	Stamm	Geschlecht	W1	W2	W3	W4	W6	W12
Sentinels	C57BL/6	♂	na/20	na/20	na/20	na/20	0/15	0/10
	C57BL/6	♀	0/20	na/20	na/20	na/20	0/15	0/10
	CD-1	♂	2/20	0/20	na/20	na/20	0/15	0/10
	CD-1	♀	2/20	2/20	na/20	na/20	1/15	0/10
Kontrollen	C57BL/6	♂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	C57BL/6	♀	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	CD-1	♂	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	CD-1	♀	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Einstreu		1	2	3	4	6	12

#### IV.3.4. Inokulationsversuch Sentinelmonitoring Teil 2

Da durch den Kontakt mit MNV-4 unerwartet wenige einzeln sitzende Tiere auf das Virus reagierten, wurden, um auszuschließen, dass dieser Verlauf in Zusammenhang mit der Besatzdichte stand, drei Haltungsarten verglichen: Die Einzel-, die Paar-, und die Gruppenhaltung:

Vier bis fünf Wochen alte weibliche Auszuchtmäuse der Linie Crl:CD1(Icr)/Dcm wurden einzeln (n=10), in Paaren (n=5) oder in Vierergruppen (n=5) in IVCs gehalten (Tabelle 23).

**Tabelle 23 Darstellung der Versuchsgruppen zum Inokulationsversuch Sentinelmonitoring Teil2**

Versuchstiere			Kontrolltiere		
Anzahl	Mauslinie	Gruppendichte	Anzahl	Mauslinie	Gruppendichte
10	Crl:CD1(Icr)/Dcm	Einzel	4	Crl:CD1(Icr)/Dcm	Einzel
10	Crl:CD1(Icr)/Dcm	Paare	4	Crl:CD1(Icr)/Dcm	Paare
20	Crl:CD1(Icr)/Dcm	Vierergruppe	4	Crl:CD1(Icr)/Dcm	Vierergruppe

Die Mäuse wurden einmal pro Woche separiert und einzeln in saubere autoklavierte Käfige gesetzt. Es wurde von jeder einzelnen Maus Kotpellets gesammelt, anschließend wurden sie mit ihrer ursprünglichen Gruppe in einen Käfig, bestückt mit 900cm<sup>3</sup> MNV-freier Einstreu vermisch mit 100cm<sup>3</sup> MNV-kontaminierter schmutziger Einstreu, gesetzt. In 100cm<sup>3</sup> MNV-kontaminierter schmutziger Einstreu befanden sich ungefähr 150 Kotpellets.

Die Kontrollmäuse wurden genau gleich behandelt und auf 1000cm<sup>3</sup> MNV-freie schmutzige Einstreu gesetzt.

Von Woche 2 bis Woche 5 wurde wöchentlich, bis zum Ende der 12-wöchigen Studie jede zweite Woche von jeder Maus Blut genommen.

Der wöchentlich gesammelte Kot wurde bis zu drei Tage bei 4°C aufbewahrt und im Laufe der Woche durch RT-PCR auf MNV getestet.

Das Blut wurde zentrifugiert und das Serum bis zum Versand bei 4°C aufbewahrt.

## Virusausscheidung und serologische Ergebnisse Teil 2

In der ersten Woche nach Kontakt mit MNV-infizierter Einstreu wurde bei zwei Mäusen, einer einzeln gehaltenen und einer in der Gruppe gehaltenen Maus, Virusausscheidung nachgewiesen. Die einzeln gehaltene Maus schied bis Ende des Untersuchungszeitraumes durchgehend Virus aus. Aus der Versuchsgruppe der „Gruppenhaltung“ wurde in einer Vierergruppe kontinuierlich Virusausscheidung nachgewiesen, jedoch wurde nicht zu jedem Untersuchungszeitpunkt im Kot jeder einzelnen Maus dieser Gruppe Virus gefunden (Tabelle 24).

**Tabelle 24 Ausscheidung von murinem Norovirus nach Kontakt mit MNV-4 infizierter Einstreu**

Besatzdichte	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12
Einzelhaltung	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
Paarhaltung	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Gruppenhaltung	1/20	0/20	0/20	4/20	3/20	2/20	3/20	2/20	2/20	2/20	2/20	3/20
Kontrollen	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

## Ergebnisse

---

Die Virus ausscheidende Maus aus Einzelhaltung war von Woche 2 bis Woche 13 durchgehend serologisch positiv. Die Mäuse der ausscheidungspositiven Vierergruppe wurden alle von Woche 5 bis Woche 13 durchgehend serologisch positiv getestet (Tabelle 25).

**Tabelle 25 Serokonversion von Sentinels nach Kontakt mit MNV-4 infizierter Einstreu**

Besatzdichte	W2	W3	W4	W5	W7	W9	W11	W13
Einzelhaltung	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
Paarhaltung	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Gruppenhaltung	0/20	0/20	0/20	4/20	4/20	4/20	4/20	4/20
Kontrollen	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	2	3	4	5	7	9	11	13



#### **IV.4. Feldversuch Sentinelscreening**

Die Übertragung von MNV-4 auf in IVCs sitzende Sentinels erwies sich als sehr schwierig. Um trotzdem Daten zur Virusvermehrung in der Maus und zur Übertragung zwischen Mäusen zu ermitteln, wurde die Übertragung von MNV aus einem positiven Mäusebestand auf die dort eingesetzten Sentinels im Feldversuch untersucht. Es wurde überprüft, ob sowohl der serologische als auch der direkte Nachweis von Virus im Kot des Sentinels durch die *Real Time PCR* ein geeignetes Verfahren für den Nachweis von MNV in einer Maushaltung sind.

Die Versuche wurden mit zwölf einzeln sitzenden männlichen Sentinels (Crl:CD1(Icr)/Dcm) aus dem laufenden Betrieb, die sich wie auch die restlichen Mäuse der Maushaltung in offenen Käfigen befanden, durchgeführt.

##### **IV.4.1. Monitoring-Protokoll**

Vier Tage vor Gabe der ersten schmutzigen Einstreu wurden je zwei Sentinels in die jeweiligen Räume des Tierbereiches eingesetzt. In jedem Raum befanden sich je acht Racks mit Versuchsmäusen. Beide Sentinels eines Raumes bekamen jede Woche die schmutzige Einstreu von zwei Racks, so dass sich drei vierwöchige Zyklen ergaben. Ein Rack bestand aus fünf Reihen mit je sieben Käfigen, also aus 35 Käfigen. Aus jedem Käfig, in dem Einzelmäuse oder Gruppen bis zu vier Tieren saßen, wurden Aliquots schmutziger Einstreu in zwei frische Käfige gegeben und die Sentinels eine Woche auf dieser Einstreu gehalten. Nach 13 Wochen, die Sentinels hatten 12 Wochen lang schmutzige Einstreu bekommen, wurden die Sentinels zur Untersuchung getötet. In der 13. Woche bekamen die Sentinels keine schmutzige Einstreu mehr.

Von einem zertifizierten Untersuchungslabor wurden Blut und Organe für die parasitologische, bakteriologische und serologische Untersuchung gewonnen.

##### **IV.4.2. Probennahme**

Im Verlauf der Studie wurde wöchentlich Einzeltier-Kot der Sentinels gesammelt. Um sicher zu stellen, dass der gesammelte Kot von dem entsprechenden Sentinel stammte und nicht aus der schmutzigen Einstreu der zu untersuchenden Versuchsmäuse, wurde jeder Sentinel über Nacht auf frische Einstreu gesetzt und der darin befindliche Kot gesammelt. Am nächsten Morgen wurden die Sentinels wieder auf die ihnen ursprünglich zugeteilte gebrauchte Einstreu gesetzt. Die Kotpellets wurden mit der RT-qPCR auf Viruskopien getestet.

Zusätzlich zur Routineuntersuchung des Untersuchungslabors wurde am Tag der Sektion Kot und Blut entnommen. Außerdem wurden ein mesenterialer Lymphknoten, die Nebenhoden und ein ca. 2\*2\*2mm<sup>3</sup> großes Stück des Caecum entnommen.

In den Wochen 2, 3, 8 und 13 wurde Blut aus der lateralen Schwanzvene entnommen und im Immunfluoreszenzassay auf Antikörper gegen MNV getestet (Abbildung 24).

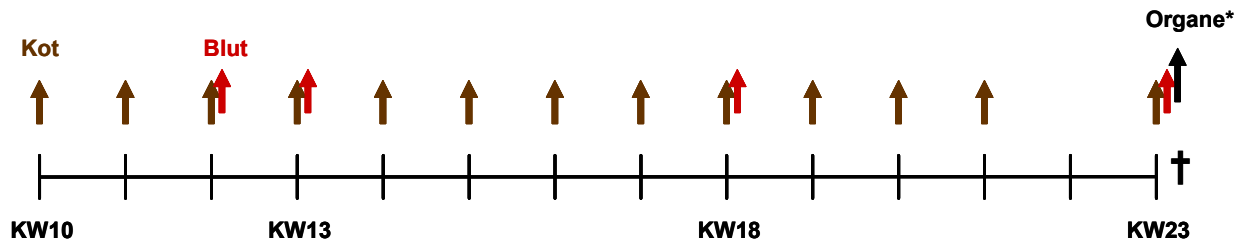


Abbildung 24 Blut-, Kot-, und Organentnahmeintervalle

#### IV.4.3. Einteilung der Sentinels in starke und schwache Ausscheider

Um die Sentinels in Gruppen mit starker Ausscheidung und mit schwacher Ausscheidung einzuteilen, wurden die Ausscheidungswerte (Kopienzahl/Kotansatz/Maus) jeder Woche sowie einige Positivproben im dekadischen Logarithmus in einer Graphik aufgetragen (Abbildung 25). Die Grenzlinie zwischen schwacher und starker Ausscheidung wurde bei einer Kopienzahl von  $10^7$  Kopien/Kotansatz/Maus willkürlich festgesetzt.

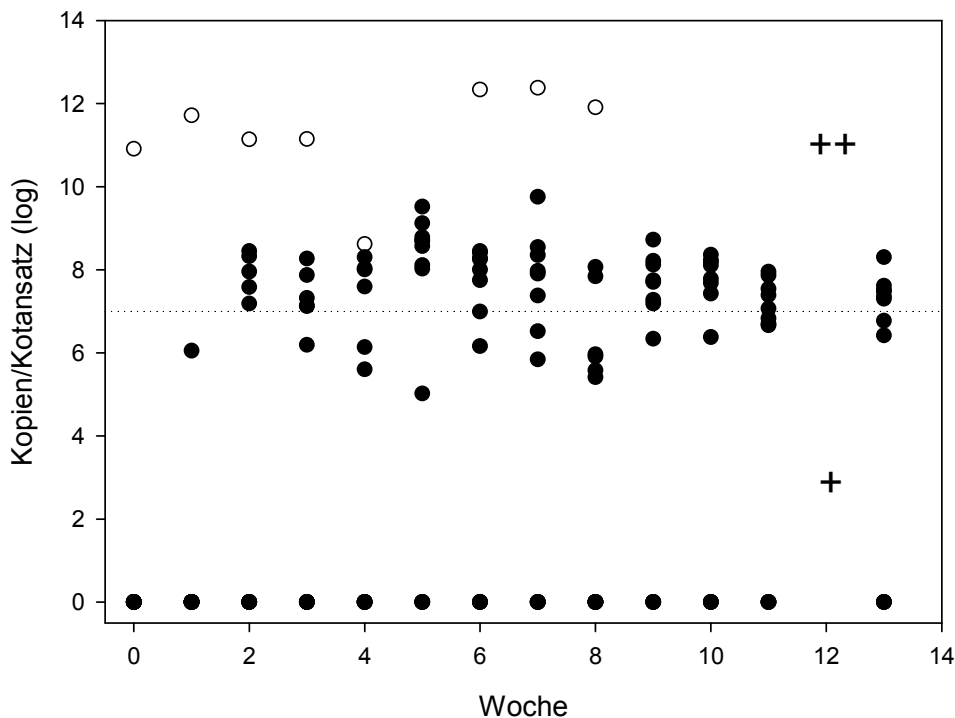


Abbildung 25 Einteilung in schwache (+) und starke (++) Virususscheider  
Leere Kreise: Positivproben, gefüllte Kreise: Kotproben der Einzelmäuse

#### **IV.4.4. Virusausscheidung und Serokonversion in den Sentinels**

Nach Ablauf des 13 wöchigen Untersuchungszeitraumes waren acht Sentinels serologisch und im direkten Virusnachweis positiv. Vier Sentinels waren negativ. In Woche 13 deckten sich die serologischen Ergebnisse des Immunfluoreszenzassays und die Kot-RT-qPCR Ergebnisse von allen zwölf getesteten Mäusen (Abbildung 26). Bei zwei der vier am Ende des Untersuchungszeitraumes mit RT-qPCR und Serologie negativ getesteten Mäuse konnte über den ganzen Untersuchungszeitraum keine Ausscheidung nachgewiesen werden. Ein Sentinel war nur in Woche 3 in der Kot RT-qPCR leicht positiv. Ein weiterer Sentinel (Raum 6114, Sentinel 2), der final in RT-qPCR und Serologie negativ getestet wurde, zeigte einen ungewöhnlichen Verlauf der Ausscheidung: Über fünf Wochen (Woche 2 bis Woche 7) konnte eine kontinuierliche Ausscheidung von MNV mit dem Kot nachgewiesen werden, ab Woche 8 bis zur finalen Kotentnahme war keine Ausscheidung mehr messbar. Der serologische Nachweis war bei diesem Sentinel nur bei einer von drei Messungen, nämlich in Woche 8, positiv. Interessanterweise konnte nach 13 Wochen im Mesenteriallymphknoten Virus nachgewiesen werden (Tabelle 26, Tabelle 27)

Sechs der acht Sentinels, die in Woche 13 im IFA Test sowie mit der Kot RT-qPCR positiv getestet wurden, begannen zwischen Woche 1 und 5 kontinuierlich bis Woche 13 MNV auszuschleiden. Einer der Sentinels, die in Woche 13 im IFA sowie mit der Kot RT-qPCR positiv getestet wurden, begann in Woche 3 auszuschleiden. Bei dieser Maus konnte in Woche 7 keine Ausscheidung nachgewiesen werden. Ein in Woche 13 im IFA Test sowie mit der Kot RT-qPCR positiv getesteter Sentinel war in Woche 2 positiv, schied aber erst ab Woche 7 kontinuierlich Virus aus, eine Serokonversion war bei dieser Maus schon ab Woche 3 messbar. Auch die restlichen sieben der in IFA und Kot RT-qPCR final positiv getesteten Sentinels hatten in Woche 3 oder Woche 8 eine messbare Anzahl Antikörper gebildet (Tabelle 26).

Tabelle 26 Darstellung der Ergebnisse des Feldversuchs Sentinelscreening

Darstellung der Ausscheidung

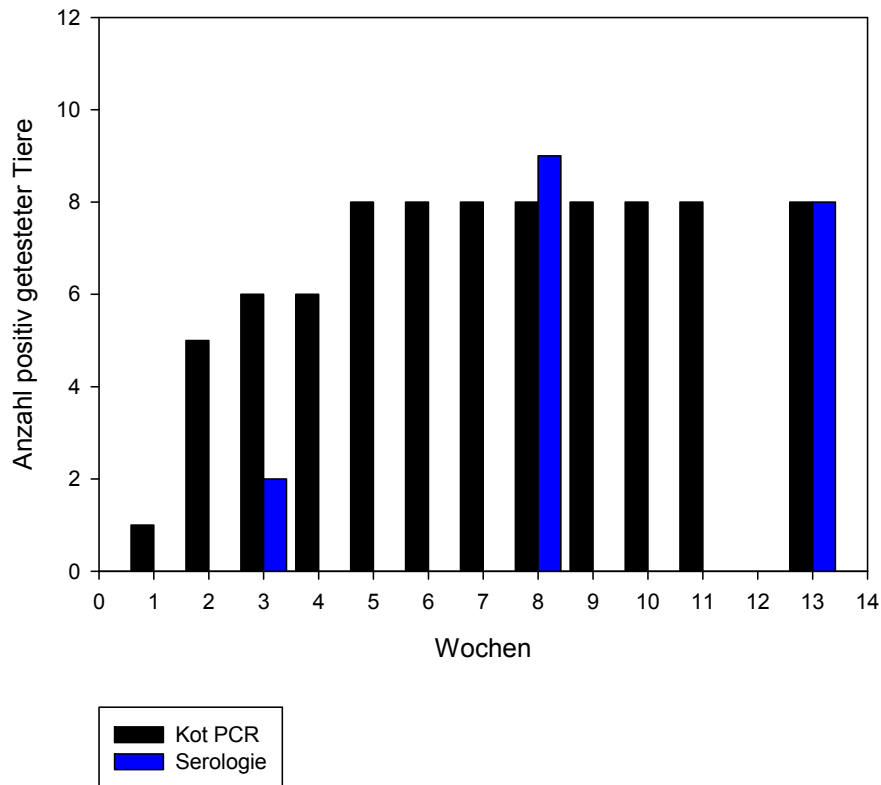
- ++ hohe Ausscheidung >10<sup>7</sup> Kopien
- + niedrige Ausscheidung <10<sup>7</sup> Kopien
- neg keine Ausscheidung

Serologische Ergebnisse dargestellt durch farbliche Unterlegung

- +++ im Immunfluoreszenztest
- ++ im Immunfluoreszenztest
- + im Immunfluoreszenztest
- negativ im Immunfluoreszenztest

Raum	Sentinel	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W13
6099	1	neg	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
	2	neg	neg	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
6100	1	neg	neg	neg	neg	+	++	+	++	++	++	++	+	++
	2	neg	neg	++	++	++	++	++	+	++	+	++	++	+
6101	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	+	+	++	++	++	++	++
6113	1	neg	neg	neg	neg	neg	++	++	++	++	++	+	+	++
	2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6114	1	neg	neg	neg	++	++	++	++	neg	++	++	++	+	++
	2	neg	neg	++	++	+	++	++	++	neg	neg	neg	neg	neg
6115	1	neg	neg	neg	+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	2	neg	neg	++	neg	neg	neg	neg	++	++	++	++	+	+
H20		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	nd
	Einstreu	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13

Wie in Abbildung 26 ersichtlich, zeigte ein Sentinel schon in Woche 1 Virusausscheidung. Nach drei Wochen schieden sechs Sentinels Virus aus, zwei zeigten Serokonversion. Am Ende des 13-wöchigen Untersuchungszeitraumes ergab sich mit jeweils den gleichen acht positiv getesteten Sentinels eine sehr gute Übereinstimmung der Nachweismethoden, des RT-qPCR -Assays und des Immunfluoreszenzassays.



**Abbildung 26 Darstellung der in der Kot PCR sowie im Immunfluoreszenzassay positiv getesteten Mäuse**

Da wir uns auch mit der Fragestellung beschäftigten, ob Mäuse, die im Kot auf MNV positiv getestet wurden, das Virus beim Embryotransfer übertragen können, wurden am Ende des 13wöchigen Untersuchungszeitraumes Organe entnommen. Es wurden Mesenteriallymphknoten und Nebenhoden entnommen und mit der RT-qPCR auf das Vorhandensein von Murinem Norovirus untersucht.

Von acht in Woche 13 in Kot und Serum positiven Sentinels konnte bei fünf Mäusen Virus im Mesenteriallymphknoten nachgewiesen werden. Außer in einem Fall, in dem die Maus an einem Untersuchungszeitpunkt negativ getestet wurde, war bei diesen fünf Mäusen ab Beginn der Ausscheidung kontinuierlich Virus im Kot vorhanden (Tabelle 27).

Bei einem Sentinel (Raum 6114, Sentinel 2) war der Virusnachweis im Lymphknoten positiv, obwohl in Woche 13 weder Ausscheidung von Virus noch Serokonversion nachgewiesen

werden konnten. Im Lauf des Untersuchungszeitraumes hatte diese Maus jedoch Virausscheidung (Woche 2 bis 7) und Serokonversion (Woche 8) gezeigt.

Bei keinem der Sentinels konnte Virus in den Nebenhoden gefunden werden.

In Woche 13 wurde das Serum von zwei unabhängigen Untersuchungslabors mit dem IFA und mit dem ELISA auf MNV untersucht. Die Ergebnisse decken sich in elf Fällen. In einem Fall, in dem eine Serumprobe im IFA geringfügig positiv getestet wurde, war das Ergebnis für die gleiche Probe im ELISA negativ.

**Tabelle 27 Ergebnisse der Organentnahme sowie Kot- und Serologieergebnisse am Ende des Untersuchungszeitraumes**

Raum	Sentinel	Kot	MesLy	Nebenhoden	Serologie (IFA)	Serologie (ELISA)
6099	1	++	neg	neg	++	+
	2	++	++	neg	++	+
6100	1	++	neg	neg	++	+
	2	+	++	neg	+++	+
6101	1	neg	neg	neg	neg	neg
	2	++	++	neg	+	+
6113	1	++	++	neg	++	+
	2	neg	neg	neg	neg	neg
6114	1	++	++	neg	+	neg
	2	neg	++	neg	neg	neg
6115	1	neg	neg	neg	neg	neg
	2	+	neg	neg	+++	+

## **IV.5. Virusisolierung aus der Tierhaltung**

### **IV.5.1. Screeningergebnisse**

Um das Feldvirus, das sich in unserer Maushaltung befindet, in der Zellkultur anzüchten zu können, machten wir zwei Käfige aus unserer Tierhaltung mit MNV ausscheidenden Mäusen ausfindig. Wir untersuchten dazu die Kotpellets von Mäusen aus zwei Racks eines der Räume, deren Sentinels in oben genanntem Feldversuch (IV.4) MNV in dem jeweiligen Raum angezeigt hatten, auf Ausscheidung von murinem Norovirus.

In den zwei untersuchten Racks waren insgesamt acht Reihen mit Mäusen besetzt, diese wurden nach Rack/Reihe 1/3 bis 1/7 und 3/1 bis 3/5 bezeichnet.

Aus diesen Reihen wurden zu Beginn des Screenings Sammelproben entnommen.

Die Spanne der Kopienzahl, die in den Sammelproben der einzelnen Reihen nachgewiesen werden konnte, bewegte sich von  $8,5 \cdot 10^5$  Kopien/Kotansatz bis  $1,3 \cdot 10^7$  Kopien/Kotansatz. Es wurden drei Reihen ausgewählt, in denen die Mäuse einzeln gesetzt und individuell auf Virusausscheidung untersucht wurden. Die Kriterien für die Auswahl der Reihen waren sowohl eine möglichst hohe Ausscheidung, wie es in den Reihen 1/6 und 3/1 der Fall war (Abbildung 27) als auch eine hohe Anzahl an in Gruppen sitzenden Mäusen (Reihe 1/6 und Reihe 3/3). Außerdem waren neue Sentinels unter den untersuchten Mäusen in Reihe 3/1.

In Reihe 1/6 saßen 15 Mäuse, in Reihe 3/1 sechs Mäuse und in Reihe 3/3 14 Mäuse, die einzeln untersucht wurden.

Bei vier der einzeln untersuchten Mäuse war keine Ausscheidung nachzuweisen. Alle Vier saßen mit mindestens einem Partner zusammen, der zum Zeitpunkt der Untersuchung Virus ausschied. Es gab zum Zeitpunkt der Untersuchung in den untersuchten Reihen keinen Käfig, in dem MNV nicht nachgewiesen werden konnte.

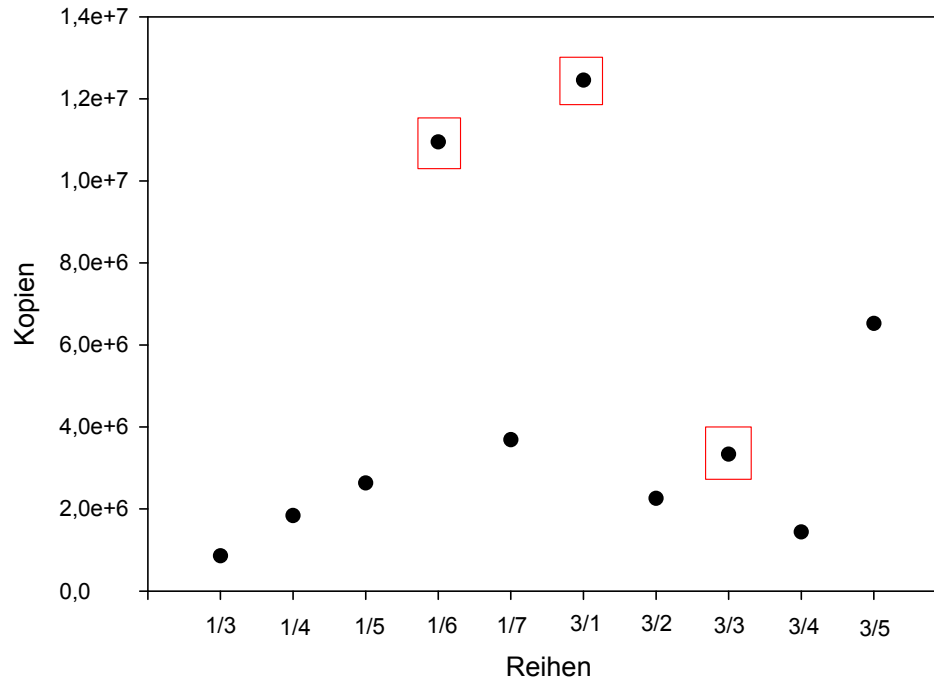
Die auf MNV positiv getesteten Mäuse hatten eine Ausscheidung von bis zu  $1,3 \cdot 10^7$  Kopien/Kotansatz. Bei zwei Mäusen konnte eine besonders hohe Ausscheidung nachgewiesen werden, wobei es sich um eine Maus aus einer Dreiergruppe der Reihe 1/6 und um einen der Sentinels handelte. Beim zweiten Sentinel konnte zu diesem Zeitpunkt nur eine sehr geringe Ausscheidung nachgewiesen werden (Abbildung 28).

Die gerade erwähnte Dreiergruppe (Reihe 1/6) sowie eine weitere Dreiergruppe aus Reihe 3/3 wurden als Kotspender für die Anzucht von MNV ausgewählt (Abbildung 28). Als Kriterien wurden festgelegt: Alle Mäuse müssen Ausscheider sein, mindestens eine Maus der Gruppe sollte eine hohe Ausscheidung zeigen, sowie insgesamt eine möglichst hohe Gruppengröße. Außerdem sollten die zwei ausgewählten Gruppen in unterschiedlichen Racks sitzen und ein unterschiedliches Altersprofil aufweisen.

Der Kot der Dreiergruppen wurde gesammelt, in DMEM suspendiert, zentrifugiert, Bakterienfrei filtriert, mit U1 für Überstand 1 (Kot der Mäuse aus Reihe 1/6) und U2 für Überstand 2

(Kot der Mäuse aus Reihe 3/3) bezeichnet, und das enthaltene Virus in der Zellkultur auf RAW 264.7-Zellen vermehrt.

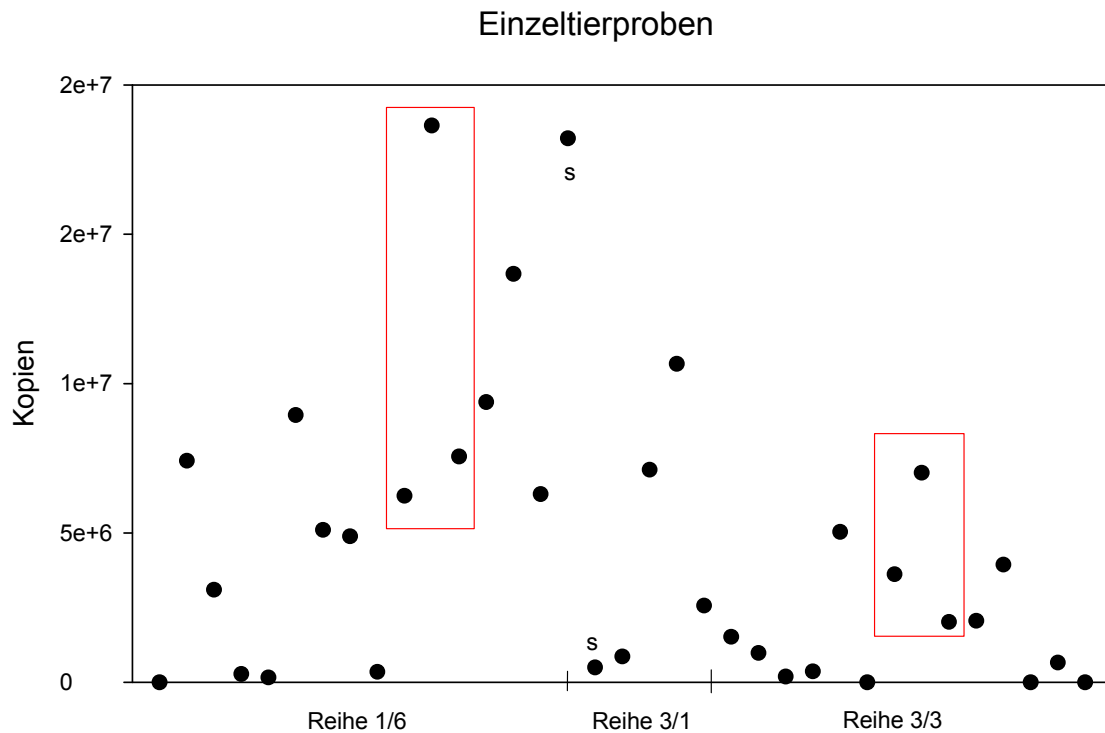
Sammelkotproben aus zwei Racks



**Abbildung 27 Anzahl Viruskopien in Sammelkotproben**

**Auftrag der untersuchten Reihen gegen die Kopienzahl. 1/3 bedeutet Rack 1 Reihe 3. Die Werte der zur weiteren Differenzierung ausgewählten Reihen sind rot markiert.**





**Abbildung 28 Anzahl Viruskopien in Einzeltierkotproben**

**Auftrag der Einzeltiere gegen die Kopienzahl. Die Sentinels sind mit einem S markiert. Die zur Virusanzucht ausgewählten Einzeltiere sind rot markiert.**

#### IV.5.2. Quantifizierung des Virus und dessen Passagen

Obwohl die Anzucht der Viren aus beiden Kotsammelproben exzellent funktioniert hatte, beschränkten wir uns darauf, für eine weitere Verwendung nur einen der beiden Überstände mehrfach zu vermehren. Der Überstand zur Anzucht des aus unserer Tierhaltung gewonnenen Norovirus der Dreiergruppe U1, hier MNV-Neuherberg genannt, hatte in der RT-qPCR eine Kopienzahl von  $1 \cdot 10^6$ /Kotansatz, nach der ersten Passage in der Zellkultur eine Kopienzahl von  $4 \cdot 10^{12}$ /Ansatz und nach der Passage 2 eine Kopienzahl von  $2 \cdot 10^{12}$ /Ansatz. Die  $TCID_{50}/ml$  des zur Anzucht verwendeten Überstandes wurde mit  $10^4$  bestimmt, die Passage 1 hatte eine  $TCID_{50}/ml$  von  $10^5$ , Passage 2 von  $10^{6,5}$  (Tabelle 28)

**Tabelle 28 Quantifizierung der Passagen von MNV-Neuherberg**

	Real Time PCR	Titration zur Bestimmung der $TCID_{50}$
Kotüberstand U1	$1 \cdot 10^6$ /Kotansatz	$10^4/ml$
Passage 1 auf RAW 264.7-Zellen	$4 \cdot 10^{12}$ /Virusansatz	$10^5/ml$
Passage 2 auf RAW 264.7-Zellen	$2 \cdot 10^{12}$ /Virusansatz	$10^{6,5}/ml$

## IV.6. Organuntersuchungen

Bisher hatten wir uns weitgehend auf die Existenz von Virus im Kot, sowie die Reaktion des Organismus in Form von Serokonversion konzentriert. In diesem Versuch wurde das Vorhandensein von Virus in bestimmten Organen, nämlich im Darm, dem Ort der Aufnahme des Virus, im Mesenteriallymphknoten, der den Darm drainiert und in den Reproduktionsorganen, nämlich Ovar und Nebenhoden, die die wesentlichen Organe für den Embryotransfer darstellen, untersucht. Beim Embryotransfer werden zur In-Vivo-Embryonengewinnung aus Eileiter oder Uterus des Spenderweibchens die Embryonen ausgespült und in ein Empfängerweibchen eingesetzt. Für die In-Vitro-Fertilisation werden vom männlichen Spendertier die Nebenhoden entnommen und die Spermien ausgeschwemmt. Vom Weibchen werden die Oozyten, die im Ovar herangereift sind, aus der Ampulla des Eileiters gewonnen. Oozyten und Spermien, die potentiellen Virusträger, werden in einer Petrischale für die Fertilisation inkubiert und die daraus gewonnenen Embryonalstadien (vom Zweizeller bis zur Blastozyste, je nach Verwendung) in das Empfängerweibchen eingesetzt. Ist in den oben genannten Organen, dem Nebenhoden und damit den Spermien und dem Ovar, dem Heranreifungsort der Oozyten, MNV nicht nachzuweisen, ist die Übertragung des Virus über den Embryotransfer sehr unwahrscheinlich.

### IV.6.1. Untersuchung der Organe von mit Laborvirus inokulierten Mäusen

Es wurden aus oben genannten Experimenten (IV.2.1) weibliche Mäuse, sowie, um beide Geschlechter in die Untersuchungen aufzunehmen, männliche Sentinels aus den laufenden Hygieneuntersuchungen für die Organuntersuchungen ausgewählt. Diese wurden vier Gruppen zugeordnet, um den Zusammenhang zwischen Ausscheidungsverhalten bzw. Serokonversion und Existenz von Virus in den Organen zu untersuchen (Tabelle 29).

**Tabelle 29 Gruppeneinteilung der Organspender nach Ausscheidungsverhalten und Serokonversion.**

Benennung	Definition der Gruppe	Anzahl
Gruppe 1	Weibliche Mäuse, die serologisch positiv getestet wurden und deren Virusausscheidung vor dem Ende des Untersuchungszeitraumes endete	5
Gruppe 2	Weibliche Mäuse, die serologisch positiv getestet wurden und bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes Virus ausschieden	7
Gruppe 3	Weibliche Mäuse, die serologisch negativ getestet wurden, aber eine Zeit lang Virus ausschieden	5
Gruppe 4	Männliche Sentinels aus den laufenden Untersuchungen (CD-1 ♂), die serologisch positiv getestet wurden und zum Zeitpunkt der Blutentnahme Virus ausschieden	5

Die Organe wurden mit der RT-qPCR auf Existenz von MNV untersucht.

Als Kontrolle wurden die Organe von zwei Sentinels, die serologisch negativ und ausscheidungsnegativ waren, untersucht.

Mäuse der Gruppe 1 (serologisch positiv, Ausscheidung sistiert) fanden sich in der mit MNV-S99 inokulierten Versuchsgruppe. Sie zeigten spätestens ab Tag 14, eine Maus ab Tag 21, keine Ausscheidung mehr. Mäuse der Gruppen 2 und 3 (serologisch positiv, Ausscheidung positiv und serologisch negativ, Ausscheidung positiv) fanden sich in der mit MNV-4 inokulierten Gruppe. Sentinels, von denen Organe entnommen wurden, waren mit dem in unserer Maushaltung auftretenden Feldvirus infiziert.

Bei den Mäusen der Gruppen 2 und 4, die beide sowohl serokonvertiert hatten als auch im Kot positiv waren, wurden durchgängig der Darm positiv, die Reproduktionsorgane jedoch negativ getestet (Tabelle 31, Tabelle 33). Außer bei einer Maus der Gruppe 1, bei der alle Organe positiv getestet wurden, wurden die Organe der Mäuse der Gruppen 1 und 3, die entweder in Serum oder Kot negativ waren, durchgehend negativ getestet (Tabelle 30, Tabelle 32).

Von den fünf Mäusen der Gruppe 1 wurden die Organe einer Maus positiv, die Organe der anderen Vier negativ getestet. Bei einer Maus wurde Virus in Mesenteriallymphknoten, Darm und Ovar nachgewiesen (Tabelle 30), im Mesenteriallymphknoten befand sich die höchste Konzentration von Viruskopien ( $10^6$  Kopien/Kotansatz), im Ovar die Niedrigste ( $10^4$  Kopien/Kotansatz) (Daten nicht dargestellt). Von den sieben Mäusen der Gruppe 2 wurden bei drei Mäusen Darm und Mesenteriallymphknoten positiv getestet. Bei vier Mäusen aus dieser Gruppe wurden nur der Darm, jedoch nicht der Mesenteriallymphknoten positiv getestet. Die Ovarien aller Mäuse der Gruppe 2 wurden negativ getestet (Tabelle 31). Die Organe der fünf Mäuse aus Gruppe 3 wurden negativ auf Murines Norovirus getestet (Tabelle 32). Von fünf Sentinels (Gruppe 4), die Virus mit dem Kot ausgeschieden hatten, konnte bei allen Mäusen Virus im Darm nachgewiesen werden, bei drei Mäusen zusätzlich im Mesenteriallymphknoten. Die Mesenteriallymphknoten der zwei übrigen Sentinels dieser Gruppe wurden negativ getestet. Die Nebenhoden wurden bei allen fünf Mäusen der Gruppe 4 negativ getestet (Tabelle 33). In der Kontrollgruppe konnte kein Virus nachgewiesen werden (Tabelle 34).

Außer in einem fraglichen Fall (Gruppe 1) wurden die Reproduktionsorgane aller Mäuse negativ getestet.

**Tabelle 30 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV  
Mäuse, die serologisch positiv getestet wurden und aufhörten auszuseiden**

Gruppe 1			
Tier #	MesLy	Darm	Ovar
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	+	+	+

**Tabelle 31 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV  
Mäuse, die serologisch positiv getestet wurden und bis zum Ende des  
Untersuchungszeitraumes Virus ausschieden**

Gruppe 2			
Tier #	MesLy	Darm	Ovar
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	-	+	-
5	-	+	-
6	-	+	-
7	-	+	-

**Tabelle 32 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV  
Mäuse, die serologisch negativ getestet wurden und eine Zeit lang Virus ausschieden**

Gruppe 3			
Tier #	MesLy	Darm	Ovar
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-

**Tabelle 33 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV  
Männliche Sentinels aus dem laufenden Betrieb (CD-1 ♂) von denen bekannt war, dass sie  
Virusausscheider sind**

Gruppe 4			
Tier #	MesLy	Darm	Nebenhoden
1	-	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	+	-
5	-	+	-

**Tabelle 34 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV  
Männliche Sentinels aus dem laufenden Betrieb (CD-1 ♂) von denen bekannt war, dass sie  
keine Virusausscheider sind**

Tier #	Kontrolle		
	MesLy	Darm	Nebenhoden
1	-	-	-
2	-	-	-

#### IV.6.2. Untersuchung der Organe von mit Feldvirus natürlich infizierten Mäusen

Um das Risiko einer MNV-Übertragung beim Embryotransfer bewerten zu können, wurden von 21 Mäusen aus MNV-positiven Bereichen unserer Maushaltung im Alter von 32 bis 660 Tagen Organe entnommen und auf die Existenz von MNV getestet. Um nur nachgewiesene Virusausscheider in das Experiment aufzunehmen, wurde Kot direkt aus dem Dickdarm entnommen und auf Murines Norovirus untersucht. Zur Überprüfung der für den Embryotransfer wichtigen Organe wurden Nebenhoden und Ovar und zusätzlich jeweils ein Mesenteriallymphknoten entnommen. In allen 21 Fällen konnte Murines Norovirus im Dickdarmkot nachgewiesen werden, so dass auch die entnommenen Organe mit der RT-qPCR auf MNV untersucht wurden (Tabelle 35).

Für die statistischen Auswertungen wurden die acht ausscheidungspositiven Sentinels (Tabelle 36) aus oben genanntem Feldversuch (IV.4.4) mit einbezogen.

**Tabelle 35 Real Time PCR PCR Ergebnisse der Organe von 21 zufällig ausgewählten Mäusen  
aus einem MNV-positiven Bereich der Tierhaltung**

Linie	Maus	Geschlecht	Kot	Ovar/NH	MesLy	Alter (Tage)
ÜX	2	♂	1,61E+07	neg	4,10E+08	99
ÜX	6	♂	1,84E+08	neg	1,44E+09	99
ÜX	15	♂	2,22E+08	neg	3,14E+08	78
ÜX	16	♂	1,86E+08	neg	5,59E+08	78
ÜX	17	♂	1,37E+08	neg	9,20E+07	78
ÜX	18	♂	1,72E+08	neg	9,52E+08	78
ÜX	19	♀	2,20E+07	neg	9,12E+08	78
ÜX	20	♀	5,30E+07	neg	1,07E+09	78
ÜX	21	♀	6,07E+06	neg	5,35E+08	78
ÜX	22	♀	5,34E+08	neg	2,00E+10	32
ÜX	23	♀	1,50E+08	neg	6,64E+09	32
ÜX	24	♀	1,05E+09	neg	7,58E+09	32
AT	134	♀	1,18E+08	neg	6,19E+08	646
AT	145	♀	7,18E+07	neg	8,24E+06	617
AT	202	♀	4,44E+08	neg	neg	541
AT	203	♀	1,56E+08	neg	4,07E+07	541
AT	205	♀	8,26E+06	neg	4,25E+08	512
AT	206	♀	6,42E+08	neg	4,30E+08	512
AT	213	♀	6,52E+07	neg	4,26E+08	473
AÜ	214	♀	4,43E+07	neg	3,64E+08	660
AÜ	215	♀	2,83E+07	neg	3,14E+08	660

**Tabelle 36 Real Time PCR Ergebnisse der Organe von acht Sentinels, die MNV ausschieden**

Raum	Maus	Geschlecht	Kot	Nebenhoden	MesLy	Alter (Tage)
6099	1	♂	2,00E+08	neg	neg	155
	2	♂	1,98E+07	neg	7,77E+08	155
6100	1	♂	3,01E+07	neg	neg	155
	2	♂	2,63E+06	neg	1,46E+08	155
6101	2	♂	4,12E+07	neg	1,22E+08	155
6113	1	♂	3,23E+07	neg	1,06E+09	155
6114	1	♂	2,26E+07	neg	4,78E+08	155
6115	2	♂	5,90E+06	neg	neg	155

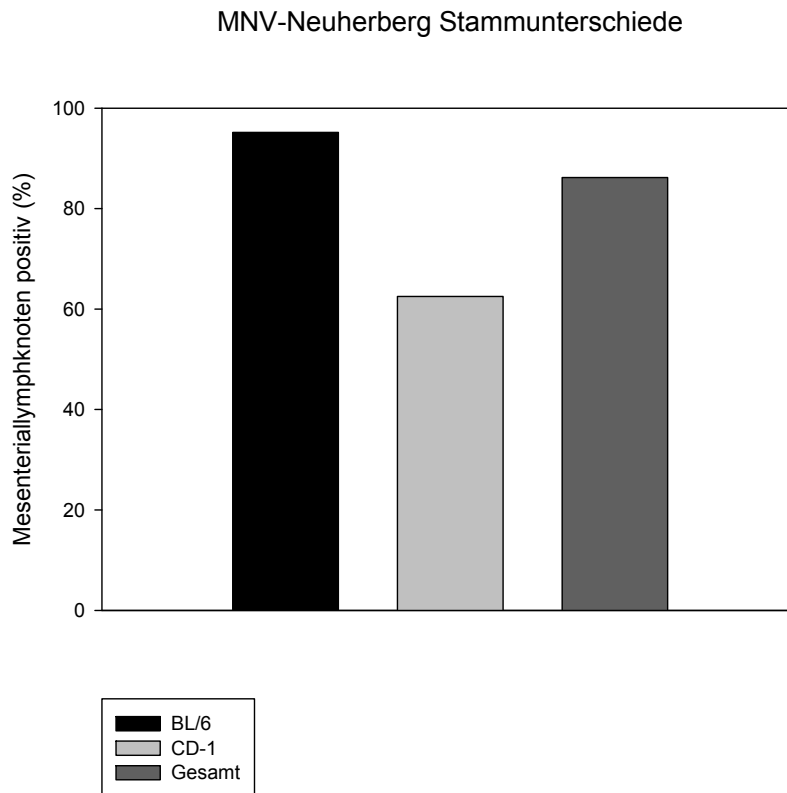
Bei den 21 Mäusen aus MNV-positiven Bereichen wurden hohe Kopienzahlen von  $6 \cdot 10^6$  bis  $1 \cdot 10^9$  Kopien/Kotansatz nachgewiesen (Tabelle 35). Von den Mesenteriallymphknoten der 21 Mäuse wurden 20 positiv getestet. Nur im Mesenteriallymphknoten einer weiblichen Maus (Linie AT, 541 Tage alt) konnte kein Virus nachgewiesen werden. Zwölf Mäuse waren <100 Tage, neun Mäuse >472 Tage alt, die Mäuse waren auf drei Linien (C57BL/6 Hintergrund) verteilt. Wir konnten keinen Zusammenhang in der MNV-Nachweishäufigkeit bezüglich des Alters oder der Mauslinie feststellen.

Da uns Daten der gleichen Proben von den Sentinels (♂, CD-1 Wildtyp) aus dem vorherigen Feldversuch vorlagen (Tabelle 36), wurden diese zusätzlich bezüglich unserer Fragestellung ausgewertet. Acht der Sentinels (155 Tage alt), wurden im Kot positiv getestet. In den Mesenteriallymphknoten dieser acht Mäuse konnte bei fünf Mäusen MNV nachgewiesen werden.

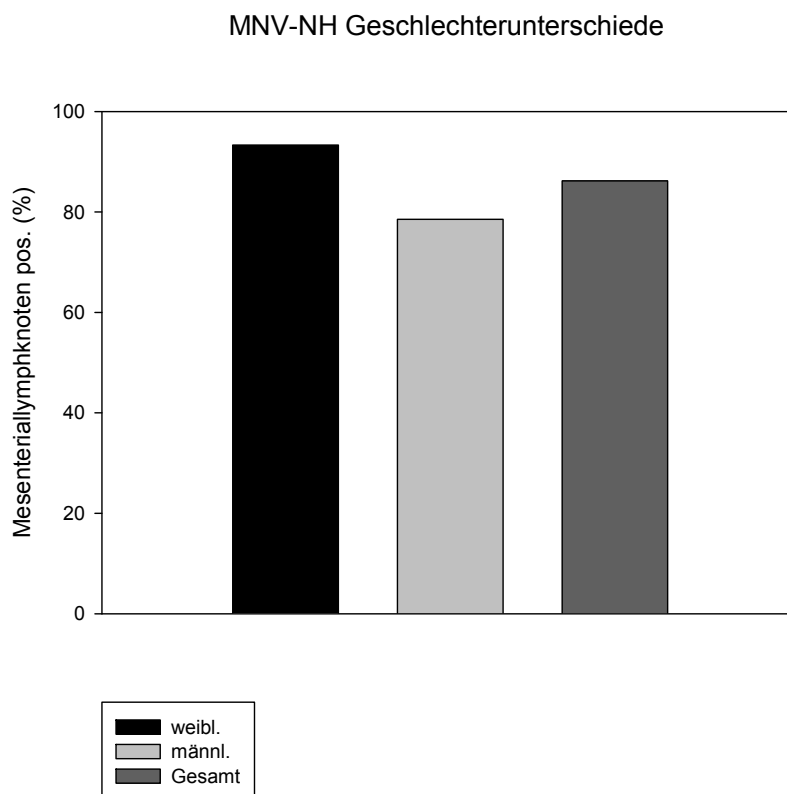
Da uns mit den Sentinels Mäuse des Stammes CD-1 und mit den übrigen Mäusen solche auf dem genetischen Hintergrund des Stammes C57BL/6 zur Verfügung standen, wurde die Prävalenz des Virus im Mesenteriallymphknoten beider Stämme verglichen (Abbildung 29). Zwischen den zwei Stämmen konnte mit einer Prävalenz von 95,2% bei C57BL/6-Mäusen und von 62,5% bei CD-1 Mäusen ein deutlicher Unterschied festgestellt werden.

Mit den Sentinels konnten insgesamt die Daten von 29 Mäusen, 14 männlichen und 15 weiblichen, ausgewertet werden. Es gab jedoch keinen deutlichen Unterschied in der Infektionshäufigkeit zwischen Männchen und Weibchen (Abbildung 30). Insgesamt konnte bei 86,2% (25 von 29) der mit MNV-NH infizierten Mäuse MNV im Mesenteriallymphknoten nachgewiesen werden (Abbildung 31).

In Ovarien und Nebenhoden konnte bei allen Mäusen kein Virus nachgewiesen werden.

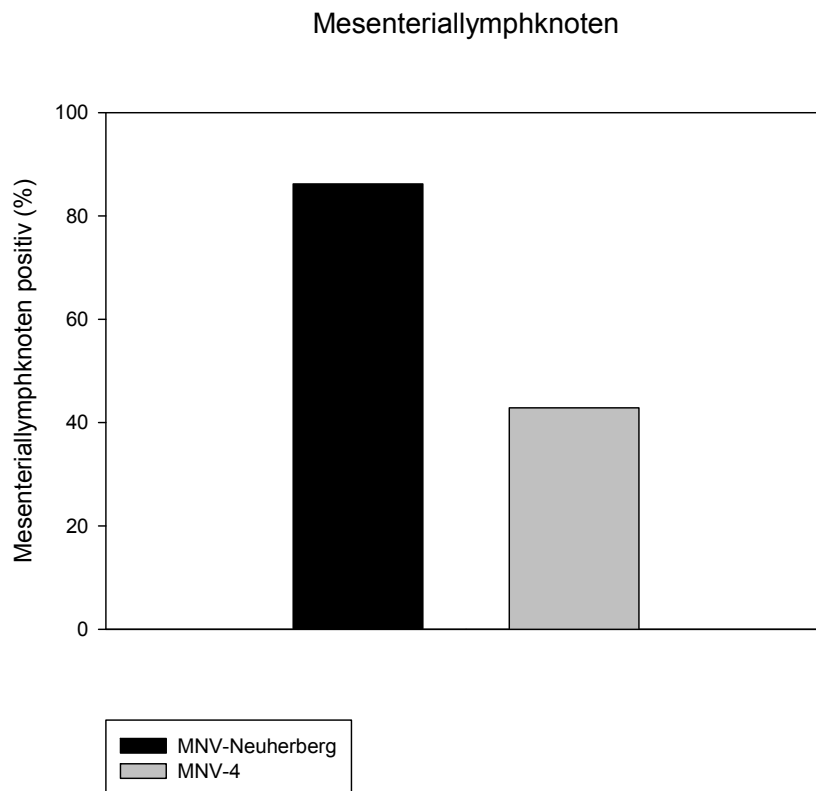


**Abbildung 29 Nachweis von MNV Neuherberg in den Organen MNV-ausscheidender Mäuse  
Unterschiede in der MNV-Prävalenz im Mesenteriallymphknoten bezüglich des Mausstammes**



**Abbildung 30 Nachweis von MNV Neuherberg in den Organen MNV-ausscheidender Mäuse  
Unterschiede in der MNV-Prävalenz im Mesenteriallymphknoten bezüglich des Geschlechts**

Um die Prävalenz von MNV-Neuherberg und MNV-4 im Mesenteriallymphknoten von Virus-Ausscheidern vergleichen zu können, wurden zusätzlich die Daten der sieben MNV-4 dauerausscheidenden Mäuse aus Abschnitt IV.6.1 prozentual ausgewertet (Abbildung 31). Mit einer Prävalenz von 86,2% in den Mesenteriallymphknoten MNV-NH infizierter Mäuse und nur 42,9% in den Mesenteriallymphknoten MNV-4 infizierter Mäuse konnte ein deutlicher Unterschied in der Prävalenz von MNV zwischen den Virusstämmen nachgewiesen werden.



**Abbildung 31 Nachweis von MNV in den Organen MNV-ausscheidender Mäuse  
Unterschiede in der MNV-Prävalenz in den Organen bezüglich des Virusstammes**



## V. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein *Real Time PCR*-Verfahren für den Nachweis von Murinem Norovirus im Kot etabliert und verifiziert. Es wurde getestet, wie sich zwei Laborvirus-Stämme in der Maus verhalten, ob diese über längere Zeit ausgeschieden werden und wie die Proben optimalerweise gesammelt werden, um möglichst wenige Virusausscheider zu übersehen. Um die reale Lage im Feld beurteilen zu können, wurde, zusätzlich zum serologischen Routinemonitoring, die Virusausscheidung von Sentinels aus unserer Maushaltung gescreent sowie das Feldvirus aus unserer Maushaltung isoliert und angezüchtet. Es wurde die Effizienz des Nachweises von Virus im Kot per RT-qPCR für das Hygienemonitoring überprüft.

Da die Sanierung von Mäusen heutzutage häufig durch Embryotransfer erfolgt [29, 30], wurden von künstlich infizierten Mäusen sowie von natürlich infizierten Mäusen aus unserer Maushaltung die Reproduktionsorgane auf Existenz von Murinem Norovirus untersucht und damit unsere Beobachtung untermauert, dass der Embryotransfer eine sichere Sanierungsmethode zur Beseitigung von Murinem Norovirus ist.

### V.1. Etablierung der Real Time PCR

Um eine größer angelegte Studie über die Ausscheidung von Virus durchführen zu können, etablierten und validierten wir eine RT-qPCR in unserer Abteilung. Der Nachweis von RNA durch die RT-qPCR ist eine Methode, bei der es genauer Beurteilung und Überprüfung einiger Parameter bedarf um Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse korrekt zu interpretieren [28, 31]. Um dem gerecht zu werden, orientierten wir uns an den MIQE Guidelines, nahmen einige Tests des von Müller et al. übernommenen Assays [21] zur Validierung vor und generierten dazu ein eigenes Plasmid.

Der *Threshold* wurde auf 0,20 festgelegt, nachdem wir die Fluoreszenzverläufe der Standards und verschiedener positiver und negativer Proben aus 5 Läufen der RT-qPCR folgendermaßen ausgewertet hatten: Bei den Standardverdünnungen und allen positiven Proben schnitt der *Threshold* die Fluoreszenzkurve im exponentiell verlaufenden Anteil. Bei Proben, deren Fluoreszenzkurve keinen exponentiellen Verlauf zeigte, schnitt der *Threshold* diese nicht, so dass die Proben negativ gewertet wurden.

Um die Reproduzierbarkeit unserer DNA-Standardkurve zu prüfen, verglichen wir 12 DNA Standards aus 6 voneinander unabhängigen RT-qPCR Läufen, jeweils ausgewertet mit dem *Threshold* von 0,20. Die Auswertungen ergaben, dass bei einer Konfidenz von 95% die Reproduzierbarkeit des Standards in einem Bereich von Abweichungen vom Durchschnitts-Cq-Wert einer jeden Verdünnungsstufe von 0,37 bis 0,79 lag. Das bedeutet, dass bei zukünftigen RT-qPCR Läufen damit zu rechnen ist, dass die Cq-Werte jeder

Verdünnungsstufe des Standards bei dem in unserem Validierungsversuch gemessenen Durchschnitts-Cq-Wert von  $20,27 \pm 0,37$  bei  $3 \cdot 10^8$  Kopien/*Template* bis zu einem Durchschnitts-Cq-Wert von  $36,17 \pm 0,79$  bei  $3 \cdot 10^3$  Kopien/*Template* liegen werden. Die vorhandenen Abweichungen verdeutlichen damit eine sehr geringe Intra-Assay-Varianz, die aber nicht ganz vermieden werden kann. Sie wird hervorgerufen durch den Einsatz verschiedener Chargen von Reagenzien, Pipettierungenauigkeiten und Temperaturschwankungen, die die Komplettierung von *Annealing* und/oder Denaturierung beeinflussen können [28, 32].

Die absoluten Standardabweichungen der Cq-Werte jeder Verdünnungsstufe des DNA-Standards bewegten sich in einem Bereich von 0,44 bei  $3 \cdot 10^8$  Kopien/*Template* bis 1,25 bei  $3 \cdot 10^3$  Kopien/*Template* (Tabelle 10). Die Standardabweichung war im niedrigen Kopienbereich von  $3 \cdot 10^3$  Kopien mit 1,25, verglichen mit den Werten der anderen Verdünnungsstufen des Standards, verhältnismäßig hoch, was durch die erhöhte Ungenauigkeit der Amplifikation im niedrigen Kopienbereichen zu erklären ist. Bei wenigen initial eingesetzten Kopien kann schon durch sehr geringe Unterschiede in den PCR Effizienzen oder kleinste Pipettierungenauigkeiten, die bei geringerer Konzentration größere Konsequenzen haben, eine größere Varianz der gemessenen Kopienzahlen zustande kommen [32]. Würde nur die Abweichung des Cq-Wertes der niedrigsten Verdünnungsstufe des Standards den *Slope* negativ beeinflussen, so dass dieser größer -3,1 oder kleiner -3,6 wäre, könnte dieses Ergebnis aus der Auswertung des Standards herausgenommen werden. Somit würde man sich jedoch für Proben, die in der Größenordnung der gestrichenen Verdünnungsstufe liegen, nicht mehr in einem gut reproduzierbaren Bereich befinden. Trat dieser Fall ein, wurden betroffene RT-qPCR-Läufe mit einer neuen Verdünnungsreihe des Standards wiederholt.

Im Gegensatz zu bisher etablierten RT-qPCRs für den Nachweis von Murinem Norovirus in Kotproben, die mit einem DNA-Standard zur Quantifizierung ausgeführt worden waren [21, 33], generierten wir durch In-Vitro-Transkription aus dem von uns erstellten Plasmid einen RNA-Standard und setzten diesen in unserer RT-qPCR ein. Da das Genom des Murinen Norovirus als RNA vorliegt, entspricht dieser eher den natürlichen Gegebenheiten. Sowohl der Standard als auch die Proben sind somit der Reversen Transkriptions-Reaktion ausgesetzt, so dass der Effektivität der RT-Reaktion jedes einzelnen PCR-Laufs Rechnung getragen wird. Die Ergebnisse können, im Verhältnis zum Standard, folglich nicht durch eine schwankende RT-Effizienz beeinflusst werden. Zusätzlich überprüften wir, da uns damit sowohl ein DNA-, als auch ein RNA-Standard zur Verfügung stand und nur die Vervielfachung des Letzteren von der RT-Reaktion beeinflusst wird, die Effektivität der RT-Reaktion in unserem Assay, indem wir DNA- und RNA-Standard verglichen. Wir konnten eine weitgehende Übereinstimmung der Cq-Werte beider Standards bezüglich der

eingesetzten Kopien feststellen, wodurch wir in unserem Assay eine ausgezeichnete Effizienz der RT-Reaktion bescheinigen konnten. Damit konnten wir davon ausgehen, dass nahezu jedes RNA Molekül als DNA-Molekül für die PCR-Reaktion zur Verfügung stand.

Obwohl im Rahmen des Hygienemonitoring für Viren der serologische Nachweis empfohlen wird [5], beschäftigten wir uns mit dem direkten Nachweis von Noroviren im Kot infizierter Tiere. Dafür war es essentiell, den Einfluss von Kotbestandteilen auf die Effizienz des Virusnachweises einschätzen zu können. Im Darm und damit im Kot befinden sich RNAsen unterschiedlicher Herkunft, wie die Ribonuklease A des Pankreas [34] und RNAsen des Darmepithels. Angiogenin-4 oder RNase 7 wirken beispielsweise antibakteriell auf unerwünschte Bakterien [35] und auch die Darmbakterien selbst enthalten RNAsen [36], so dass ein Einfluss von Kot auf die nachgewiesene Virusmenge nicht überraschend ist. Wir versuchten im Experiment, diesen Einfluss zu messen. Die Relation der in der RT-qPCR gemessenen Kopienzahlen zwischen einer definierten Virusmenge und der gleichen Virusmenge nach 24 stündigem Einfluss von Kot lag im Bereich zwischen  $1/3$  und einer Logarithmusstufe. Folglich sollte bei der Interpretation von Messwerten, die nach RNA-Isolierung aus Kot erhoben wurden, die Erniedrigung der Kopienzahlen um  $1/3$  -1 log Stufe berücksichtigt werden. Obwohl in früheren Publikationen in Kotproben, die bis zu 14 Tage bei Raumtemperatur gelagert worden waren, immer noch MNV nachgewiesen werden konnte [37], ist aufgrund unserer Ergebnisse eine Aufbewahrung dieser unter RNase inaktivierenden Bedingungen, wie dem Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  [38], anzuraten. Das gilt besonders, wenn eine Quantifizierung der RNA vorgenommen werden soll oder eine niedrige Kopienzahl zu erwarten ist.

Bei der Interpretation der RT-qPCR Ergebnisse sollten außerdem folgende zwei Annahmen berücksichtigt werden. Wir bezogen unsere Berechnungen auf die Annahme, dass bei Suspension des Kotes in Milli-Q-Wasser und anschließender Zentrifugation die gesamte Virusladung der Probe im Überstand zu finden ist. Außerdem gingen wir für die Berechnung der Kopienzahl in den Kotproben davon aus, dass bei Aufreinigung der Kotproben die gesamte enthaltene RNA isoliert wird. Der Virusgehalt eines Kotansatzes wurde von uns mit diesen Annahmen, aber auch dem Bewusstsein, dass aufgrund nicht 100%iger Effizienz der Virusisolierung das Ergebnis niedriger ausfällt, als es der Realität entspricht, aus der Messung in  $5\mu\text{l}$  Probenansatz auf den gesamten Kotansatz umgerechnet. Aufgrund der Verwendung von  $1/12$  der aus einem Probenansatz isolierten RNA multiplizierten wir den gemessenen Wert mit 12. Dies entspricht also in etwa dem Wert aus  $140\mu\text{l}$  Kotüberstand. Es handelt sich bei den von uns gemessenen Kopienzahlen um sehr hohe Werte, meist im Bereich von  $10^6$  bis  $10^8$ , so dass die oben beschriebene Reduktion der gemessenen Kopienzahl keinen sehr großen Einfluss auf das Ergebnis hatte. Im Übrigen werden im Zusammenhang mit dem Hygienemonitoring nur positive von negativen Proben

unterschieden, gegebenenfalls unter Berücksichtigung der Nachweissensitivität. Der Vergleich von quantitativen Werten aus RT-qPCR Assays verschiedener Publikationen muss generell kritisch betrachtet werden, da die Probennahme und –behandlung oft nicht ausreichend beschrieben wird und die Inter-Assay Varianz der RT-qPCR sehr hoch ist. Außerdem muss beim quantitativen Vergleich beachtet werden, dass häufig die Virusladung einer Probe auf unterschiedliche Bezugswerte berechnet wird (Kopienzahl pro Kotansatz [hier], Kopienladung pro ml Kot [39] Kopienzahl pro Gramm Kot [33]) und gegebenenfalls umgerechnet werden muss.

## **V.2. Direkte Inokulation von Mäusen mit den Laborvirusstämmen MNV-4 und MNV-S99**

Zum Vergleich der biologischen Eigenschaften der zwei uns zur Verfügung stehenden Laborvirusstämme MNV-4 und MNV-S99 inokulierten wir eine Verdünnungsreihe dieser jeweils intrauterin und oral.

Auffällig war sofort, dass sich Ausscheidung und Serokonversion nicht abhängig voneinander verhielten. So serokonvertierte nicht jede Maus, die Virus ausschied genauso wie nicht jede Maus, die serokonvertierte, längere Zeit Virus ausschied.

Nach oraler Inokulation von MNV-S99 konnte bei zwei Mäusen der höchsten inokulierten Virusdosis von  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/Maus ab dem ersten Untersuchungszeitpunkt an Tag 14 eine Serokonversion nachgewiesen werden. In den ersten zwei Wochen p.i. schieden Mäuse ab einer Inokulationsdosis von  $10^1$  TCID<sub>50</sub>/Maus Virus aus. Ab Tag 21 konnte ein deutlicher Rückgang von ausscheidenden Mäusen beobachtet werden und bis Tag 42 schied nur noch eine Maus der höchsten Inokulationsdosis Virus aus. Bei einer Darmpassage von acht bis 14 Stunden (Maus) hatten wir im Fall einer fehlenden Infektion mit einer Ausscheidung des gesamten Inokulats nach höchstens drei bis vier Tagen gerechnet. Das legt die Vermutung nahe, dass das Virus in Mäusen, die nicht serokonvertierten, entweder keine oder nur eine kurze Phase der Replikation von zwei bis maximal drei Wochen verursachte. Auch Mumphrey et al. kamen zu diesem Schluss, nachdem nach Infektion mit mehrfach passagiertem MNV-1 in immunkompetenten Mäusen nach 7 Tagen kein Virus mehr nachgewiesen werden konnte, obwohl dies drei Tage nach Infektion in einigen Organen noch der Fall gewesen war [22]. Da wir erst ab einer sehr hohen Inokulationsdosis überhaupt Serokonversion nachweisen konnten, scheint auch das Immunsystem nach oraler Inokulation nur bei Virusdosen von mindestens  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/Maus von MNV-S99 für eine Reaktion ausreichend stimuliert zu werden.

Nach intrauteriner Inokulation von MNV-S99 konnte keine Ausscheidung nachgewiesen werden. Wir hätten erwartet, dass das Inokulat auch nachzuweisen gewesen wäre, wenn keine Replikation stattgefunden hätte. Eine Erklärung für das Fehlen dessen könnte sein,

dass unsere Untersuchungen erst an Tag 7 begannen, so dass das Virus zu diesem Zeitpunkt schon vollständig aus dem Uterus ausgeschieden oder von diesem resorbiert worden war. Es konnte jedoch nach Inokulation mit den zwei höchsten Inokulationsstufen ab Tag 28 eine Serokonversion nachgewiesen werden. Da aufgrund fehlender Ausscheidung keine Replikation stattgefunden haben konnte, konnte die Serokonversion nur als Reaktion des Immunsystems auf das Inokulat erfolgt sein.

Im Gegensatz zur intrauterinen Inokulation von MNV-S99 konnte nach oraler Inokulation von MNV-S99 über Tag 7 hinaus Virusausscheidung nachgewiesen werden. Das könnte durch eine längere Verweildauer des Virus im Darm nach Inokulation auf oralem Wege zu erklären sein und damit, dass der Uterus nicht das für Noroviren zur Infektion von Zellen - Darmepithelzellen sind Eintrittspforte und Replikationsort von MNV [22] – bevorzugte Organ ist. Eine Ausscheidung könnte folglich aufgrund von fehlendem Tropismus zur Epitheloberfläche des Uterus schneller stattfinden.

Nach oraler Inokulation von MNV-4 konnten die stabilsten Ausscheidungs- und Serokonversionsdaten erhoben werden. Schon ab Tag 14 konnte bei der Hälfte der mit mindestens  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/Maus inokulierten Mäuse eine Serokonversion nachgewiesen werden und Mäuse, die mit mindestens  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/Maus inokuliert worden waren, schieden Virus mit dem Kot aus. Bis Tag 42 hatten 75% der Mäuse mit einer Inokulationsdosis von mindestens  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/Maus serokonvertiert. Ebenso viele Mäuse, damit weniger als an Tag 7, schieden zu diesem Zeitpunkt noch Virus aus. Die frühe Serokonversion könnte durch eine Reaktion des Immunsystems auf die sofortige Replikation - bei Mäusen, die serokonvertierten und Virus über einen längeren Zeitraum ausschieden - und durch eine Reaktion auf das Passagevirus - bei Mäusen, die serokonvertierten aber nicht bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes Virus ausschieden - hervorgerufen worden sein. Mäuse, die serokonvertierten aber nicht bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes Virus ausschieden, fanden sich bei den mit den zwei höchsten Inokulationsstufen inokulierten Mäusen, so dass wir annehmen, dass für eine Serokonversion, die nicht mit einer dauerhaften Replikation verknüpft ist, oral eine hohe Dosis von Virus verabreicht werden muss, im Fall von MNV-4 mindestens  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/Maus.

Nach intrauteriner Inokulation von MNV-4 konnte im Gegensatz zu MNV-S99 bis Tag 28 eine Ausscheidung des Virus ab einer Inokulationsdosis von  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/Maus nachgewiesen werden. Das Virus musste also vom Uterus in den Kot gelangt sein. Mögliche Erklärungen wären das Abschlecken des äußeren Genitale durch die Mäuse selbst und damit eine Passage durch den Darm oder die Kontamination des Kotes im Käfig durch die Ausscheidung des Virus aus dem Uterus. Da an Tag 42 nach intrauteriner Inokulation mit MNV-4 nur noch der Kot einer Maus aus der höchsten Inokulationsgruppe ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/Maus) positiv war, handelte es sich vermutlich um eine Serokonversion aufgrund

von Passagevirus, nicht jedoch um eine länger andauernde Replikation des Virus in der Maus. Das bestätigt unsere Beobachtungen, die wir nach intrauteriner Inokulation von MNV-S99 gemacht hatten. Die intrauterine Inokulation ist folglich zur Erzeugung einer Serokonversion geeignet, eine längerfristige Ausscheidung von Virus mit dem Kot aufgrund von Replikation ist jedoch nicht zu erwarten. Die orale Inokulation ist, abhängig vom verwendeten Virusstamm, denn MNV-4 wurde im Gegensatz zu MNV-S99 bis Tag 42 ausgeschieden, für die Erzeugung einer Replikation und damit einer Ausscheidung geeignet. Da MNV-4 zur Replikation führte, und sich damit als das nach oraler Inokulation infektiösere Virus der beiden herausstellte, wurde es für weitere Versuche verwendet.

### **V.3. MNV-4 Langzeitausscheidung**

Da der Test der Virusstämme MNV-S99 und MNV-4 nach 6 Wochen beendet worden war und sich MNV-4 als das infektiösere Virus, das auch zu diesem Zeitpunkt noch ausgeschieden wurde, herausstellte, interessierte uns die Ausscheidungsdynamik und die Quantität der Virusausscheidung über einen längeren Zeitraum. Mäuse wurden dreimal mit einer Virusdosis ( $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/Maus) oral inokuliert, von der wir uns, nach den Erfahrungen aus den Virustests, eine stabile Infektion versprochen. Daraufhin konnten wir über den ganzen Zeitraum von 40 Wochen Ausscheidung von Virus nachweisen.

Bis Woche 4 beobachteten wir einen starken Abfall der ausgeschiedenen Virusmenge von  $10^9$  auf  $10^6$  Kopien/Kotansatz/Maus. Nach vier Wochen pendelte sich die gemessene Virusmenge im Kot auf ein Niveau um  $10^6$  Kopien/Kotansatz/Maus ein. Wir hätten nach Ausscheidung des Inokulates einen Einbruch der gemessenen Kopien/Kotansatz erwartet, bevor die Replikation des Virus ein messbares Niveau erreicht hätte. Da diese Erwartung nicht eintraf und sich ein fließender Übergang zum Ausscheidungsniveau nach Woche 4 ergab, muss entweder die Replikation früher als erwartet ein messbares Niveau erreicht haben oder, wie schon im vorherigen Versuch beobachtet, das inokulierte Virus eine deutlich längere Darmpassage durchlaufen haben als bisher angenommen. Die Ausscheidungsdauer des hier eingesetzten Inokulates von vier Wochen bestätigt unsere Beobachtung, dass die Ausscheidungsdauer des Inokulates sich proportional zur Menge dessen verhält.

Obwohl bei jeder Einzelmaus Langzeitausscheidung über 40 Wochen nachgewiesen werden konnte, konnte bei jeder Maus zu mindestens einem Zeitpunkt vor Woche 36 keine Ausscheidung nachgewiesen werden, ab der 36. Woche wurde die Ausscheidung intermittierend. Bisher wurden noch keine Untersuchungen zur Langzeitausscheidung von MNV publiziert. Der längste Zeitraum, in dem die Ausscheidung von Murinem Norovirus untersucht worden war, war zwölf Wochen. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte eine stabile Ausscheidung bei mit MNV-4 infizierten Mäusen nachgewiesen werden [40].

Für die Diagnostik von MNV mit der RT-qPCR bedeuten unsere Ergebnisse, dass es eine Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse gibt, wenn der Infektionszeitpunkt der Mäuse nicht bekannt ist und sich die Mäuse in einer Phase der intermittierenden Ausscheidung befinden.

#### **V.4. Variabilität der Virusausscheidung**

Wie aber müsste Kot gesammelt werden, damit mit hoher Wahrscheinlichkeit dauerausscheidende Mäuse auch auffindig gemacht werden? Um diese Frage zu beantworten, wählten wir fünf Mäuse aus früheren Versuchen aus, die mindestens 15 Wochen, zum Teil deutlich länger, zuverlässig Virus ausgeschieden hatten und es nach wie vor taten. Eine Maus stammte aus obiger Studie zur Langzeitausscheidung und war damit schon über 40 Wochen Dauerausscheider.

Da wir in vorherigen Versuchen festgestellt hatten, dass auch Dauerausscheider negative Testergebnisse erzeugen können, fragten wir uns, wie Kotpellets gesammelt werden sollten, um falsch negative Befunde zu vermeiden. Wir sammelten stündlich den Kot jeder Einzelmaus und untersuchten diesen auf die Existenz von MNV. Da zu jedem Zeitpunkt sowohl hohe ( $>5,3 \cdot 10^5$  Kopien) als auch niedrige ( $<6,5 \cdot 10^4$  Kopien) Kopienzahlen gemessen wurden, konnten wir keine zyklische Wiederholung der Ausscheidungsdynamik erkennen. Somit scheint die ausgeschiedene Virusmenge innerhalb des untersuchten Zeitraumes nicht tageszeitabhängig zu sein. Allerdings sammelten wir nachts, in der höchsten Aktivitätsphase und damit möglicherweise auch der höchsten Ausscheidungsphase, keine Kotproben und können folglich dazu keine Aussage machen. Da der Kotabsatz eines Tages unabhängig gegenüber dem des darauffolgenden Tages ist, hatten wir 15 Datensätze (3 Tage á 5 Mäuse) pro Sammelzeitpunkt zur Verfügung. Aus diesen konnte statistisch berechnet werden, dass der Kot eines eineinhalbständigen Zeitraumes (1h 34min) untersucht werden muss, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% alle Dauerausscheider einer zu untersuchenden Mauseinheit zu finden. Schon bei Sammeln des Kotes nach 2 Stunden liegt die Wahrscheinlichkeit, alle Dauerausscheider zu erkennen, bei 97,75%.

In unserem Versuch handelte es sich ausschließlich um Dauerausscheider, es wurde allerdings in bisherigen Publikationen festgestellt, dass Feldvirus, um das es sich im Fall der Diagnostik im Rahmen eines Routine-Hygienemonitorings normalerweise handelt, im Gegensatz zu in der Zellkultur passagiertem Virus, eben diese Dauerausscheider produziert [15, 41].

Möchte man aus einer Anzahl von Mäusen, die alle beprobt werden können, Virusausscheider auffindig machen, können wir hiermit die Empfehlung geben, den Einzelkot der Mäuse nach mindestens zwei Stunden Kotabsatzzeit zu sammeln. Diese Empfehlung sollte für auf MNV im direkten Nachweis zu untersuchende Sentinels oder für

solche Versuchsmäuse, für die ein Frei sein von MNV besonders wichtig ist, angewendet werden.

## **V.5. Überprüfung von Murinem Norovirus über gebrauchte Einstreu, Ausscheidungsverhalten und Serokonversion**

### **V.5.1. MNV-4**

Um die Übertragung von MNV-4 auf Sentinels durch Kontakt mit MNV-4 kontaminierter schmutziger Einstreu zu untersuchen, wurde eine standardisierte Sentinelkolonie gezielt mit MNV-4 enthaltender Einstreu inokuliert.

Aufgrund einer Infektionsrate von maximal zwei von 80 als Sentinels eingesetzten Mäusen konnten wir unsere Fragen nach einer Abhängigkeit der Infektionsrate und der Infektionsschnelligkeit von Mausstamm und Alter, sowie nach dem optimalen Nachweiszeitraum für Serologie und RT-PCR nicht beantworten. Die Ergebnisse dieses Versuchs waren überraschend, da MNV-4 regelmäßig zu Serokonversion und Virausscheidung geführt hatte (V.3). Außerdem hatte im Vorversuch zumindest eine von zwei Mäusen nach Kontakt mit der in beiden Versuchen eingesetzten kontaminierten Einstreu kontinuierlich Virus ausgeschieden. Wir vermuteten, dass ein Zusammenhang zwischen Infektionsrate und Besatzdichte der Käfige bestehen könnte, denn in bis dato publizierten Studien wurden die Mäuse entweder in Gruppen gehalten [15, 40, 42] oder zur Haltung wurden gar keine Angaben gemacht. Unsere Mäuse waren jedoch, wie bei männlichen Sentinels üblich, einzeln gehalten worden. Im zweiten Teil der Studie wurden Mäuse deshalb in drei verschiedenen Besatzdichten der Käfige gehalten: Einzel-, Paar- und Gruppenhaltung mit vier Mäusen pro Käfig. Wir konnten mit insgesamt fünf Virausscheidern von 40 mit kontaminierter Einstreu in Kontakt gekommenen Mäusen zwar eine höhere Zahl an infizierten Sentinels nachweisen, ein relevanter Unterschied zwischen den Besatzdichten konnte aber nicht festgestellt werden. Die Besatzdichte scheint folglich nicht mit der Infektionsrate von Mäusen mit MNV in Zusammenhang zu stehen. Wir beobachteten aber, dass, wenn eine Infektion mit Ausscheidung und Serokonversion in einem Käfig stattfand, alle Mäuse des Käfigs betroffen waren. Auch in der bereits erwähnten Studie von Manuel et al. konnte das Virus innerhalb von 12 Wochen in vier von fünf Sentinelkäfigen nachgewiesen werden. Die Käfige waren dort jeweils mit Paaren besetzt und es waren entweder beide oder keine der beiden Mäuse mit MNV infiziert gewesen [40]. In (noch nicht publizierten) Feldversuchen konnten wir diese Beobachtung bezüglich der Serokonversion erneut bestätigen. Beim Screening einiger Reihen von Mäusen in unserer Maushaltung (V.6) war dieser Trend bezüglich der Ausscheidung allerdings nicht zu erkennen.



Die Ergebnisse zeigen deutlich einen weiteren Unsicherheitsfaktor für das Sentinelmonitoring. Nämlich eine nicht erfolgte Übertragung von MNV auf Sentinels, so dass MNV nicht nachgewiesen wird, obwohl die zu überwachenden Mäuse Virusausscheider sind. Die Sentinels wurden, wie die zu überwachenden Mäuse, in IVCs gehalten. Die Beobachtung, dass ein Virus nicht über Einstreu-Sentinels detektiert werden kann ist nicht neu. Auch die Übertragung von Maus Parvovirus [43] und Sendai Virus [6] auf Einstreu-Sentinels im IVC funktionierte nicht. Ob der Faktor Luft, der durch die Haltung in IVCs durch komplettes *Biocontainment* als Überträger von Pathogenen ausgeschlossen ist [43], eine Rolle für die Übertragung von MNV auf Sentinels spielt, kann in dieser Studie nicht beantwortet werden. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig.

### **V.5.2. Feldversuch Sentinelmonitoring**

Um nach diesen mit Laborvirus gewonnenen Daten, die darauf schließen lassen, dass Einstreu-Sentinels MNV nicht zuverlässig nachweisen, ein Vergleich zur Übertragungssituation unter Feldbedingungen zu erhalten, wurden zwölf einzeln in offenen Käfigen sitzende männliche CD-1 Wildtyp Sentinels aus dem laufenden Betrieb unserer Maushaltung über einen Standard-Monitoringzeitraum von zwölf Wochen (Untersuchung nach 13 Wochen) auf Serokonversion und Ausscheidung von Feld-MNV mit dem Kot untersucht. Es wurden außerdem die Methoden des Nachweises von Serokonversion als indirekte Methode und von Virusnachweis im Kot mittels RT-qPCR als direkte Methode bezüglich ihrer Übereinstimmung und Aussagekraft verglichen.

Von den zwölf Sentinels wurden am Ende des Untersuchungszeitraumes Acht positiv auf Serokonversion und Ausscheidung von MNV getestet, vier Sentinels blieben negativ. Nach acht und nach 13 Wochen zeigten die zwei Untersuchungsmethoden eine fast 100%ige Übereinstimmung. Es wurde lediglich ein Sentinel in Woche 8 serologisch positiv getestet, obwohl keine Ausscheidung mehr nachweisbar war. Diese Maus hatte jedoch bis inklusive Woche 7 Virus ausgeschieden, die Ausscheidung stoppte genau in der Woche der serologischen Untersuchung. Der in Woche 8 erhobene serologische Wert dieser Maus befand sich zudem knapp über dem Schwellenwert, weshalb auch der negative Befund aus Woche 13 nicht überraschte, der knapp unter dem Schwellenwert lag. Hatte sich nämlich, wie wir in allen bisherigen Versuchen beobachten konnten, eine deutliche Serokonversion von  $OD > 0,8$  ausgebildet, war diese immer bis zum Zeitpunkt der Präparation der Maus nachweisbar gewesen.

Es konnte in einem Fall ab Woche 1, in weiteren fünf Fällen ab Woche 3 eine Ausscheidung von MNV nachgewiesen werden. Eine Serokonversion zeigte sich dagegen frühestens in Woche 3 und das nur bei zwei der Sentinels. Der direkte Nachweis von MNV im Kot von Sentinels war also schneller als der serologische Nachweis mittels Serum. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Manuel et al., der zum gleichen Ergebnis kam [40]. Wie

wir mittlerweile auch in weiteren Versuchen mehrfach bestätigen konnten [unpublizierte Daten], wird MNV in einer positiven Mauskolonie durch die Untersuchung mit der RT-qPCR mittels Sentinels deutlich früher nachgewiesen, als durch die serologische Untersuchung.

In den Mesenteriallymphknoten von sechs der zwölf Sentinels konnte Murines Norovirus nachgewiesen werden. Fünf dieser sechs Sentinels hatten zum Zeitpunkt der Organentnahme serokonvertiert und Virus ausgeschieden. Bei einer Maus, nämlich dem oben erwähnten Sentinel, der ab Woche 8 aufgehört hatte MNV auszuschleiden, war zu diesem Zeitpunkt serologisch und in der RT-qPCR kein Virus mehr nachzuweisen. Der positive Nachweis im Lymphknoten gibt uns jedoch den Hinweis auf eine erfolgte Infektion, so dass sich daraus schließen lässt, dass auch Mäuse, die sich mit einem Feldstamm von MNV infizieren, nicht zwangsläufig mit einer deutlichen Serokonversion reagieren und Dauerausscheider werden. Nach Untersuchung aller Serumproben aus Woche 13 durch zwei unterschiedliche Labors mit verschiedenen immunologischen Nachweismethoden, dem ELISA und dem IFA, wurde eine Probe einmal als gering positiv und einmal als negativ gewertet. Ein Serologischer Nachweis hängt also im Falle einer geringen Antikörperkonzentration stark von Labor und Testmethode ab.

Wir konnten zeigen, dass sich positive Sentinels über den direkten Nachweis von MNV aus dem Kot schneller auffindig machen lassen als über den serologischen Nachweis, in einem Fall sogar schon in der ersten Untersuchungswoche. Für Mäuse, die in offenen Käfigen gehalten werden, sind sowohl die serologische Untersuchungen als auch der direkte Nachweis von MNV mittels RT-qPCR (sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Tests) sinnvolle Screeningmethoden für ein Routinemonitoring. Für Maushaltungen, die ein starkes Interesse am Frei sein ihrer Mäuse von MNV haben, wäre es trotzdem sinnvoll, Einzelmäuse zu screenen oder mehrmals innerhalb eines Screeningzeitraumes Kotproben der eingesetzten Sentinels zu untersuchen, um eine beginnende Infektion nicht zu übersehen. Sobald sich die Ergebnisse von Serumproben nahe dem Schwellenwert bewegen, sollte in jedem Fall noch einmal ein Referenztest durchgeführt werden. Trotzdem kann auch nach der erfolgten Infektion eines Sentinels mit MNV eine Serokonversion ausbleiben oder sich auf einem so niedrigen Niveau bewegen, dass sie nicht als solche erkannt wird.

### **V.5.3. Attenuierung von MNV**

Die Infektion der Sentinels in offenen Käfigen mit Feldvirus funktionierte sehr gut, Sentinels im IVC, die über die Einstreu mit Laborvirus in Kontakt gebracht worden waren, zeigten jedoch weder Serokonversion noch Ausscheidung. Ob die Ursache für ein Fehlen der Infektion nach Kontakt mit MNV-4 die Haltung im IVC, eine Attenuierung von MNV-4, oder beides war, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Bei dem von uns verwendeten MNV-4 handelte es sich um einen Laborstamm, der durch die Passage in der Zellkultur attenuiert sein könnte. Im Gegensatz zu Manuel et al., der Sentinels schon durch ein geringeres Volumen von 15cm<sup>3</sup> kontaminierter Einstreu mit MNV-4 infizieren konnte [40], infizierten sich bei uns schon im Vorversuch nur eine von zwei Mäusen mit einer Menge von 100cm<sup>3</sup> kontaminierter Einstreu. Die Konzentration von infektiösen Viruskopien in den beiden Volumina kontaminierter Einstreu ist jedoch nicht bekannt. Es könnte sich bei dem von Manuel et al. eingesetzten Volumen auch um höher konzentriertes Virus gehandelt haben oder das verwendete Virus war nicht so oft in der Zellkultur passagiert worden wie unseres. Schon in einer Studie von 2004 wurde durch serielle Passagen von MNV-1 in der Zellkultur eine Akkumulation von Mutationen und der Verlust der Virulenz festgestellt [13]. Auch Mumphrey et al. stellten fest, dass sich durch den Selektivdruck das Genom des Virus während der Passage in der Zellkultur verändert. Man konnte vier Positionen ausmachen, die eine Veränderung auf Aminosäureebene und damit eine Veränderung der Virulenz zweier Passageviren verursachten [22]. In einer weiteren Studie konnte keine Ausscheidung nach Infektion mit dem mehrfach in der Zellkultur passagiertem Virus MNV-1 nach Tag 2 nachgewiesen werden, im Gegensatz zu den Feldviren MNV-2, -3, und -4, bei denen auch noch Ausscheidung in Woche 8 nachweisbar war [15]. Die Viruspassage und die Anpassung des Virus an die Zielzellen (Organismus oder Zellkultur) scheint daher eine zentrale Rolle für das Infektionsverhalten dessen zu spielen.

Viren unterliegen durch Abwehrmechanismen des Wirtes, wie Antikörpern oder T-Zell Rezeptoren einem hohen Selektionsdruck. Um sich diesem zu entziehen, wechseln RNA-Viren, häufig durch ungenau arbeitende RNA-Polymerasen Sequenz und Struktur ihrer oberflächenexponierten Proteinregionen [44]. Auch die unterschiedlichen Stämme der Murinen Noroviren unterscheiden sich häufig durch zahlreiche Punktmutationen, die, je nachdem, wo auf dem Genom sie liegen, durch Veränderung der Proteinstruktur zu Veränderungen der Oberflächenstrukturen oder der Infektiösität generell führen können. Bei MNV ist der Übergang von ORF2 zu ORF3 die am wenigsten konservierte Region, die sich durch eine hohe Wahrscheinlichkeit für Punktmutationen in diesem Bereich auszeichnet [21]. Es wurde festgestellt, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure im VP1-Bereich (ORF2) von MNV-1 dazu führt, dass dieses nicht mehr durch Antikörper neutralisiert werden kann [45]. Auch Rekombinationen aus verschiedenen Virusstämmen sind möglich und führen zu einer Veränderung der Eigenschaften von Viren. Im Fall von MNV ist der vordere Bereich von ORF2 (Kapsidproteins VP1) besonders hoch konserviert, so dass dieser als Angriffspunkt für Rekombination dienen kann [21, 24].

In einer Studie von 2010 wurde ein rekombinanter MNV-Stamm aus einem Laborvirusstamm, der durch mehrere Passagen in der Zellkultur gegangen war, und einem Feldvirusstamm bezüglich seiner biologischen Eigenschaften in der Zellkultur mit den

Elternstämmen verglichen. Dabei stellte man fest, dass das rekombinante Virus länger intrazellulär verblieb als die Ursprungsstämme und folglich im Agar aufgrund der verzögerten Virusfreisetzung aus den Zellen kleinere Plaques bildete [46].

## **V.6. Virusisolierung aus der Tierhaltung**

Da wir zu dem sich in unserer Maushaltung befindenden Murinen Norovirus-Feldstamm außer den Daten zur Übertragung auf Einstreusentinels keine weiteren Informationen hatten, isolierten wir das Virus und vermehrten es in der Zellkultur. Für die Sequenzierung und für potentielle Infektionsversuche passagierten wir es zweimal. Um für die Isolierung virushaltigen Kot zu erhalten, screeneten wir einen Raum mit MNV-positiven Mäusen auf solche mit starker Virusausscheidung. Wir entschieden uns für den Sammelkot von zwei Dreiergruppen, die zu diesem Zeitpunkt hohe Kopienzahlen ausschieden. Die Kriterien zur Auswahl der Mäuse waren so gewählt, dass diese auch potentielle Träger des Maus Hepatitis Virus waren, da auch dieses isoliert werden sollte. Aufgrund dessen wurden zusätzlich zu der Gruppe aus Reihe 1/6, die den sich auf MNV beziehenden Kriterien der hohen MNV-Ausscheidung und der hohen Gruppengröße entsprach, noch drei Mäuse aus Reihe 3/3 ausgewählt. Diese entsprachen auch den sich auf MHV beziehenden Kriterien, es handelte sich nämlich um junge Mäuse. Es wurden die bakterienfrei filtrierte Kotüberstände beider Gruppen für die Anzucht von MNV verwendet. Die erste Passage des Überstandes U1, gewonnen aus dem Kot der Mäuse der Reihe 1/6, wurde für weitere Passagen ausgewählt. Dieses Isolat stellte sich als das für die Sequenzierung besser funktionierende heraus als das des Überstandes U2. Mit jeder Passage von U1 erhöhte sich dessen TCID<sub>50</sub>/ml von 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml im Überstand auf 10<sup>6,5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml nach der zweiten Passage.

Ob diese Verstärkung der mit jeder Zellkulturpassage erhöhten TCID<sub>50</sub> durch Anpassung an die in der Zellkultur herrschende Umgebung und damit eine potentielle Verminderung der Infektiosität im Tier (Diskussion siehe V.5.3), oder durch eine vermehrte Konzentrierung des Virus zustande kam, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Eine Konzentrierung von Virus während der Passage könnte durch unterschiedliche Bedingungen während der Zellkultur oder durch die Veränderung des Vermehrungszyklus des Virus selbst zustande gekommen sein. Das Wachstumsmedium wurde zwar in einer standardisierten Menge von 10ml zugegeben, die Zellen wurden jedoch nicht gezählt, sondern mikroskopisch eine Konfluenz der RAW-Zellen von 50% beurteilt und das Virus für die Vermehrung zugegeben. Das war ca. 24 Stunden nach Passage der Zellen der Fall. Damit war die Zellzahl nicht streng standardisiert und es ergaben sich geringfügig unterschiedliche Bedingungen für die Vermehrung des Virus. Waren mehr Zellen vorhanden, konnte in der gleichen Menge Medium, vorausgesetzt die Nährstoffe waren nicht der limitierende Faktor, mehr Virus vermehrt werden. Außerdem wurde bereits nachgewiesen,

dass in der Zellkultur verändertes MNV nach einer unterschiedlichen Zeitspanne aus den Zellen freigesetzt wird [46], wodurch sich Wachstumsverhalten und Vermehrungszyklus verändern können. Ein weiterer Hinweis auf eine Veränderung der Eigenschaften des Virus nach der zweiten Passage waren die im Vergleich zur  $TCID_{50}/ml$  stärker angestiegenen Kopien/Virusansatz. Das Verhältnis von Kopien/Virusansatz zu  $TCID_{50}/ml$  vergrößerte sich von  $10^4$   $TCID_{50}/ml$  zu  $10^6$  Kopien/Virusansatz, was einem Verhältnis von 100 entsprach, auf  $10^{6,5}$   $TCID_{50}/ml$  zu  $10^{12}$  Kopien/Virusansatz, was einem Verhältnis von ca.  $3 \cdot 10^5$  entsprach. Das ist ein Hinweis darauf, dass Partikel freigesetzt wurden, die in der PCR nachgewiesen wurden, für die Zellen jedoch nicht infektiös waren. Ob dies auch für die Infektiösität in der Maus gilt, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

### **V.7. Untersuchung der Organe inokulierter und natürlich infizierter Mäuse**

Der Embryotransfer war schon vor der Entdeckung von MNV im Jahre 2003 [1] eine weit verbreitete Methode zur hygienischen Sanierung von Mauskolonien [47]. Da MNV vor seiner Entdeckung und der Entwicklung der ersten Nachweismethoden [1] nicht getestet werden konnte, die Prävalenz des Virus in Maushaltungen aber sehr hoch war [19, 20], war es auch in kommerziell erhältlichen Mäusen enthalten. Trotzdem konnte in Einrichtungen wie unserer, deren Rezipienten auf Basis keimfreier Mäuse erzeugt worden waren, nach Entdeckung von MNV die Abwesenheit dieses Virus beobachtet werden [19]. Damit war klar, dass die hygienische Sanierung mittels des Embryotransfers bezüglich des Murinen Norovirus eine zuverlässige Methode sein musste, vorausgesetzt, man hatte die richtigen Rezipienten zur Verfügung.

Auch Perdue et al. konnte in einer Maushaltung, die 2002 eröffnet wurde, beobachten, dass diese nahezu MNV-frei gehalten werden konnte, indem nicht sicher MNV-freie Mäuse nur durch den Embryotransfer in die Einrichtung verbracht worden waren [42]. Außerdem beobachteten wir in unserer Maushaltung, dass auch bei nachweislich MNV-ausscheidenden Samenspendern die Nachkommen einer IVF frei von MNV waren.

Bisher wurden das Cross-Fostering [48, 49] und der Kaiserschnitt, mit der Untersuchung von Ovar und Uterus [50], als Methoden der Sanierung näher untersucht, nicht jedoch der Embryotransfer und die dafür wichtigen Nebenhoden des Männchens. Da die für den Embryotransfer und damit für eine potentielle Übertragung des Virus auf die Embryonen entscheidenden Organe die Ovarien des Weibchens und die Nebenhoden des Männchens sind, testeten wir diese in den folgenden Untersuchungen auf die Existenz von Murinem Norovirus. Sind diese Organe und damit Spermien und Oozyten Norovirus-frei, ist eine Übertragung über den Embryotransfer zumindest sehr unwahrscheinlich und eine Untersuchung der Embryotransfertechnik selbst erübrigt sich. Außerdem untersuchten wir je einen der Mesenteriallymphknoten, da diese den Sammelpunkt der den Darm (Eintrittsort

des Virus) drainierenden Lymphe darstellen und von den inokulierten Mäusen zusätzlich ein Stück der Caecumspitze, die für den Nachweis von MNV im Darm gut geeignet zu sein schien [41].

#### **V.7.1. Untersuchung der Organe von mit Laborvirus inokulierten Mäusen**

Mit MNV-S99 und MNV-4 inokulierte Mäuse aus den früheren Versuchen zur Testung des Virus (V.2) wurden bezüglich Serokonversion (vorhanden, nicht vorhanden) und Ausscheidung (Mäuse mit kontinuierlicher Ausscheidung bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 42, Mäuse bei denen Ausscheidung vor Ende des Untersuchungszeitraumes endete) in Gruppen von fünf bis sieben Mäusen eingeteilt: Die Gruppen wurden so gewählt, dass Mäuse, die ähnlich auf den Kontakt mit Norovirus reagierten einer Gruppe zugeteilt wurden. Damit sollte der immunologischen Reaktion des Organismus Rechnung getragen werden, nämlich der Bildung von Antikörpern (Serokonversion) und das Zulassen der Replikation des Virus in den Zellen (Ausscheidung über einen kurzen Zeitraum, in dem das Inokulat ausgeschieden wird, hinaus).

Bei Mäusen, deren Ausscheidung nur kurz dauerte, konnten trotzdem bis zu drei Wochen lang sehr niedrige Kopienzahlen im Kot nachgewiesen werden. Das ist vermutlich, wie bereits diskutiert (V.3), auf eine Ausscheidung des Inokulats zurückzuführen. Bei Mäusen, die bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes Virus ausschieden, konnten durchgängig Kopienzahlen von  $>10^4$  Kopien/Kotansatz [Daten nicht dargestellt] nachgewiesen werden. Die in Gruppen eingeteilten Mäuse waren mit verschiedenen Virusstämmen, nämlich mit MNV-S99 in der Gruppe 1 (Serologie positiv, Ausscheidung sistierte), mit MNV-4 in den Gruppen 2 (Serologie und Kot positiv) und 3 (Serologie negativ, Ausscheidung vorübergehend) und mit MNV-NH in den Gruppen 4 (Serologie und Kot positiv, ♂) und 5 (Kontrollen) in Kontakt gebracht worden, was einen Vergleich der Daten komplex macht.

Jedoch wurde bei allen Mäusen, die zum Zeitpunkt der Organentnahme im Kot positiv auf Murines Norovirus getestet wurden, auch das Caecum positiv getestet (Gruppen 2 und 4). Diese Übereinstimmung der Ergebnisse könnte sowohl auf die Existenz von Norovirus im Darmgewebe selbst als auch auf eine unzureichende Entfernung des Darminhaltes, was in unserem Fall durch Ausstreichen geschah, zurückzuführen sein. Aufgrund dessen wäre die Aussage über den Infektionsstatus des Darmes bei hohen Kopienzahlen im Kot irreführend. Bei späteren Organentnahmen wurde deshalb das Caecum nicht mehr zusätzlich zum Darmkot untersucht.

Bei Gruppe 3 - Mäuse die serologisch negativ getestet wurden aber eine zeitlang Virus ausschieden - wurden alle Organe negativ getestet. Bei drei der fünf Mäuse aus dieser Gruppe konnte bis Tag 42, dem Tag der Organentnahme, Ausscheidung nachgewiesen werden. Diese bewegte sich in einem niedrigen Bereich von  $10^4$  Kopien/Kotansatz [Daten nicht dargestellt]. Da sich die mit dem Kot ausgeschiedenen Kopienzahlen von Woche zu

Woche verringerten, bis Tag 42 keine Serokonversion nachzuweisen war, und kein Virus im Lymphknoten zu finden war, handelt es sich auch hier vermutlich um die Ausscheidung des Inokulats (V.3). Diese war im Caecum wahrscheinlich nur deshalb nicht nachzuweisen, weil das Entfernen des Darminhaltes durch Ausstreichen bei niedrigen Kopienzahlen im Kot ausreichend war, um zu einem negativen Ergebnis zu führen.

Bei einer Maus aus Gruppe 1 wurden alle Organe, inklusive des Ovars, positiv getestet. Da bei den übrigen Mäusen der Gruppe 1 alle Organe negativ getestet wurden und die Reproduktionsorgane aller übrigen getesteten Mäuse negativ waren, ist das vermutlich auf eine Verschleppung des Virus während der Organentnahme zurückzuführen. Da in Gruppe 1, der einzigen mit MNV-S99 inokulierten Gruppe von Mäusen, eine Ausscheidung nur kurzzeitig stattgefunden hatte, eine Serokonversion aber zu verzeichnen war, schien der Organismus mit dem Virus ausreichend in Berührung gekommen zu sein, um Antikörper zu bilden, das Virus schien sich aber - kein Nachweis von Virus in Darm oder Mesenteriallymphknoten - kaum oder gar nicht repliziert zu haben. Das würde dem Prinzip der Impfung mit inaktivierten attenuierten Erregern entsprechen. Dieses Verhalten des Virus konnten wir vor allem nach Inokulation mit MNV-S99, dem am stärksten attenuierten unter den uns zur Verfügung stehenden Viren, beobachten. Trotzdem kann vermutlich durch eine Serokonversion nach Infektion mit MNV eine erneute Infektion mit dem Virus nicht verhindert werden, da beim sehr eng verwandten Humanen Norovirus die Immunität stammspezifisch ist [51] und wir bei eigenen Versuchen beobachten konnten, dass Mäuse nach einer erneuten, einige Wochen später stattfindenden Inokulation des gleichen Virusstammes noch zu Virusausscheidern wurden.

In den Gruppen 2 und 4, die sowohl Virus zum Untersuchungszeitpunkt ausschieden als auch serokonvertiert hatten, wurden das Caecum positiv, alle Reproduktionsorgane dagegen negativ auf Murines Norovirus getestet. In der mit MNV-4 infizierten Gruppe (2) wurden die Mesenteriallymphknoten bei drei von sieben Mäusen, in der MNV-NH infizierten Gruppe (4) bei drei von fünf Mäusen positiv getestet. Die Reproduktionsorgane, nämlich die Ovarien der MNV-S99 und MNV-4 inokulierten Weibchen, sowie die Nebenhoden der mit MNV-NH natürlich infizierten Männchen, wurden, außer in einem oben genannten Fall, negativ auf Murines Norovirus getestet.

Um den Unterschied in der Prävalenz von MNV in den Mesenteriallymphknoten von mit verschiedenen MNV-Stämmen infizierten Mäusen und das Fehlen des Nachweises von Virus in den Reproduktionsorganen zu überprüfen, untersuchten wir in einem weiteren Versuch Mesenteriallymphknoten und Reproduktionsorgane von mit MNV-NH natürlich infizierten Mäusen.

**V.7.2. Untersuchung der Organe von mit Feldvirus natürlich infizierten Mäusen**

Um das Ergebnis der Organuntersuchungen von inokulierten Mäusen und unsere Annahme, dass das Murine Norovirus nicht in den für den Embryotransfer wichtigen Reproduktionsorganen zu finden ist, mit unter Feldbedingungen infizierten Mäusen zu untermauern, wurden von 21 Mäusen aus einem MNV positiven Bereich unserer Maushaltung der Blinddarmkot, die Reproduktionsorgane und jeweils ein Mesenteriallymphknoten mit der RT-qPCR untersucht. Die Mäuse waren unterschiedlichen Geschlechts, unterschiedlichen Alters und stammten aus unterschiedlichen Linien auf C57BL/6-Hintergrund. Zusätzlich standen uns die Daten von zwölf CD-1 Wildtyp Sentinels zur Verfügung. Acht der Sentinels waren Virusausscheider und konnten damit in die Auswertungen mit einbezogen werden. Die ausgewerteten Daten stammten also von Mäusen aus zwei unterschiedlichen Mausstämmen.

Die Mesenteriallymphknoten von 25 der 29 in die Studie aufgenommenen Mäuse wurden positiv getestet. Die Mesenteriallymphknoten der restlichen vier Mäuse wurden negativ getestet.

Bezüglich des Alters und des Geschlechts konnten keine signifikanten Unterschiede in der Nachweishäufigkeit von MNV im Mesenteriallymphknoten gefunden werden. Außer einer Studie, in der die Virusübertragung bei Mäusen unterschiedlichen Alters, nämlich bei vier oder acht Wochen alten Mäusen, untersucht worden war [40], sind uns dazu auch keine weiteren Publikationen bekannt.

Die Unterschiede in der MNV-Prävalenz im Mesenteriallymphknoten von Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund im Gegensatz zu CD-1 Wildtyp Mäusen waren mit 95,2% bzw. 62,5% deutlich, obwohl die Anzahl der CD-1 Mäuse mit 8 Tieren relativ niedrig war. Da es sich in einem Fall um transgene Mäuse, im anderen Fall um Wildtypen handelte, kann ein Einfluss durch das Transgen nicht ausgeschlossen werden. Bisher konnte nur bei Rag2<sup>-/-</sup>/Stat1<sup>-/-</sup> und Infαβγ<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen [1, 22] eine stark erhöhte Letalität im Gegensatz zu den Wildtypen festgestellt werden. Bei der Untersuchung von 18 Mauslinien verschiedener Genotypen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz von MNV bei immundefizienten, transgenen oder wildtyp Mäusen nachgewiesen werden [21]. In einer Studie von 2009 wurde zwar ein signifikanter Unterschied in der Infektionsschnelligkeit zwischen NOD-scid-Knockouts und deren Rückkreuzungen gefunden, allerdings war dieser bei einem untersuchten MNV-Stamm dahingehend signifikant, dass die Knockout-Mäuse schneller infiziert wurden, bei einem anderen untersuchten MNV-Stamm wurden dagegen die Rückkreuzungen schneller infiziert [41]. Das deutet eher auf eine Abhängigkeit vom MNV-Stamm, als auf eine Abhängigkeit von der Mauslinie hin.

Aus diesem Grund verglichen wir die Prävalenzen von MNV-NH und MNV-4 im Mesenteriallymphknoten MNV-ausscheidender Mäuse und konnten einen deutlichen



Unterschied nachweisen. Nach Infektion mit MNV-NH war bei 86,2% der Mäuse Virus im Mesenteriallymphknoten nachweisbar, nach Infektion mit MNV-4 nur bei knapp der Hälfte, nämlich bei 42,9% der Mäuse. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da der verwendete Laborvirusstamm MNV-4 im Gegensatz zum Feldvirusstamm MNV-NH eine deutlich verminderte Infektiosität in der Maus zeigt. In einer Publikation von 2006 wurden die Mesenteriallymphknoten aller Mäuse, die über einen Zeitraum von acht Wochen Murines Norovirus ausgeschieden hatten, in der PCR positiv auf MNV getestet [15]. Da es sich um Feldstämme handelte, bestätigt das eine hohe Prävalenz von MNV im Lymphknoten von mit Feldvirusstämmen infizierten Mäusen. Die stark unterschiedliche Prävalenz in den Mesenteriallymphknoten von MNV-5 und MNV-6 infizierten Mäusen [41] deckt sich mit unseren Ergebnissen, allerdings handelte es sich bei beiden Stämmen um Feldvirusstämme, die sich im Gegensatz zu den von uns getesteten MNV-Stämme nicht so deutlich in der Infektiosität unterscheiden.

Ein besonders herauszustellendes Ergebnis ist, dass von den 21 im Feld infizierten Virusausscheidern und den acht Virus ausscheidenden Sentinels alle untersuchten Ovarien und Nebenhoden negativ auf Murines Norovirus getestet wurden. Damit können wir unsere These, dass MNV nicht über den Embryotransfer übertragen wird, untermauern und eine Sanierung von Mauskolonien auf diesem Weg als gute Alternative zu Cross-Fostering und Kaiserschnittgeburt uneingeschränkt empfehlen.

## VI. Literaturverzeichnis

1. Karst, S.M., et al., *STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1575-8.
2. Chase, K., et al., *Murine norovirus, an intercurrent variable in a mouse model of bacterial-induced inflammatory bowel disease*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2007. **46**: p. 83.
3. Nicklas, W., *Implications of infectious agents on results of animal experiments. Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft fur Versuchstierkunde--Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS)*. Lab Anim, 1999. **33 Suppl 1**: p. S39-87.
4. Baker, D.G., *Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(2): p. 231-66.
5. Nicklas, W., et al., *Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units*. Lab Anim, 2002. **36**(1): p. 20-42.
6. Compton, S.R., et al., *Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack*. Comp Med, 2004. **54**(4): p. 382-92.
7. Hsu, C.C., C. Franklin, and L.K. Riley, *Multiplex fluorescent immunoassay for the simultaneous detection of serum antibodies to multiple rodent pathogens*. Lab Anim (NY), 2007. **36**(8): p. 36-8.
8. Smith, P.C., et al., *Reliability of soiled bedding transfer for detection of mouse parvovirus and mouse hepatitis virus*. Comp Med, 2007. **57**(1): p. 90-6.
9. Casebolt, D.B., B. Qian, and C.B. Stephensen, *Detection of enterotropic mouse hepatitis virus fecal excretion by polymerase chain reaction*. Lab Anim Sci, 1997. **47**(1): p. 6-10.
10. Hill, W.A., M.M. Randolph, and T.D. Mandrell, *Sensitivity of perianal tape impressions to diagnose pinworm (*Syphacia* spp.) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*)*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009. **48**(4): p. 378-80.
11. Scipioni, A., et al., *Animal noroviruses*. Vet J, 2008. **178**(1): p. 32-45.
12. Koch, J., et al., *[Norovirus infections in Deutschland]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2006. **49**(3): p. 296-309.
13. Wobus, C.E., et al., *Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages*. PLoS Biol, 2004. **2**(12): p. e432.
14. Wobus, C.E., L.B. Thackray, and H.W.t. Virgin, *Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5104-12.

15. Hsu, C.C., et al., *Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses*. *Comp Med*, 2006. **56**(4): p. 247-51.
16. Henderson, K.S., *Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice*. *Lab Anim (NY)*, 2008. **37**(7): p. 314-20.
17. Kim, M., et al., *Molecular characterization of murine norovirus isolates from South Korea*. *Virus Res*. **147**(1): p. 1-6.
18. Kim, J.R., et al., *Prevalence of Murine Norovirus Infection in Korean Laboratory Animal Facilities*. *J Vet Med Sci*, 2010(doi:10.1292/jvms.10-0226).
19. Mahabir, E., et al. *Prevalence of mouse norovirus (MNV) in a large breeding and experimental mouse facility in 10th FELASA Symposium*. 2007. Cernobbio, Italy
20. Mahler, M. and W. Kohl, *A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and Mycoplasma pulmonis in laboratory mice and rats in western Europe*. *Lab Anim (NY)*, 2009. **38**(5): p. 161-5.
21. Muller, B., et al., *Genetic diversity and recombination of murine noroviruses in immunocompromised mice*. *Arch Virol*, 2007. **152**(9): p. 1709-19.
22. Mumphy, S.M., et al., *Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses*. *J Virol*, 2007. **81**(7): p. 3251-63.
23. Manuel, C.A., et al., *Soiled bedding sentinel detection of murine norovirus 4 (MNV-4)*. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2006. **45**: p. 87.
24. Thackray, L.B., et al., *Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence*. *J Virol*, 2007. **81**(19): p. 10460-73.
25. Burton-MacLeod, J.A., et al., *Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(6): p. 2587-95.
26. Kitagawa, Y., et al., *Indirect ELISA and indirect immunofluorescent antibody assay for detecting the antibody against murine norovirus S7 in mice*. *Exp Anim*. **59**(1): p. 47-55.
27. Hsu, C.C., et al., *Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005. **12**(10): p. 1145-51.
28. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clin Chem*, 2009. **55**(4): p. 611-22.

29. Morrell, J.M., *Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice*. Lab Anim, 1999. **33**(3): p. 201-6.
30. Suzuki, H., et al., *Rederivation of mice by means of in vitro fertilization and embryo transfer*. Exp Anim, 1996. **45**(1): p. 33-8.
31. Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. J Mol Endocrinol, 2002. **29**(1): p. 23-39.
32. Bustin, S.A., *A-Z of Quantitative PCR*. 1 ed. IUL Biotechnology Series. 2004, La Jolla: International University Line. 882.
33. Kitajima, M., et al., *Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses*. J Virol Methods, 2010. **169**(2): p. 269-73.
34. Raines, R.T., *Ribonuclease A*. Chem Rev, 1998. **98**(3): p. 1045-1066.
35. Mukherjee, S., S. Vaishnava, and L.V. Hooper, *Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(19): p. 3019-27.
36. Apirion, D. and A. Miczak, *RNA processing in prokaryotic cells*. Bioessays, 1993. **15**(2): p. 113-20.
37. Manuel, C.A., et al., *Soiled bedding sentinel detection of murine norovirus 4 (MNV-4)*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2006. **45**: p. 87.
38. Compton, S.R. and L.K. Riley, *Detection of infectious agents in laboratory rodents: traditional and molecular techniques*. Comp Med, 2001. **51**(2): p. 113-9.
39. Henke-Gendo, C., et al., *New real-time PCR detects prolonged norovirus excretion in highly immunosuppressed patients and children*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(9): p. 2855-62.
40. Manuel, C.A., et al., *Soiled bedding sentinel detection of murine norovirus 4 (MNV-4)*. J Am Assoc Lab Anim Sci 2006. **45**: p. 87.
41. Kelmenson, J.A., et al., *Kinetics of transmission, infectivity, and genome stability of two novel mouse norovirus isolates in breeding mice*. Comp Med, 2009. **59**(1): p. 27-36.
42. Perdue, K.A., et al., *Naturally occurring murine norovirus infection in a large research institution*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2007. **46**(4): p. 39-45.
43. Brielmeier, M., et al., *Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: a field study*. Lab Anim, 2006. **40**(3): p. 247-60.
44. Modrow, S., et al., *Molekulare Virologie*. 3 ed. 2010: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 730.

45. Lochridge, V.P. and M.E. Hardy, *A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization*. J Virol, 2007. **81**(22): p. 12316-22.
46. Mathijs, E., et al., *Experimental evidence of recombination in murine noroviruses*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 11): p. 2723-33.
47. Nagy, A., et al., *Manipulating the Mouse Embryo*. 3 ed. 2003: John Inglis. 764.
48. Compton, S.R., *Prevention of murine norovirus infection in neonatal mice by fostering*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008. **47**(3): p. 25-30.
49. Artwohl, J.E., J.E. Purcell, and J.D. Fortman, *The use of cross-foster rederivation to eliminate murine norovirus, Helicobacter spp., and murine hepatitis virus from a mouse colony*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008. **47**(6): p. 19-24.
50. Goto, K., et al., *Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice*. Exp Anim, 2009. **58**(2): p. 135-40.
51. Parrino, T.A., et al., *Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent*. N Engl J Med, 1977. **297**(2): p. 86-9.

## VII. Anhang

### VII.1. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

#### Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 Empfohlene Mindestfrequenz des Monitorings und Stichprobengröße für Nagetier- und Kanincheneinheiten [5] .....	3
Tabelle 2 Verhältnis von Stichprobengröße zu Prävalenz [5] .....	3
Tabelle 3 TBE-Puffer: pH 8,3 .....	14
Tabelle 4 TE-Puffer: pH 7,4.....	14
Tabelle 5 Master Mix gel based PCR (Angaben in µl) .....	24
Tabelle 6 Temperaturprotokoll gel based PCR .....	25
Tabelle 7 Master Mix 1 <i>Real Time PCR (Agpath-ID™ One-Step RT-PCR Kit, Angaben in µl)</i> .....	26
Tabelle 8 Master Mix 2 <i>Real Time PCR (QuantiTect Probe RT-PCR Kit, Angaben in µl)</i> .....	26
Tabelle 9 Temperaturprotokoll <i>Real Time PCR</i> .....	26
Tabelle 10 Statistische Auswertung der DNA-Verdünnungsreihen.....	34
Tabelle 11 Vergleich der Cq Werte der RNA- mit denen der DNA-Standardkurve und Berechnung des Verhältnisses der Standards.....	37
Tabelle 12 Zusammensetzung der Verdünnungsreihe mit Kot .....	38
Tabelle 13 Berechnung des Hemmungsfaktors durch Einfluss von Kot auf MNV .....	39
Tabelle 14 Ausscheidung und Serokonversion nach oraler Inokulation mit verschiedenen Dosen von MNV-S99 .....	41
Tabelle 15 Ausscheidung und Serokonversion nach intrauteriner Inokulation mit verschiedenen Dosen von MNV-S99.....	42
Tabelle 16 Ausscheidung und Serokonversion nach oraler Inokulation mit verschiedenen Dosen von MNV-4.....	43
Tabelle 17 Ausscheidung und Serokonversion nach intrauteriner Inokulation mit verschiedenen Dosen von MNV-4 .....	44
Tabelle 18 Untersuchung der Kotproben von fünf Mäusen an drei Tagen .....	48
Tabelle 19 Titration der zur Infektion von Einstreu-Sentinels nötigen Menge kontaminierter Einstreu	53
Tabelle 20 Darstellung der Versuchsgruppen zum Inokulationsversuch Sentinelmonitoring Teil1 .....	54
Tabelle 21 Ausscheidung von murinem Norovirus nach Kontakt mit MNV-4 infizierter Einstreu .....	55
Tabelle 22 Serokonversion von Sentinels nach Kontakt mit MNV-4 infizierter Einstreu.....	55
Tabelle 23 Darstellung der Versuchsgruppen zum Inokulationsversuch Sentinelmonitoring Teil2 .....	56
Tabelle 24 Ausscheidung von murinem Norovirus nach Kontakt mit MNV-4 infizierter Einstreu .....	56
Tabelle 25 Serokonversion von Sentinels nach Kontakt mit MNV-4 infizierter Einstreu.....	57
Tabelle 26 Darstellung der Ergebnisse des Feldversuchs Sentinelscreening .....	61
Tabelle 27 Ergebnisse der Organentnahme sowie Kot- und Serologieergebnisse am Ende des Untersuchungszeitraumes .....	63
Tabelle 28 Quantifizierung der Passagen von MNV-Neuherberg .....	66

Tabelle 29 Gruppeneinteilung der Organspender nach Ausscheidungsverhalten und Serokonversion. .....	67
Tabelle 30 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV.....	69
Tabelle 31 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV.....	69
Tabelle 32 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV.....	69
Tabelle 33 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV.....	69
Tabelle 34 PCR-Ergebnisse der Organuntersuchungen auf MNV.....	70
Tabelle 35 Real Time PCR PCR Ergebnisse der Organe von 21 zufällig ausgewählten Mäusen aus einem MNV-positiven Bereich der Tierhaltung.....	70
Tabelle 36 Real Time PCR PCR Ergebnisse der Organe von acht Sentinels, die MNV ausschieden.	71

**Abbildungsverzeichnis:**

Abbildung 1 Einteilung der Caliciviridae .....	6
Abbildung 2 Immunofluoreszenzassay .....	8
Abbildung 3 Genomaufbau des Murinen Norovirus [24] .....	9
Abbildung 4 IFA: Mikroskopische Aufnahme der spezifischen Immunfluoreszenz im Zytoplasma von MNV-infizierten Kulturzellen nach Markierung mit Fluoreszein-gekoppelten spezifischen Immunglobulinen (Konjugat). Nicht infizierte Zellen sind rot gefärbt. Quelle: <a href="http://biodoc-online.de/spektrum.html">http://biodoc-online.de/spektrum.html</a> mit freundlicher Genehmigung .....	10
Abbildung 5 Prinzip der TaqMan®Sonde .....	12
Abbildung 6 Bestimmung von Quantifikationszyklus (Cq, links) und Standardkurve (rechts) .....	13
Abbildung 7 Erstellung einer Verdünnungsreihe von MNV-S99 zur oralen und intrauterinen Inokulation und von MNV-4 zur oralen Inokulation .....	18
Abbildung 8 Erstellung einer Verdünnungsreihe von MNV-4 zur intrauterinen Inokulation .....	18
Abbildung 9 Bestimmung des Zytopathischen Effekts durch Inkubation und anschließender Beurteilung der Verdünnungsreihe auf einer 96-well Platte .....	23
Abbildung 10 Berechnung des Umrechnungsfaktors .....	28
Abbildung 11 Festlegung des <i>Threshold</i> durch Vergleich positiver (a) und negativer (b) Proben.....	32
Abbildung 12 Amplifikationskurve der Verdünnungsstufen des Standards, <i>Threshold</i> von 0,20 .....	32
Abbildung 13 Standardkurve: Ansicht der oben genannten Verdünnungsreihe des Standard (Abbildung 12).....	33
Abbildung 14 Vergleich von zwölf Verdünnungsreihen des Standards aus sechs qRT-PCR Läufen ..	33
Abbildung 15 Vergleich der Cq Werte der RNA- (oben) mit denen der DNA-Standardkurve (unten) (Ansicht 7500System v 1.2.2 Software).....	36
Abbildung 16 Vergleich der Cq Werte der RNA- mit denen der DNA-Standardkurve (lineare Ansicht)	37
Abbildung 17 Darstellung der Verdünnungsstufen mit und ohne Kotpellets.....	39
Abbildung 18 Menge der Virusausscheidung in log.....	46
Abbildung 19 Gesamtzahl der Mäuse (rot) im Vergleich zu den Virus ausscheidenden Mäusen (grün) über einen Zeitraum von 40 Wochen.....	46
Abbildung 20 Anteil der Mäuse, die innerhalb einer Stunde positiv auf Virusausscheidung getestet wurden. ....	48
Abbildung 21 Anzahl der von jedem Einzeltier ausgeschiedenen Kotpellets innerhalb einer Stunde am Beispiel eines Tages.....	49
Abbildung 22 Anzahl der in der RT-qPCR gemessenen Kopienzahl/Kotansatz innerhalb einer Stunde am Beispiel eines Tages.....	50
Abbildung 23 Anzahl der Kopien/Kotansatz, die von einem Tier an einem Tag zwischen 8.00 Uhr und 16.00 Uhr durchschnittlich pro Stunde ausgeschieden wurden. ....	51
Abbildung 24 Blut-, Kot-, und Organentnahmeintervalle .....	59
Abbildung 25 Einteilung in schwache (+) und starke (++) Virususscheider .....	59
Abbildung 26 Darstellung der in der Kot PCR sowie im Immunfluoreszenzassay positiv getesteten Mäuse .....	62



Abbildung 27 Anzahl Viruskopien in Sammelkotproben .....	65
Abbildung 28 Anzahl Viruskopien in Einzeltierkotproben .....	66
Abbildung 29 Nachweis von MNV Neuherberg in den Organen MNV-ausscheidender Mäuse .....	72
Abbildung 30 Nachweis von MNV Neuherberg in den Organen MNV-ausscheidender Mäuse .....	72
Abbildung 31 Nachweis von MNV in den Organen MNV-ausscheidender Mäuse .....	73

VII.2. Abkürzungsverzeichnis:

<b>C</b>	<b><i>concentration</i></b>
<b>C57BL/6</b>	<b>Mausstamm</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>Kohlendioxid</b>
<b>Cq</b>	<b><i>Quantification Cycle</i></b>
<b>CrI:CD1(lcr)/Dcm</b>	<b>Mausstamm</b>
<b>cRNA</b>	<b><i>Complementary RNA</i></b>
<b>Ct</b>	<b><i>Threshold Cycle</i>, entspricht Cq</b>
<b>Da</b>	<b>Dalton</b>
<b>DMEM</b>	<b><i>Dulbecco's minimum essential medium</i></b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>dNTP</b>	<b>Desoxynukleosidtriphosphat</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiamin-Tetraessigsäure</b>
<b>ELISA</b>	<b><i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i></b>
<b>FELASA</b>	<b><i>Federation of Laboratory Animal Science Associations</i></b>
<b>FKS</b>	<b>Fetales Kälberserum</b>
<b>FRET</b>	<b><i>Fluorescence resonance energy transfer</i></b>
<b>ET</b>	<b>Embryotransfer</b>
<b>GI-V</b>	<b>Genotypen I bis V</b>
<b>HI</b>	<b>Hämagglutinationstest</b>
<b>hpi</b>	<b><i>hours post infection</i></b>
<b>IBD</b>	<b><i>Inflammatory Bowel Disease</i></b>
<b>IFA</b>	<b>Immunfluoreszanz Assay</b>
<b>Inf<math>\alpha\beta</math></b>	<b>Interferone <math>\alpha\beta</math></b>
<b>ip</b>	<b>intraperitoneal</b>
<b>iu</b>	<b>intrauterin</b>
<b>IVC</b>	<b><i>Individually Ventilated Cage</i></b>
<b>IVF</b>	<b>In-Vitro-Fertilisation</b>
<b>kb</b>	<b>Kilobasen</b>
<b>log</b>	<b>Logarithmus</b>
<b>m/s</b>	<b>Meter pro Sekunde</b>
<b>MesLy</b>	<b>Mesenteriallymphknoten</b>
<b>MFI</b>	<b><i>Multiplex Fluorescent Immunoassay</i></b>
<b>MIQE</b>	<b><i>Minimum Information for Publication of</i></b>

	<b><i>Quantitative Real Time PCR Experiments</i></b>
<b>MNV</b>	<b>Murines Norovirus</b>
<b>MW</b>	<b><i>molecular weight</i></b>
<b>NaCl</b>	<b>Natriumchlorid</b>
<b>OD</b>	<b><i>optical density</i></b>
<b>ORF</b>	<b><i>Open reading frame</i></b>
<b>p.i.</b>	<b>post infectionem</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerasekettenreaktion</b>
<b>PFU</b>	<b><i>Plaque Forming Units</i></b>
<b>RADIL</b>	<b><i>Research Animal Diagnostic Laboratory</i></b>
<b>Rag2</b>	<b><i>Recombination-activating gene 2</i></b>
<b>RKI</b>	<b>Robert Koch Institut</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribonukleinsäure</b>
<b>rpm</b>	<b><i>Rounds per minute</i></b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion</b>
<b>RT-qPCR</b>	<b>Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion</b>
<b>Sp6</b>	<b>RNA-Polymerase</b>
<b>Spp.</b>	<b>species pluralis</b>
<b>ssRNA</b>	<b><i>single stranded RNA</i></b>
<b>Stat1</b>	<b><i>Signal transducer and activator of transcription 1</i></b>
<b>std.dev.</b>	<b><i>standard deviation</i></b>
<b>Taq</b>	<b>Thermus aquaticus</b>
<b>TBE (Puffer)</b>	<b>Tris-Borsäure-EDTA-Puffer</b>
<b>TCID<sub>50</sub></b>	<b><i>Tissue Culture Infectious Dose 50</i></b>
<b>TE (Puffer)</b>	<b>Tris-EDTA-Puffer</b>
<b>U1</b>	<b>Überstand 1</b>
<b>U2</b>	<b>Überstand 2</b>
<b>V</b>	<b>Volumen</b>
<b>VP1</b>	<b><i>Viral protein 1</i></b>
<b>vs.</b>	<b>versus</b>
<b>Xba I</b>	<b>Restriktionsendonuklease</b>
<b>ZPE</b>	<b>Zytopathischer Effekt</b>

## VIII. Zusammenfassung

Das Murine Norovirus ist ein seit 2003 bekanntes Pathogen in Mäusen, dessen Einfluss auf die mit Mäusen erhobenen Forschungsergebnisse noch nicht hinreichend bekannt ist. Aufgrund dessen werden seit einigen Jahren Maushaltungen auf eine Infektion mit MNV untersucht.

In dieser Arbeit wurde ein *Real Time PCR*-Verfahren (RT-qPCR) für den Nachweis von Murinem Norovirus im Kot etabliert und verifiziert. Es wurde getestet, wie sich zwei Laborvirus-Stämme in der Maus verhalten, ob diese über längere Zeit ausgeschieden werden und wie Proben optimalerweise gesammelt werden, um möglichst wenige Virusausscheider zu übersehen. Um die reale Lage im Feld beurteilen zu können, wurde, zusätzlich zum serologischen Routinemonitoring, die Virusausscheidung von Sentinels aus unserer Maushaltung quantifiziert sowie das Feldvirus aus unserer Maushaltung isoliert und angezüchtet. Es wurde die Effizienz des Nachweises von Virus im Kot per RT-qPCR für das Hygienemonitoring überprüft. Außerdem wurde die Hypothese, dass der Embryotransfer eine sichere Methode für die Sanierung von MNV ist, experimentell verifiziert.

Für unsere Untersuchungen zu MNV etablierten wir, im Gegensatz zu den bisher mit DNA-Standards durchgeführten Assays, einen mit RNA-Standard durchgeführten RT-qPCR-Assay, der den natürlichen Gegebenheiten des Einzelstrang-RNA-Virus besser entspricht, und validierten diesen entsprechend der MIQE Richtlinien.

Mit dieser Nachweismethode wurde die Ausscheidung von zwei Laborvirusstämmen, MNV-S99 und MNV-4 nach oraler und intrauteriner Inokulation getestet. Nach intrauteriner Inokulation mit MNV stellten wir zwar eine Serokonversion durch Passagevirus fest, es fand jedoch keine Replikation statt. Nach oraler Inokulation von MNV-4 war sowohl Ausscheidung von Inokulat als auch Replikation vorhanden. Die Ausscheidung des Inokulats dauerte, je nach Inokulationsdosis jedoch länger als erwartet, nämlich zwei bis vier Wochen. Nach Untersuchung der Langzeitausscheidung von MNV-4 war klar, dass dauerausscheidende Mäuse intermittierend Virus ausscheiden können, so dass eine Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse beim Hygienemonitoring gegeben ist. Wird der Kot der zu untersuchenden dauerausscheidenden Mäuse jedoch über mindestens zwei Stunden gesammelt, ist die Wahrscheinlichkeit, alle Dauerausscheider zu finden, trotzdem fast 98%.

Wir beobachteten, dass die Übertragung von MNV auf Einstreu-Sentinels in *IVCs* nicht zuverlässig ist und damit diese Methode für ein Hygienemonitoring in Haltungen mit *IVCs* bezüglich ihrer Aussagekraft fraglich ist. In Bereichen mit offenen Käfigen funktionierte das Monitoring mit Einstreu-Sentinels dagegen sehr gut. Der direkte Nachweis von Virus im Kot der Sentinels stellte sich als der schnellere heraus (bei einer Maus schon ab der ersten Woche) als der Nachweis der Serokonversion (frühestens Woche 3). Sowohl der indirekte

als auch der direkte Virusnachweis sind für Bereiche mit offenen Käfigen als Routinemonitoring somit gut geeignet. Trotzdem sind, wenn ein besonderes Interesse an einem Frei sein der Mäuse von MNV besteht, zusätzliche Untersuchungen vor Beendigung des Untersuchungszeitraumes zu empfehlen, um schon eine beginnende Infektion zu erkennen.

Für die Hygienesanierung von Maushaltungen werden verschiedene Methoden angewandt. Eine für viele Pathogene erfolgreiche Methode ist der Embryotransfer, dessen Zuverlässigkeit bezüglich MNV bisher nicht getestet wurde. Wir konnten unsere Vermutung, dass dieser auch für die Sanierung von MNV eine sichere Methode ist, untermauern, indem wir die dafür wichtigen Organe von Mäusen, Ovar und Nebenhoden, auf MNV untersuchten und kein Virus, weder Labor-, noch Feldvirus, in Ovar und Nebenhoden von infizierten Mäusen fanden. Der Embryotransfer wird daher von uns uneingeschränkt zur Sanierung von MNV empfohlen.

## IX. Summary

Murine Norovirus is a pathogen in mice that has been known since 2003. Its influence in research findings collected with mice is not sufficiently known by date. On that account mouse colonies have been tested for infection with MNV for a couple of years.

In this thesis we established a RT-qPCR Assay for detection of MNV from feces and verified it thoroughly. We investigated the biology of two laboratory MNV strains in mice. The period of shedding and ideal sample collection were investigated. To evaluate circumstances in a field trial, virus shedding of sentinels from our mouse husbandry was quantified additional to serologic routine monitoring and field virus was isolated and propagated. Efficiency of virus detection in feces with RT-qPCR was evaluated. Embryo transfer as a secure method for rederivation from MNV was verified experimentally.

For our examinations we established a RT-qPCR assay in contrast to formerly assays carried out with a DNA-standard, conducted with a RNA-standard which equates natural circumstances and validated it according to MIQE guidelines.

With this detection method shedding of two MNV-strains, namely MNV-S99 and MNV-4, was tested after oral and intrauterine inoculation. We were able to demonstrate a seroconversion in consequence of intrauterine inoculation of MNV caused by transit virus, but not by replication. After oral inoculation of MNV-4 we demonstrated the existence of replication and therefore excretion of the virus. Shedding of the virus continued, depending on inoculation dosage, longer than expected, namely two to four weeks. After examination of long time shedding we discovered mice shedding for a long time period would shed virus intermittently, hence there is a chance for false negative results. If collecting the feces of mice to be tested after two hours of shedding, the chance to find all mice having shed for a long time is almost 98%.

We found out, that transmission of MNV on dirty bedding sentinels in *IVCs* is not reliable; consequently this method is questionable for monitoring of *IVCs*. In contrast monitoring by dirty bedding sentinels works very well for open cages. Direct detection of virus in feces of sentinels (in one mouse already in the first week) turned out to be faster than detection of seroconversion (at the earliest in week three). For this kind of husbandry direct as well as indirect detection of virus is an adequate method for routine monitoring. If being particularly interested in having MNV-free mice, additional examinations before the end of examination period would be recommended to identify initial shedding already.

One method to eliminate pathogens is embryo transfer technique. This technique has not been tested for MNV until now. Therefore, we tested important organs, ovaries and epididymis, for MNV and didn't find any virus in the organs of infected mice, neither

laboratory nor natural virus. We recommend embryo transfer technique without reservations for rederivation from MNV.

## **X. Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die, auf welche Weise auch immer, zum Erfolg dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuallererst Prof. Dr. Jörg Schmidt, der mir die Arbeit in seiner Abteilung ermöglicht hat und nicht nur jederzeit mit wissenschaftlichem Rat zur Seite stand, sondern auch menschlich eine wunderbare Stütze war.

Außerdem Prof. Dr. Bernhard Aigner, meinem Doktorvater, der mit seiner klaren und strukturierten Art der Kritik an der Arbeit maßgeblich zum erfolgreichen Gelingen dieser beigetragen hat.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Betreuern PD Dr. Markus Brielmeier und PD Dr. Esther Mahabir-Brenner am Helmholtz-Zentrum zukommen lassen. Sie haben mich, jeder auf seine besondere Art und Weise gelehrt, wissenschaftlich zu denken und Dinge aus verschiedenen Blickwinkeln zu betrachten. Dr. Brielmeier möchte ich zusätzlich für die konstruktive Kritik und eine klare Linie, sowie das Vertrauen in meine Arbeit, danken.

Nicht wegzudenken sind meine ehemalige Bürokollegin Diana Bulian und meine aktuelle Bürokollegin Annalena Riedasch, ohne die ich so manche Durststrecke nicht überstanden hätte. Auch meinen übrigen Arbeitskolleginnen und –kollegen möchte ich danken, die alle jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders zu erwähnen sind Julia Kaerlein und Saskia Ettl, die mir im ersten Jahr viel zur Hand gingen.

Ich möchte außerdem die gute Zusammenarbeit mit meiner Mit-Doktorandin Christine Moll erwähnen. Durch zahlreiche rege Diskussionen (zumeist, aber nicht immer wissenschaftlich) hat unsere wissenschaftliche Arbeit sehr an Ideen und Qualität gewonnen.

Ramona Böhm möchte ich für das Durchlesen und die engagierte Kritik der Arbeit danken, Dr. Angelika Scheideler für die endlose Geduld mit meinen Fragen zur Word-Formatierung und Dr. Michaela Aichler für die moralische Unterstützung und das jederzeit offene Ohr.

Außerdem möchte ich Dr. Jeff Needham, dessen Labor in Kooperation endlose Mengen an serologischen Proben für uns untersucht hat, danken, sowie Dr. Robert Livingston und Dr. Birthe Müller für das zur Verfügung stellen der MNV-Stämme MNV-4 und MNV-S99.

Zur allerletzt aber eigentlich am meisten möchte ich meiner Familie danken, meinen Eltern meinem Ehemann und meinem Sohn. Sie haben immer an mich geglaubt und mich bei allem unterstützt, was ich mir vorgenommen hatte, mein Sohn Simon vor allem dadurch, dass er mich auch in den verrücktesten Zeiten immer auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt hat.