

Zoonotische Pockenviren

Von Dr. Sandra Essbauer und Dr. Martin Pfeffer

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin,
WHO-Center für vergleichende Virologie,
Konsiliarlabor für Pockenviren,
Tiermedizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München,
Veterinärstr. 13, 80539 München
Tel. 089/21802028; Fax 089/21802595
E-mail: Sandra.Essbauer@micro.vetmed.uni-muenchen.de

<u>Gliederung</u>	<u>Seite</u>
1. Einleitung	2
Tab. I: Taxonomie der Subfamilie Chordopoxvirinae der <i>Poxviridae</i>	3
2. Orthopockenviren (OPV)	4
Abb. Ia: Aufbau eines Pockenviruspartikels	4
Abb. Ib: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Orthopockenviren.	4
Tab. II: Biologische Eigenschaften der zoonotischen OPV	5
2.1. Variola (<i>Variola major</i>; <i>Variola minor</i> [Alastrim])	6
2.2. Affenpockenviren	7
2.3. Vacciniavirus	8
2.4. Kuhpockenviren	10
2.5. Impfung und Therapie	11
3. Parapockenviren	13
3.1. Parapockenviruspezies	15
4. Diagnostik	16
5. Aktuelle Fälle	16
Tab. III: Diagnostische Methoden und Untersuchungen im Konsiliarlabor für Pockenviren	20
6. Einblicke in derzeitige Forschungsschwerpunkte	21
7. Literatur	21

1. Einleitung

Der Begriff „Pocken“ hat in neuerer Zeit wieder Bedeutung erlangt durch eine oft sehr emotionale geführte Diskussion über die Verwendung von Variolavirus als biologische Waffe bei Terroranschlägen oder gar Kriegshandlungen. Im Gefolge der Ereignisse des letzten Jahres, sind international wie national vielschichtige Bestrebungen im Gange, derartigen Ereignissen im Vorfeld zu begegnen, bzw. schnell und effektiv auf solche reagieren zu können.

Es ist generell schwer zur Versachlichung einer Diskussion beizutragen, die aufbaut auf eventuellen Szenarien, die sich nach derzeitigem Wissenstand einer faktischen Grundlage entziehen. Wir wollen uns in diesem Beitrag auch nicht einreihen in die Gruppe derer, die begründeten Anlass zu haben scheint, Millionen Dosen Impfstoff gegen die gefürchteten originären Menschenpocken zu beschaffen. Unser Anliegen ist es einen Überblick über sämtliche zoonotischen Pockenviren aus Sicht des Konsiliarlabors für Pockenviren zu geben. Ungeachtet der oben angesprochenen Diskussion, hoffen wir hiermit auch Antworten auf viele der Fragen geben zu können, die im Zusammenhang mit Infektionen zoonotischen Pockenviren immer wieder an uns gestellt werden.

Sämtlich Viren der Familie *Poxviridae* sind pleomorphe behüllte große Viren (ca. 140-450 nm) mit einem linearen doppelsträngigen DNS-Genom, das zwischen 130-300 kbp groß ist und für etwa 200 Gene codiert. Die Genomenden sind kovalent geschlossen (terminal hair pins) und beinhalten sogenannte ITRs, „inverted terminal repeats“. Pockenviren replizieren im Zytoplasma. Eine ausführliche Beschreibung der Replikation ist den Lehrbüchern (z.B. Moyer et al., 2000) oder auch auf der Internetseite unseres Institutes zu entnehmen (<http://www.vetmed.uni-muenchen.de/micro/pocken.pdf>).

Die meisten für die Replikation der Pockenviren essentiellen Gene liegen in der Genommitte, an den Enden sind Proteine kodiert, die für die Interaktion mit dem Wirt wichtig sind z.B. immunmodulatorische Proteine. Nach der derzeit gültigen Virus-Taxonomie (Moyer et al., 2000) werden bei den *Poxviridae* zwei Subfamilien mit insgesamt elf Genera unterschieden, wobei Viren der Subfamilie Chordopoxvirinae nur bei Wirbeltieren und die der Entomopoxvirinae nur bei Insekten vorkommen. Die taxonomische Einteilung der Chordopoxvirinae ist in Tab. I aufgelistet.

Einige Vertreter aus den Genera Orthopocken-, Parapocken- und Yatapockenvirus sind virale Zoonose-Erreger, d.h. sie können Mensch und Tier gleichermaßen infizieren. Im folgenden werden einige Spezies der Pockenviren vorgestellt die Zoonoseerreger sind bzw. mit denen wir uns u.a. im Konsiliarlabor für Pockenviren aus wissenschaftlichem und diagnostischem Interesse beschäftigen.

Tab. I: Taxonomie der Subfamilie Chordopoxvirinae der *Poxviridae* (Moyer et al., 2000)

Genera	Typspezies	Spezies (Synonyme, Subspecies)	Vorläufige Spezies
Orthopoxvirus	Vacciniavirus	Kamelpockenvirus Kuhpockenvirus Ectromeliavirus (syn. Mauspockenvirus) Affenpockenvirus Waschbärpockenvirus Taterapockenvirus Variolavirus Vacciniavirus (ssp. Büffel-, Kaninchenpockenvirus) Wühlmauspockenvirus	Stinktierrechpockenvirus Uasin Gishu Krankheit-Virus
Parapoxvirus	Orfvirus	Bovines populäres Stomatitisvirus Orfvirus (syn. Kontagiöses Ectyima-, Kontagiöses pustuläres Dermatitisvirus) Pseudokuhpockenvirus (syn. Paravaccinia-, Melkerknotenvirus) Parapockenvirus des neuseeländischen Rotwildes Parapockenvirus der Eichhörnchen	Auzduk Krankheit-Virus Kontagiöses Ectymavirus der Gemse Seehundpockenvirus
Avipoxvirus	Geflügelpockenvirus	Kanarienspockenvirus Geflügelpockenvirus Juncopockenvirus Taubenspockenvirus Mynahpockenvirus Psittaceenspockenvirus Wachtelpockenvirus Starpockenvirus Sperlingpockenvirus Truthahnpockenvirus	Krähenpockenvirus Pflugpockenvirus Pinguinpockenvirus
Capripoxvirus	Schafpockenvirus	Ziegenpockenvirus Lumpy skin Krankheit-Virus Schafpockenvirus	-
Leporipoxvirus	Myxomavirus	Hare Fibromavirus Myxomavirus Kaninchenfibromavirus (syn. Shope fibroma Virus) Eichhörnchenfibromavirus	-
Suipoxvirus	Schweinepockenvirus	Schweinepockenvirus	-
Molluscipoxvirus	Molluscum contagiosum Virus	Molluscum contagiosum Virus	Unbenannte Viren von Pferd, Esel, Schimpanse
Yatapoxvirus	Yaba Affentumorvirus	Tanapoxvirus Yaba Affentumorvirus	-

2. Orthopockenviren (OPV)

Morphologisch gleichen sich alle OPV. Sie haben einen komplexen Aufbau, der sich als ca. 200-250 nm x 300-350 nm backsteinförmiges Partikel mit unregelmäßiger Oberflächenstruktur darstellt. Elektronenmikroskopisch sind die Orthopockenviren nicht von aviären Pockenviren zu unterscheiden. Dahinter verbirgt sich das biconcave oder zylindrische Core mit einem Nucleoprotein-Komplex. Es verpackt als Nukleokapsid die DNA und ist vom Lateralkörper umgeben ist (Abb. I). Die Genomorganisation der OPV, d.h. Aufbau und Verteilung diverser Gene, ist sehr ähnlich (Esposito & Fenner, 2001).

Abb. Ia: Aufbau eines Pockenviruspartikels.

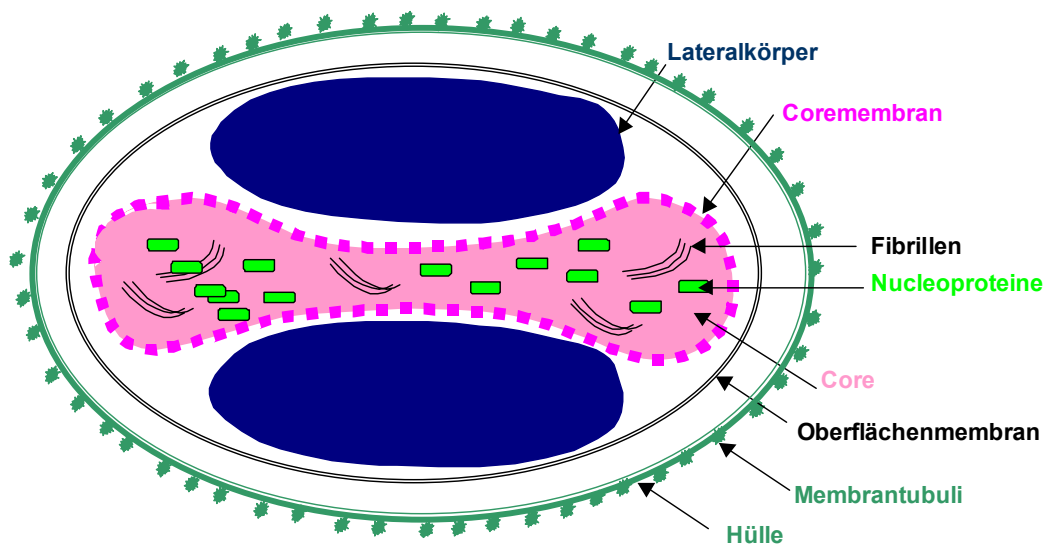
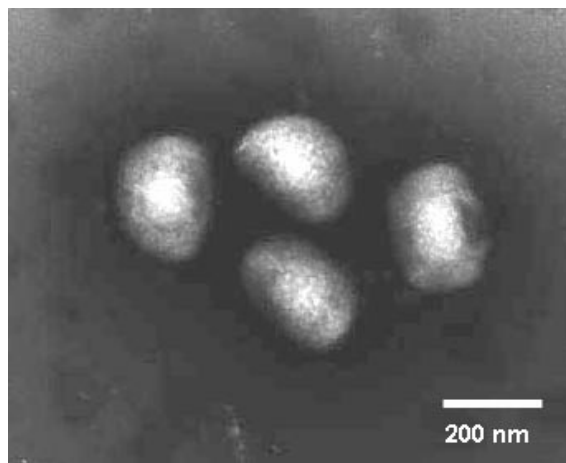


Abb. Ib: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Orthopockenviren. Quaderförmige Virionen mit Virusfilamenten auf der Virushülle sind zu erkennen.



OPV werden über den Respirationstrakt (gezeigt für Kamelpockenvirus in Kamelen, Kuhpockenvirus in Nagetieren und Katzen, Vacciniavirus in Kaninchen und Wasserbüffeln, generell für Affenpockenvirus, Ectromelia-, Variolavirus) und Verdauungstrakt (nachgewiesen für Kuhpocken-, Ectromeliavirus) aufgenommen. Sie werden über das lymphatische System und den Blutstrom im Körper zell-assoziiert verbreitet, eine geringe Infektiosität kann auch im Plasma gefunden werden (Fenner et al., 1989). Pockenviren haben diverse Strategien entwickelt, um sich in ihren Wirten zu vermehren. Generelle Strategien sind dabei das Abschalten der zellulären Proteinsynthese, die durch die virus-kontrollierte Synthese der eigenen Proteine gesteuert wird. Pockenviren haben etliche genetische Information der Zelle angenommen und an die Infektion angepasst; sie können so u.a. die Gewebe- bzw. Wirtsspezifität und die Immunantwort der Wirte modulieren. Diverse Immunmodulatoren der OPV, die ihr Überleben im Wirt sichern, sind bekannt. Beispiele sind virale Zytokinrezeptoren-Homologe (sogenannte Virozeptoren, z.B. Tumornekrosefaktor-Rezeptor, IFN-Rezeptor), verschiedene Modulatoren des Interferonsystemes (z.B. die E3L und K3L Genprodukte des VV), während der Apoptose interagierende OPV-Proteine (z.B. CrmA) oder Chemokin-bindende Proteine (Esposito & Fenner, 2001).

OPV wachsen und produzieren einen zytopathischen Effekt in verschiedensten Zellkulturen, am besten in Zellkulturen humanen Ursprungs oder von anderen Primaten. Variola, Vaccinia Kuhpocken- und Affenpockenviren können dabei nicht unterschieden werden. Eine Methode der Wahl ist die Anzucht der Viren auf Chorioallantoismembran von 10-12 Tage alten Hühnerembryonen (siehe Tab. II) oder molekularbiologische Techniken (PCR).

Tabelle II stellt die biologischen Eigenschaften der zoonotischen OPV zusammen.

Tab. II: Biologische Eigenschaften der zoonotischen OPV (nach Esposito & Fenner, 2001)

Eigenschaft	Variola	Affenpocken	Vaccinia	Kuhpocken
Wirtsspektrum	eng	breit	breit	breit
Pocken auf der CAM	klein, weiß, trüb	klein, weiß, trüb	groß, trüb, weiß oder hämorrhagisch*	groß, hämorrhagisch
Max. Temperatur auf CAM (°C)	37.5-38.5	39	41	40
Letalität für Mäuse	gering	hoch	(sehr) hoch	variabel
Letalität für Hühnerembryo	gering	mittel	sehr hoch	hoch
ATI	-	-	-	+
Genomgröße (kbp)	186	191	~192	198-220

Abkürzungen: CAM, Chorioallantoismembran; ATI, eosinophile Einschlusskörperchen vom Typ A (ATI-Protein)

* abhängig vom Stamm

2.1. Variola (Variola major; Variola minor [Alastrim]; Variola vera; Blattern; Smallpox)

Der Erreger der originären Menschenpocken ist das Variolavirus [lat. varius, gefleckt; varus, Pickel]. Das Virus hat jahrhundertlang tödliche Epidemien verursacht. Der erste Hinweis auf Variola trat bereits 4000 v.Chr. in China und im Fernen Osten auf. Auch Pharaos Ramses V starb 1157 v. Chr. daran (Henderson & Moss, 1999). In Europa wurde die Krankheit um 570 n. Chr. eingeschleppt, in Amerika 1520 durch Hernando Cortez. Hier starben etwa 3.5 Millionen Azteken in 2 Jahren an der Infektion. Im Mittelalter bis zum 19. Jahrhundert waren die Pocken aufgrund der verheerenden Seuchenzüge in Europa gefürchtet. In Deutschland starben etwa 670 000 Menschen der etwa 24 Millionen zählenden Bevölkerung jährlich. Zu Beginn der Impfära forderte die letzte große Pandemie 1870-1873 etwa 100 000 Tote (Mayr, 1999). Im Jahr 1967 begann ein intensives weltweites Impfprogramm gegen Pockenviren. Im Jahr 1980 wurde von der WHO die weltweite Eradikation der Variola proklamiert und diese ist seither nicht mehr aufgetreten. Der letzte Variolavirus Fall trat am 26.10.1977 in Somalia auf (Behbehani, 1983). Zwei weitere Fälle traten 1978 durch eine Laborinfektion in Birmingham, England, auf. Derzeit gibt es offiziell nur noch zwei Institute, in denen Variolavirus gelagert werden darf, am Center for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA, und im Labor VECTOR, Novosibirsk, Rußland. Das Variolavirus hat kein bekanntes Tierreservoir.

Die Inkubationszeit bei der Variolavirus Infektion beträgt 12-14 Tage. Es gibt einige schwere Verlaufsformen der Variola mit Todesfolge (Variola confluens, Variola pustulosa hämorrhagica, Purpura variolosa). Die Letalität beträgt bei Variola major 20-50%, bei der milder verlaufendem Variola minor (Alastrim) bis 5%.

Variola major ist eine zyklische, in mehreren Phasen verlaufende Virusallgemeinerkrankung. Nach einer Phase der Initialisierung, die 2-3 Tage währt, kommt es zu Fieber, Hals- und Kreuzschmerzen, Mattigkeit, vorübergehenden erythemartigen Hautveränderungen, die aber erregerunspezifisch sind. Im Stadium des Pockenexanthems (Eruptionsphase) kommt es nach weiteren 4-8 Tagen zur Ausbildung des typischen Exanthems an der Haut und den Schleimhäuten. Es treten schubweise Papeln, Bläschen und Pusteln mit zentralem Pockennabel auf. Im Stadium der Organmanifestation beobachtet man nach 8-20 Tagen das generalisierte Pockenexanthem (Krustenbildung) an der Haut und den Schleimhäuten. Begleitend treten hohes Fieber, Myocarditis, Lymphknotenschwellungen, Pneumonie sowie bakterielle Sekundärinfektionen auf. Die Pocken heilen nach 3-4 Wochen unter der Bildung von Narben ab (Mayr, 1999).

Eine Unterscheidung des Variolavirus – das im Gegensatz zu anderen Orthopockenviren hochkontagiös ist - von anderen OPV ist auf Anhieb nicht möglich. Zum Direktnachweis wird die Elektronenmikroskopie durchgeführt, alle weitere Labordiagnostik muß in dafür ausgerüsteten BSL-4 Labors unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt werden. Eine postexponentielle Impfung (4-7 Tage) kann den Ausbruch der Erkrankung mildern oder verringern.

2.2. Affenpockenviren

Der Ausbruch einer pockenähnlichen Erkrankung bei asiatischen Cynomolgusaffen im Kopenhagener Zoo 1958 führte zur Erstbeschreibung der neuen Spezies Affenpockenviren innerhalb der OPV. In den 60iger Jahren erkrankten mehrfach Affen in verschiedenen Haltungen, ohne dass Menschen (Händler, Pfleger etc.) - wahrscheinlich aufgrund der durch die Pockenschutzimpfung bestehenden Kreuzimmunität - erkrankten. Erstmals wurden 1970 Affenpockenviren beim Menschen als Ursache einer pockenähnlichen Erkrankung nachgewiesen, die meistens in West- und Zentralafrika auftrat. Von 1970-1995 verzeichnete man etwa 400 Fälle aus 8 Zentralafrikanischen Ländern. Allein in der demokratischen Republik Kongo traten 1981-1986 338 Erkrankungen (33 Todesfälle) auf, wobei 86% Kinder unter 10 Jahren waren. Davon wurde bei fast $\frac{3}{4}$ der Fälle nachgewiesen, dass die Infektion von Tieren übertragen wurde (Esposito & Fenner, 2001). 1996/97 kam es zu dem bisher größten dokumentierten Ausbruch (etwa 800 Fälle), aber auch im Frühjahr 2001 und 2002 sind Erkrankungsfälle in der Demokratischen Republik Kongo labordiagnostisch abgesichert beschrieben worden. Das Wirtsspektrum von Affenpockenviren umfaßt neben den Affen v.a. Eichhörnchen, die in den natürlichen Übertragungsweg involviert zu sein scheinen, da diese oft als Nahrungsmittel dienen. Der Mensch infiziert sich eher selten und dann meist durch das unsachgemäße Hantieren und den Verzehr von entsprechendem „bush meat“. Eintrittspforte für die Infektion sind Haut-/Schleimhautläsionen, selten auch eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch (maximal 30 % der Fälle) (Esposito & Fenner, 2001). Im Unterschied zu Infektionen mit dem Variolavirus zeigt die Affenpockevirusinfektion einen niedrigeren Kontagionsindex.

Die Inkubationszeit bei einer Affenpockenvirusinfektion beträgt 1-2 Wochen. Die Infektion ist zytopathogen und führt zu einer systemischen Erkrankung mit generalisiertem Exanthem. Einem 1- bis 4-tägigen Prodromalstadium mit Fieber und Mattigkeit folgt ein pockenförmiges Exanthem. Dieses durchläuft die typischen Stadien der Papeln, Vesikeln, Pusteln, die dann zentral beginnend austrocknen und deren Kruste schließlich nach ca. 3 Wochen abfällt. Im Unterschied zu Variola kommt es zu einer stärker ausgeprägten Lymphadenopathie im Nacken und im Inguinalbereich und als Zoonose seltener zu einem fatalen Verlauf (ca. 11% im Schnitt aller Altersgruppen).

Affenpockenviren scheinen – wie die Kuhpockenviren – geographisch auf eine bestimmte Region (tropischer Regenwald West- und Zentralafrikas) beschränkt und nicht gut adaptiert zu sein, weil diese nur selten von Mensch-zu-Mensch übertragen werden.

Ein Aufenthalt in Endemiegebieten (West- und Zentralafrika) oder ein Hautbefund lassen einen Verdacht auf Affenpockenvirus zu. Eine Diagnose erfolgt aus Biopsiematerial, Sekret aus Hautläsionen oder Serum. Der Nachweis von Poxviruspartikeln, spezifischen PCR-Produkten oder zytoplasmatischen Einschlusskörperchen ermöglicht die Abgrenzung von Windpocken. Im Zusammenhang mit einer Exposition ist die Diagnose gesichert. Affenpockenviren dürfen nur in speziell ausgestatteten BSL-3 Labors unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen untersucht werden. Die Serologie spielt bei der Akutdiagnostik keine Rolle, jedoch retrospektiv oder für seroepidemiologische Untersuchungen. Abgesehen von möglichen akzidentiellen Infektionen in den wenigen Sicherheitslaboratorien, die mit Affenpockenvirus umgehen, sind humane Infektionen nur in den afrikanischen Endemiegebieten bekannt. Die Untersuchung von Probenmaterial aus Afrika ist oft durch die Zeit- und Temperaturbedingt fortgeschrittene Autolyse erschwert. Eine Unterscheidung von anderen Orthopockenviren ist i.d.R. nicht notwendig, da die Affenpockenviren die einzigen in Zentralafrika vorkommenden Orthopockenviren sind. Eine Abgrenzung von Windpocken (Herpesviren, Varicella Zoster Virus), die oft auch als Koinfektion gefunden werden, ist klinisch meist nicht möglich, kann aber mit dem Elektronenmikroskop oder mittels Varicella Zoster Virus-spezifischer PCR erfolgen.

2.3. Vacciniavirus (VV)

Das Vacciniavirus ist die Typspezies der Orthopockenviren (Tab. I). Vacciniaviren [lat. vacca, Kuh], wurde ursprünglich von Edward Jenner 1798 als Impfstamm gegen Menschenpocken eingeführt. Vacciniaviren sind ausgesprochen resistent gegen Umwelteinflüsse und bleiben unter trockenen Bedingungen auch auf Trägermaterialien wie Kleidern und Gegenständen jahrelang infektiös. Sie können durch direkten Kontakt und durch Aerosole übertragen werden. Das Virus hat ein breites Wirtsspektrum und wurde im Rahmen der Pockeneradikation als Impfstoff weltweit eingesetzt. Das einzige natürliche Reservoir als Ausgangspunkt für gelegentliche zoonotische Infektionen scheint derzeit in Wasserbüffeln (*Bubalis bubalis*) auf dem indischen Subkontinent, in Indonesien und in Ägypten zu bestehen. Es wird angenommen, daß das Büffelpockenvirus eine Variante des VV ist, die von geimpften Personen auf Wasserbüffel übertragen wurde (Lal & Singh, 1977; Fenner et al., 1989; Yilma, 1995). Von den Wasserbüffeln wird das Virus an Hände und Füße von Melkern oder an den Mund von Personen, die Büffelmilch trinken, übertragen. Über Infektionen mit dem ursprünglichen eingesetzten Impfstamm des Vacciniavirus bei Farmern und Rindern wurde

unlängst aus Nordbrasilien berichtet (Damaso et al., 2000). Bei dem früher als eigene Spezies aufgeführten Kaninchenpockenvirus handelt es sich ebenfalls um das Vacciniavirus. Über seine derzeitige Verbreitung ist nichts bekannt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Infektion von Kaninchen mit dem VV Impfstämmen aus der Zeit der Massenimpfungen gegen Variola handelt. Die Hauptbedeutung des VV liegt derzeit jedoch in seiner Verwendung als Expressionsvektor in der Zell- und Molekularbiologie und bei der Entwicklung rekombinanter Impfstoffe. Hierbei ist nicht geimpften Personen besondere Vorsicht beim Umgang mit dem Vacciniavirus empfohlen.

Je nach Grad der Infektion beträgt die Inkubationszeit zwischen 3 und 50 Tagen. Infektionen mit dem Vacciniavirus verlaufen akut unter schneller Bildung von Nekrosen. Es gibt keine persistierenden Infektionen.

Außer bei Immunsupprimierten, bei denen es zu ausgedehnten generalisierten und schweren Verläufen kommen kann, manifestieren sich Infektionen mit dem Vacciniavirus i.d.R. als lokale bläschen- bis knötchenförmige Effloreszenzen. Oft ist das mesodermale Gewebe mitbetroffen. Infektionen gehen mit lokaler Schwellung der Lymphknoten und Fieber einher. Als Folge einer akzidentiellen, durch kontaminierte Hände übertragenen Infektion kann es zur Virusvermehrung in der Kornea kommen. Daraus resultiert in 50% der Fälle eine dauernde Reduktion der Sehleistung. Eine Indikation zur Diagnose erfolgt nur bei entsprechender Anamnese (Laborpersonal, Kontakt mit Rindern/Büffeln in den Tropen) und verdächtigem Hautbefund. Exsudat von Effloreszenzen, Bläschen oder Papeln sollten mit einer Spritze aufgesammelt und in einem gut verschlossenen sterilen Röhrchen eingeschickt werden. Bei fortgeschrittener Eintrocknung der Papeln kann je nach Lokalisation eine Stanze entnommen oder mit dem scharfen Löffel entsprechendes Krustenmaterial abgekratzt werden. Für serologische Untersuchungen kann Serum eingeschickt werden.

Der Nachweis der Viruspartikel in den Effloreszenzen beweist die Infektion mit einem Orthopockenvirus. Vacciniaviren induzieren knötchenförmige Herde ohne Hämorrhagien auf der Hühner-Chorioallantoismembran. Genus- und Spezies-spezifischer Nachweis erfolgt mittels PCR. Ein Antigenfänger ELISA direkt aus der Bläschenflüssigkeit bzw. Hautverreibung ist ebenfalls beweisend für die Infektion und zudem aus epidemiologischer Sicht sinnvoll. Positive serologische Befunde sind nur nach Ausschluß einer früheren Pockenimpfung bzw. über den Nachweis eines mindestens 4-fachen Titeranstieges aussagekräftig.

Differentialdiagnostisch muss eine VV-Infektion zu Infektionen mit anderen zoonotischen OPV unterschieden werden. Alle Bläschenexantheme, v.a. die durch die Herpesviren HSV-1, HSV-2, und VZV hervorgerufenen, daneben aber auch Dermatitis herpetiformis, Impetigo, Erythema multiforme, Pityriasis, Purpura haemorrhagica müssen differenziert werden.

2.4. Kuhpockenviren (cowpoxvirus, CPXV)

Kuhpockenviren kommen natürlicherweise nur in Europa und südlich des Ural (Turkmenistan) vor. Lange Zeit hatte man angenommen, daß Kuhpockenviren (Genus Orthopoxvirus) enzootisch bei Rindern verbreitet sind und daß sich die Menschen über den Kontakt mit diesen Tieren anstecken. Eine Infektion einer Hauskatze mit einem „Kuhpockenvirus-ähnlichen“ Erreger wurde erstmals 1978 berichtet (Thomsett et al., 1978). Mittlerweile sind weit über 300 Fälle von Infektionen bei Hauskatzen bekannt geworden, man rechnet aber mit einer deutlich höheren Dunkelziffer nicht diagnostizierter Fälle (Mahnel, 1991). Heute geht man davon aus, daß der Mensch, die Katze, das Rind und vor allem auch Zootiere Endglieder eines Infektionsgeschehens sind. Kuhpockenviren haben darüber hinaus ein außerordentlich breites Wirtsspektrum, das v.a. in Zoos gefürchtet wird, wo wertvolle und seltene Tiere wie Nashörner, Elefanten, Großkatzen etc. mit schwersten Verlaufsformen erkranken können (Marennikova et al., 1978). Eine Untersuchung in Brandenburg ergab auch, dass 16% von 1040 untersuchten Rotfüchsen OPV-Antikörper haben (Müller et al., 1996). Das Erregerreservoir für CPXV sind Nagetiere (Baxby et al., 1979; Chantrey et al., 1999; Hazel et al., 2000), von denen aus die Infektion meist auf Katzen (daher oft auch als „Katzenpocken“ bezeichnet) und weiter auf den Menschen übertragen wird. Dies erklärt die saisonale Häufung von Fällen im Spätsommer/Herbst (Pfeffer et al., 2002), sowie die Tatsache, dass meist mit Katzen spielende Kinder betroffen sind. Ein tödlicher Fall trat 1991 auf, als CPXV von einer Katze auf einen immunsupprimierten Menschen (schweres Asthma mit Kortisonbehandlung) übertragen wurde (Czerny et al., 1991). Eintrittspforte für die Infektion sind Haut-/Schleimhautläsionen.

Die Inkubationszeit bei CPXV-Infektionen beträgt 1-2 Wochen. Die Infektion ist i.d.R. selbstlimitierend und lokal begrenzt (meist an Extremitäten, Gesicht). Oft kommt es jedoch zu Sekundärherden, da durch Kratzen die Viren an andere Körperstellen verschleppt werden. Ein generalisiertes Exanthem und eine entsprechend schwere systemischen Erkrankung ist nur bei immunsupprimierten Personen beschrieben.

Das Exanthem bei einer Kuhpockenvirusinfektion ist oft stark ödematisiert und durchläuft die typischen Stadien der Papel, Vesikel und Pustel, die mit einem Nabel vom Zentrum her austrocknet und nach ca. 3 Wochen, bei bakterieller Sekundärinfektionen nach bis zu 5-8 Wochen die Kruste verliert und eine Narbe hinterläßt. Es kommt normalerweise zu einer ausgeprägten und schmerzhaften Lymphadenitis im regionalen Lymphknoten.

Anamnestisch ist der Umgang mit Tieren, v.a. Katzen, ein Hinweis auf Kuhpockenvirusinfektionen. Klassisch ist der Vorstellungsgrund „schlecht heilende Wunde“. Die Diagnostik erfolgt aus Biopsiematerial, Sekret aus Hautläsionen und/oder retrospektiv, Serum. Eine Frühdiagnostik

führen wir mittels EM, PCR oder dem Nachweis eosinophiler zytoplasmatischer Einschlusskörperchen vom Typ A durch.

Obwohl eine Erkrankung mit Kuhpockenviren aufgrund der höheren Empfänglichkeit (seit 1975 wird nicht mehr gegen Pockenviren geimpft) immer häufiger in Deutschland festgestellt wird, ist das klinische Bild weitgehend unbekannt und wird daher oft erst sehr spät als Differentialdiagnose zu Mykosen, kutanem Anthrax oder Wundrose in Betracht gezogen. Die Serologie spielt bei der Akutdiagnostik keine Rolle, ist aber retrospektiv und für epidemiologische Untersuchungen zur Feststellung der Infektionsquelle sinnvoll. Eine Unterscheidung von anderen OPV ist bei entsprechendem Vorbericht innerhalb Europas nicht notwendig. Vorsicht ist beim Umgang mit Tieren (v.a. Hauskatzen mit Freilauf) mit schlecht heilenden Effloreszenzen (v.a. an Pfote, Nasenspiegel, Ohren) geboten.

2.5. Impfung und Therapie

Es besteht eine ausgeprägte serologische Kreuzreaktivität zwischen den Orthopockenviren. Eine Vaccinia-Impfung (Pockenschutzimpfung) schützt auch vor der Infektion mit anderen OPV, aber einen zugelassenen Impfstoff gibt es derzeit nicht. Jeder, der gegen Pocken geimpft wurde (Personen älter als 30 Jahre) hat heute noch einen gewissen Impfschutz – auch vor den gefährlichsten Symptomen und Komplikationen der Variola. In Studien an 140 Vacciniavirus geimpften Menschen konnte gezeigt werden, dass die Titer neutralisierender OPV Antikörper mindestens 30 Jahre nach der Impfung noch stabil sind (El-Ad et al., 1990). Wir haben in unserem Labor bei Untersuchungen von humanen Seren von vormals geimpften Personen oft Resttiter (bis 1:512) von OPV-AK im PRNT festgestellt (unpublizierte Daten). Auch die für die belastbare Immunität bei Pockenvirusinfektionen wichtige zelluläre Immunantwort scheint nach einer länger zurückliegenden Impfung gegen Pockenviren immer noch zu bestehen. So konnte Vacciniavirus-spezifisches T-Zellgedächtnis („T-cell memory“) in Erwachsenen nachgewiesen werden, die als Kinder gegen Pockenviren geimpft wurden. Es wird angenommen, dass diese T-Zellgedächtnis mehr als 50 Jahre auch bei Abwesenheit des Antigens besteht (Demkowicz et al., 1996). Andere Untersuchungen im Tiermodell haben kürzlich gezeigt, dass Gedächtnis-T-Zellen spezifisch für ein anderes Virus (das lymphozytäre Choriomeningitisvirus, LCMV) mit ähnlichen T-Zellepitopen und nach Aktivierung des Effektorzytokins IL-15 einen Schutz vor einer Vacciniavirus Infektion geben können (Chen et al., 2001).

Zur Zeit der Vaccinia-Massenimpfungen wurde eine progressive lokale Impfkomplication (Vaccinia necrosum) in seltenen Fällen (5 von 6 Mio. Erstgeimpften, 1 von 1 Mio. Wiedergeimpften) v.a. bei Impfungen mit Störungen im zellulären Immunsystem beobachtet. Vaccinia-Immunglobulin wurde

früher bei überalterten Erstimpfungen und Komplikationen der Pockenschutzimpfung gegeben. Bei Patienten mit Eczema allergicum kann ein Eczema vaccinatum auftreten. Die postvaksinale Enzephalitis ist eine seltene Impfkomplication, die je nach verwendetem Impfstamm und je nach Alter des Geimpften unterschiedlich häufig auftritt (bei Erwachsenen ca. 1-10 Fälle pro 1 Mio. Geimpfte).

Um die Impfkomplicationen mit dem VV zu vermindern, wurden Versuche unternommen, dieses Virus zu attenuieren. Das VV Stamm Ankara wurde durch 574 kontinuierliche Passagen auf Hühnerembryofibroblasten-Kulturen aus Valo-Eiern attenuiert (1960-1974) und von Prof. Dr. Anton Mayr an unserem Institut entwickelt. Das hochattenuierte Virus wurde MVA benannt (ab Passage 530), um es so vom Ausgangsstamm (CVA) unterscheiden zu können. 1976 wurden in Deutschland subkutane Impfungen bei Kindern und bei 150 000 Kaukasiern durchgeführt, ohne dass Komplikationen auftraten. Der Impfstamm MVA ist ein moderner, unschädlicher und parenteraler Pockenimpfstoff (Mayr & Munz, 1964; Stickl et al., 1974; Mayr et al., 1975). Er ist beim Mensch bereits klinisch geprüft, aber derzeit trotzdem nicht als Impfstoff zugelassen. MVA hat seine ursprüngliche Immunogenität und OPV-protective Wirkung beibehalten, besitzt aber eine stark verminderte Virulenz für Mensch und Tier (Mayr, 1999; Mahnel & Mayr, 1994). Das MVA Genom besitzt sechs große Deletionen, die in einem Verlust von 15% der genetischen Information (20kbp) im Vergleich zu CVA resultieren (Meyer et al., 1991; Antoine et al., 1998). Davon sind etliche Virulenz- und Wirtspektrumgene betroffen. Es erfolgt daher eine abortive Vermehrung des MVA im Menschen. MVA darf von unserem Konsiliarlabor nach der Genehmigung durch die zuständigen Landesbehörden für das Impfen von Zootieren versendet werden. Neben der Verwendung als Impfstoff wird MVA weltweit als Vektor zur Inserierung von Fremdgenen benutzt. Es befindet sich als Vektorimpfstoff oder auch zur Bildung biologisch aktiver Proteine z.B. in der Tumorthherapie in der Phase der klinischen Prüfung.

Nach dem 11. September 2001 hat die Bundesregierung 6 Millionen Impfdosen des VV-Stammes Lancy aus der Schweiz gekauft. Weitere Impfstoffvorräte sollen zur etwaigen Impfung von Teilen der Bevölkerung beschafft werden. Am 14.10.2002 gab eine Sprecherin des Gesundheitsministeriums an, dass derzeit 24 Millionen Pockenschutz-Impfdosen vorhanden sind und dass diese im kommenden Frühjahr auf 35 Millionen Dosen erhöht werden sollen.

Derzeit sind mehrere Substanzen für die antivirale Therapie gegen OPV in Entwicklung. Eine antivirale Therapie mit Thiosemicarbazon (Marboran) ist möglich. Cidofivir (Vistide™, ein viraler DNA Polymeraseinhibitor) und Derivate davon können die Replikation der Pockenviren stoppen,

sollte aber nur bei generalisierten Exanthenen verwendet werden. Neue Untersuchungen aus Amerika zeigen, dass Cidovir und Derivate (Hexadecylcyclopropyl-Ester) vor einer Aerosolinfektion von Mäusen mit CPXV und Makkaken mit Affenpocken- oder Variolaviren schützen (Huggins et al., 2002). Außerdem wird eine vorbeugende Behandlung der Pockeneffloreszenzen mit lokaler Antibiose zur Vermeidung von bakteriellen Superinfektionen dringend empfohlen.

3. Parapockenviren (PPV)

Parapockenviren sind doppelsträngige DNA-Viren mit komplexer, im Gegensatz zu den Orthopockenviren ovoider Partikelmorphologie. Mit einem Durchmesser von 160 – 260 (Orf Virus) bis 190 - 300 nm (Pseudokuhpockenvirus) gehören PPV zu den größten Viren. Sie bestehen aus einem zylindrischen, im Querschnitt oft bikonkav erscheinenden Nukleokapsid („Core“), das die kovalent geschlossene, lineare, doppelsträngige DNA (etwa 135 kbp) enthält. Zwischen diesem Nukleokapsid und der Virushülle befindet sich der sogenannte Lateralkörper. Extrazelluläre Virionen besitzen eine weitere, äußere Hüllmembran. Parapox-Viruspartikel sind etwas kleiner als Orthopox-Virionen und zeigen anstelle eines irregulären Arrangements von Oberflächenfilamenten ein regelmäßiges spiralig fadenförmiges Muster. PPV besitzen - wie OPV - einige immunmodulatorische Proteine, z.B. den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (vascular growth factor) oder ein IL-10 Homolog.

Das Orfvirus, die Typspezies der PPV, verursacht Hautläsionen bei kleinen Wiederkäuern (v.a. Schafen, Ziegen, manchmal Wild), das bovine papuläre Stomatitis-Virus induziert Läsionen in Kälbchen, das Melkerknoten-Virus führt zu Läsionen am Euter der Kühe. In Neuseeland ist kürzlich eine neue Parapockenvirus-Spezies bei Rotwild beschrieben worden, über deren zoonotisches Potential noch nichts bekannt ist. Alle drei oben genannten Parapockenviren können auf den Menschen übertragen werden und die Infektionen gelten i.d.R. als Berufskrankheiten. Die Infektion erfolgt durch Hautabrasionen, oft an den Händen und Fingern, und es folgt lokal eine Infektion der Epidermiszellen und Keratinozyten. Die Erreger sind weltweit verbreitet.

Die Inkubationszeit bei einer PPV Infektion beträgt 4–8 Tage. Parapox-Virusläsionen haben im Gegensatz zu Orthopox-Virusläsionen einen proliferativen Charakter (weniger zytopathogen). Sie führen zu dermaler Infiltration mit Monozyten und Lymphozyten um hyperämische Kapillaren und kleine Venen herum (benigne Lymphoproliferation). Das Genom des Orfvirus kodiert für einen endothelspezifischen, aber nicht mit EGF verwandten Wachstumsfaktor, der für die *in vivo* beobachtete Endothelproliferation bei Orfvirusinfektionen verantwortlich zu machen ist. Persistierende Infektionen sind nicht bekannt.

Orf ist ein altes angelsächsisches Wort und bedeutet Schorf. Orf wurde in Schafen bereits 1787 beschrieben, in Ziegen 1897 und im Menschen 1934 (Esposito & Fenner, 2001). Farmer in England haben oft Orf-Infektionen. Studien haben gezeigt, daß dort 20% der Schafhalterangaben früher an Orf erkrankt gewesen zu sein. Antikörperprofile zeigten eine Prävalenz von 4%, Infektionen traten in 2.8% auf. Dabei wurde nachgewiesen, daß der Kontakt mit den Schafen, die Größe der Schafherde, aber auch Kontakt mit Hunden und Ratten als Risikofaktoren für die Infektion angesehen werden können (Paiba et al., 1999). Das Virus ist in trockenen Krusten sehr stabil, wodurch enzootische Infektionsketten bei Schafen im Freiland aufrecht erhalten werden können. Orfläsionen (kontagiöse pustuläre Dermatitis, Ekthyma contagiosum) sind großknotig, und die umgebende Haut ist entzündet. Subfebrile Temperaturen gehen einher mit lokalen Ödemen und Schwellung der regionalen Lymphknoten. Die Läsionen sind schmerzhaft, entwickeln jedoch bald eine Borke und heilen über 4–6 Wochen narbenlos ab. Eine Orfvirus-Infektion der Augen kann zu permanenter Blindheit führen. Weitere Komplikationen sind Urtikaria, Erythema multiforme bullosum und bakterielle Superinfektion. Selten wurden auch tumor-ähnliche Knoten berichtet („giant orf“), die sich vor allem bei immunsupprimierten Patienten manifestieren können. Melkerknoten sind kirschrote, halbrunde, feste Knoten von bis zu 2 cm Durchmesser und relativ schmerzlos. Juckreiz wird beschrieben; die Knoten sind gut vaskularisiert, ulzerieren aber nicht. Die Läsion besteht aus Granulationsgewebe, das allmählich resorbiert wird und nach 3–4 Wochen spontan verschwindet. Das einzige Zeichen von Generalisierung ist das Anschwellen regionaler Lymphknoten. Selten wurden auch Infektionen von Menschen durch PPV von Seehunden oder Kamelen berichtet (Esposito & Fenner, 2001).

Die Diagnose von PPV erfolgt in erster Linie durch das klinische Bild und die Anamnese (Tierkontakt). In unklaren Fällen führen wir einen Virusnachweis in Biopsiematerial oder Sekret aus Läsion mittels Elektronenmikroskopie, Anzuchtversuch oder Nukleinsäurenachweis (PCR) durch. PPV haben ein enges Zellkulturwirtsspektrum. Sie erzeugen im Gegensatz zu OPV keine Pocken auf der Hühner-Chorioallantoismembran. Retrospektiv erfolgt der Nachweis von PPV Antikörpern mittels kompetitiven ELISA und Serumneutralisationstest. Dabei zeigen die PPV Spezies eine enge serologische Kreuzreaktivität. Es existieren allerdings keine immunologischen Kreuzreaktionen mit Orthopockenviren, d.h. die Pockenschutzimpfung gibt keinen Schutz vor PPV Infektionen.

Mehrfach sind erfolgreiche Behandlung der Parapoxvirus-Läsionen mit Cidovir-Salbe (1%) [(S)-1-(3-Hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)-Cytosin, [HPMC, Vistide®] beschrieben worden. Cidovir besitzt als azyklisches Nucleosidanalogen ein breites antivirales Spektrum gegen fast alle DNA-Viren. Daten über Resistenzen sind bisher nicht bekannt. Eine vorbeugende Behandlung von bakteriellen Superinfektion mit Antibiotika wird dringend empfohlen.

3.1. Parapockenviruspezies

Es sind im Genus Parapockenvirus (PPV) fünf Spezies unterscheidbar,

- das Bovine Papuläre Stomatitits Virus (BPSV) (Maul Rind, Human),
- das Orf [kontagiöses pustular dermatitis virus, kontagiöses ecthyma] Virus (ORFV) (Schaf, Rind, Ziege, Mensch, Wild, Auerochse),
- das Pseudo-Kuhpockenvirus (PCPV) [Paravaccinia, Melkerknoten-] Virus (Rind, Mensch)
- das Parapockenvirus des Rotwildes in Neuseeland (PVNZ)
- und das Parapockenvirus der Eichhörnchen (Moyer et al., 2000).

Die Unterscheidung der Spezies der PPV ist bisher unzureichend. Prinzipiell beruht die Einteilung der PPV auf dem Wirtsspektrum, klinischen Symptomen und der Serologie. Wirtsspektrum und klinische Symptomatik der Vertreter der Parapockenviren sind jedoch nicht eindeutig. So konnte ORFV, das ursprünglich in den Wirten Ziege und Schaf beschrieben wurde, auch von Rindern isoliert werden (Sentsui et al., 1999). Darüber hinaus besteht eine serologische Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Viren und es gibt keine exakten serologischen Klassifikationsmöglichkeiten (Lard et al., 1991; Inoshima et al., 2001). Die genannte Untergruppierung innerhalb des Genus PPV wird vor allem anhand von unterschiedlichen Restriktionsenzym-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP) vorgenommen (Gassmann et al., 1985; Mercer et al., 1997; Inoshima et al., 2001). DNA-DNA-Hybridisierung der terminalen Genomregionen (Gassmann et al., 1985; Mercer et al., 1997; Robinson & Mercer, 1995) ist die Methode der Wahl, um die Viren und neue Isolate weiter einzuteilen. Bisher sind wenige Sequenzen der PPV verglichen worden. Untersuchungen an Hüllproteinen von japanischen PPV-Isolaten zeigten eine Nukleotidsequenzidentität von etwa 82-84% zwischen ORFV und BPSV bzw. PVNZ, von etwa 85-86% zwischen BPSV und PCPV bzw. PVNZ und von 95% zwischen ORFV und PCPV (Inoshima et al., 2001). Ob letztere wirklich distinkte Virusspezies der Parapockenviren sind, muss in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden. Untersuchungen an einem Seehundisolat aus Seehunden aus der Nordsee (bisher als mögliche Spezies eingruppiertes Seehundparapockenvirus) zeigten, dass sich dieses signifikant von ORFV, BPSV, PCPV und PVNZ unterscheidet. Das Hüllprotein des Seehundvirus ist 75-76.6% unterschiedlich zu denen dieser vier Parapockenspezies (Becher et al., 2002).

Weitere Informationen über PPV sind dem Review von Büttner & Rziha (2002) zu entnehmen.

4. Diagnostik

Die Diagnose von Ortho- und Parapockenviren bei Menschen und Tieren erfolgt in unserem Labor einerseits durch direkten Nachweis der Erreger und andererseits durch indirekte Nachweise, d.h. mit serologischen Methoden. So wird aus eingesendetem Organmaterial (meist Hautbiopate) entweder direkt ein elektronenmikroskopischer Nachweis erbracht und/oder eine Anzucht auf geeigneten Zellkulturen (Ma-104-Zellen, Vero-Zellen, Hühnerembryofibroblasten) versucht. Nach Anlegen serieller Passagen wird die Kultur ebenfalls für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet, um die Präsenz von Pockenviren nachzuweisen. Neue Pockenvirusisolate werden molekularbiologisch weiter klassifiziert. Dies erfolgt z.B. mit Orthopockenviren-spezifischer PCR, Restriktionsenzym-Analysen und Pathohistologie (HE-Färbung).

Seren von Patienten (Mensch, Tier) werden in einem Plaqueneutralisationsreduktionstest oder mit einem Kompetitions-ELISA (Czerny et al., 1996) zum Nachweis von Orthopockenvirus-AK untersucht. Zum Nachweis von Parapockenvirus-AK wird ein Serumneutralisationstest oder ein Kompetitions-ELISA durchgeführt.

5. Aktuelle Fälle

Eine Auflistung der diagnostischen Methoden und von Untersuchungen, die in unserem Labor im Verlauf der letzten Jahre durchgeführt worden sind, ist in Tab. III zu finden. Eine Arbeit beschreibt die Orthopockenvirusisolate aus dem Jahr 1998 (Pfeffer et al., 1999).

Eine Zusammenfassung mehrerer interessanter Orthopockenvirus-Fälle aus 2001 werden hier kurz vorgestellt (Essbauer et al., 2002). Es handelte sich hierbei um in Bezug auf eine Pockenimpfung naive Personen, meist im Alter unter 30 Jahren. Allen humanen Fällen ist gemeinsam, dass die Personen Kontakt mit einer Katze hatten.

Fall 1: Pockenvirusinfektion eines 21-jährigen Mannes

Während eines Zelturlaubes im Frühsommer zog sich ein Mann ein Bläschen am rechten Auge zu, das sich auf 2x2 cm vergrößerte. Elf Tage nach Auftreten dieses ersten Bläschens bekam der Patient starkes Fieber und eine schwere lokale Lymphadenitis. Der Patient hatte Kontakt zu einer Katze, die auf einem Bauernhof lebt und die einige Wochen zuvor grippe-ähnliche Symptome hatte.

Resultat: Kuhpockenviren konnten in Hautbiopsien des Patienten elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Bei der Anzucht in Ma-104 Zellen entwickelte sich 3 Tage p.i. kleine Plaques (zytopathischer Effekt). Im Serum des Patienten wurden OPV-neutralisierende Antikörper mit einem Titer von 1:128 am Tag des Einsetzens der Symptome und drei Wochen später

gefunden. Ein Kompetitions-ELISA zeigte einen Anstieg der Titer, 1:8 am Tag 1, 1:64 nach drei Wochen. Von der Katze war es nicht möglich, Material für eine Untersuchung zu erhalten.

Fall 2: Pockenvirusinfektion eines 10-jährigen Mädchens und einer Katze

Ein Mädchen wurde mit schweren erythemischen Eruptionen hinter dem Ohr, um den After und Vagina, an den Händen, Füßen und Rücken ins Krankenhaus eingeliefert. Da eine Streptokokken-Superinfektion auftrat, wurde das Mädchen mit Antibiotika behandelt. Die Infektion verheilte sehr langsam, nach etwa 8 Wochen, ohne Narbenbildung. Die Patientin hatte engen Kontakt zu einer Katze, die 4 Wochen, bevor das Mädchen betroffen war, krustige Läsionen im Gesicht hatte.

Resultat: Eine Histopathologie von Hautbiopsien des Mädchens zeigten Kuhpockenvirus-typische Einschlusskörperchen. Elektronenmikroskopie und Zellkultur bestätigten die CPXV Infektion. Eine Serokonversion konnte mittels des OPV-Plaquereduktionsneutralisationstestes (PRNT, Titer 1:1024) gezeigt werden.

Versuche Virus in Hautbiopsien der Katze mittels Elektronenmikroskopie oder Anzucht in Zellkultur nachzuweisen schlugen fehl. Jedoch konnten wir die Infektion retrospektiv zeigen, da das Serum der Katze einen Titer von 1: 1024 im OPV-PRNT aufwies.

Fall 3: Pockenvirusinfektion von drei Menschen und einer Katze

Eine 20-jährige Frau wurde beim Spielen von der Nachbarskatze verletzt und bekam zwei Tage später Läsionen am Unterarm. Nach zwei Wochen bekam die Frau krustige Veränderungen am Kopf und Nacken. Nach 16 Tagen entwickelte sich eine Lymphadenitis. Die Wunden wurden mit Antibiotika und Antiseptika behandelt.

Die Frau wurde von einem 6 Wochen alten Kätzchen verletzt, das vor zwei Wochen von seiner Mutter, die häufig auf Mäusejagd war, getrennt wurde. Das Kätzchen zeigte Krusten am Kopf und den Ohren und wurde euthanasiert.

Inzwischen haben Vater (54 Jahre) und Sohn (14 Jahre) des Haushaltes der Katze ebenso 2-3 Pocken auf ihren Unterarmen und -beinen entwickelt.

Resultat: Eine Histopathologie von Hautproben der Frau zeigte eosinophile Einschlusskörperchen in der Epidermis. Eine Immunfluoreszenz mit dem Serum der Frau und des Mannes war auf OPV-infizierten Ma-104 Zellkulturen positiv. In Hautkrustenbiopsat von der Frau wurden OPV-ähnliche Partikel entdeckt, ein zytopathogenes Agens induzierte innerhalb von 24 h Plaques in Ma-104-Zellen. Das Serum der Patientin (Tag 16 und 41) hatte einen Titer von 1:1024 im PRNT.

In einem Hautbiopsat aus dem Katzenohr konnten im Elektronenmikroskop OPV-ähnliche Partikel nachgewiesen werden, das Agens induzierte einen OPV-artigen CPE in Ma-104-Zellen.

Im Serum des Katzenbesitzers wurde im PRNT ein Titer von 1: 1024 gegen OPV festgestellt. Im Kompetitions-ELISA wurden die OPV Antikörper bestätigt (Titer 1:512). Daher wurde die CPXV Infektion retrospektiv in diesem Patienten gezeigt.

Zusammenfassend konnten bei diesem Fall eine Kuhpockenvirusinfektion in einer Katze und drei klinisch betroffenen Personen gezeigt werden.

Fall 4: Pockenvirusinfektion eines Kätzchens

Im Herbst 2002 wurde ein 11-Wochen alter Kater, der viele Pusteln im Gesicht, Kopf und am rechten Hinterfuß hatte, vorstellig. Die Krallen der rechten Hinterpfote waren eitrig. Da weitere Verkrustungen u.a. in der Mundhöhle auftraten, wurde der Kater euthanasiert.

Resultat: Homogenate einer Ohrbiopsie des Katers zeigten im Elektronenmikroskop backsteinförmige OPV-ähnliche Virionen. Ein OPV Plaquereduktionsneutralisationstest zeigte einen Titer von 1: 128 im Serum des Katers.

Fall 5: Kuhpockenvirusinfektion zweier Elefanten

Im September 2000 brach eine OPV Infektion bei zwei Zirkuselefanten eines deutschen Wanderzirkuses aus. Ein Elefant hatte eine große Pocke an seinem Augenlid und eine rote Pustel über dem anderen Auge. Der Gesundheitszustand der Tiere verschlechterte sich zunehmend und die Krankheit wurde systemisch. Die Tiere zeigten viele ulzerative, nässende Läsionen an den Knien und Vorderfüßen, insbesondere am Fußgelenk. Weitere Pocken traten auf der Lippe und Mundschleimhaut auf. Eine Behandlung mit Antibiotika und Versuche die Tiere durch Entlastung – die Pocken fanden sich am Knie und Fußgelenk - zu retten, schlugen fehl. Die Elefanten starben einen Monat nach den ersten Anzeichen der Erkrankung.

Resultat: Elektronenmikroskopische Präparate der Hautbiopsie der Elefanten enthielten OPV-Partikel. Experimente, eine akute Virämie durch Anzucht von Elefantenserum auf Ma104 Zellkulturen zu zeigen, gelangen nicht. Die OPV Infektion wurde durch PCR Analyse weiter bestätigt.

Molekularer Vergleich der Isolate aus den 5 Fällen:

Virusmaterial aus Gewebe (Fall 5) oder nach Kultivierung in Ma-104-Zellen (Fall 1 - 4) wurden für die DNA Isolierung und OPV spezifische PCRs verwendet. Primer, die das 14 kDa Protein-Gen von OPV erkennen ergaben für alle untersuchten Proben 280 bp große Amplifikate, unabhängig ob die Probe von Mensch, Katze oder Elefant stammten. Wir untersuchten die Proben des weiteren mit einer zweiten PCR, mittels der man über Primern spezifisch für das ATI-Gen OPV-Spezies identifizieren und differenzieren kann (Meyer et al., 1994, 1997). Wir konnten aus allen

untersuchten Proben ATI-Gen-spezifische PCR-Produkte von etwa 1600 bp amplifizieren. Nach einem Verdau der Amplifikate mit dem Restriktionsenzym XbaI wurden für alle Proben dieser fünf Fälle Fragmente von etwa 645, 515, 346, 100 und 67 bp erhalten. Dies geht einher mit Ergebnissen von anderen deutschen CPXV Isolaten, aber unterscheidet sich von dem XbaI-verdauter Vacciniavirus ATI-PCR-Amplifikate (900, 320, 220, 100 und 70 bp). Daher gehörten deutsche CPXV Isolate – unabhängig von der Wirtsspezies, Mensch, Katze oder Elefant – zu einem häufig in Deutschland vorkommenden CPXV-Typ, der von Vacciniavirus unterschieden werden kann.

Tab. III: Diagnostische Methoden und Untersuchungen im Konsiliarlabor für Pockenviren.

Methode	Beispiele der Anwendung	Beispiel für Untersuchungen, Fälle
Elektronenmikroskopie	Orthopockenviren (OPV) Parapockenviren (PPV) Affenpockenviren (MPXV)	OPV von diversen Wirtsspezies PPV von Kamelen, Schafen, Menschen MPXV von Menschen oder Affen aus Afrika
Isolierung von Virus in Zellkultur	MA 104 Vero Schweinenierenzelllinie (PK 15) Hühnerembryofibroblasten Wachtelzelllinie (QT-35)	Kultivierung, Untersuchung neuer OPV-Isolate Kultivierung, Untersuchung von PPV Kultivierung, Untersuchung von Schweinepockenviren (SWPV) z.B. Untersuchung von SPV aus einem Ausbruch im Frühjahr 2001 Vermehrung des MVA-Impfstoffes (-Vakzine) Kultivierung und Untersuchung von Avipoxviren z.B. Virus aus deutschen Wanderfalken, Houbarapockenvirus aus Dubai Kultivierung und Untersuchung von Avipoxviren
Polymerasekettenreaktion	14 kDa PCR ATI- PCR TK-PCR	Nachweis von OPV Infektionen Untersuchung der molekularen Epidemiologie der OPV Untersuchung von Wildmäusen nach OPV Differenzierung neuer CPXV Isolate Differenzierung, Charakterisierung SWPV
Plaquereduktionsneutralisationstest	Orthopockenviren	Untersuchung der OPV Antikörpertiter in Seren von Mensch, Katze, Elefant z.B. retrospektiver Nachweis von OPV-Infektionen, Verlauf von CPXV Infektionen Überprüfung einer erfolgreichen Impfung von Zootieren mit dem MVA
Enzyme linked immunosorbent assay	Kompetitions-OPV ELISA Kompetitions-PPV ELISA	Untersuchung der OPV Antikörpertiter in Seren von Mensch, Katze, Elefant Untersuchung der PPV Antikörpertiter in Seren von Mensch, Schaf z.B. retrospektiver Nachweis von Infektionen, Verlauf von PPV Infektionen

6. Einblicke in derzeitige Forschungsschwerpunkte

- **Charakterisierung neuer Kuhpockenvirusisolate von Mensch und Tier:**

Jährlich erhalten wir etwa 150 Einsendungen verschiedener Wirtsspezies zur Klärung einer Pockenvirusinfektion. Ähnlich der Ausführungen der beschriebenen Fälle aus 2001 werden wir neue CPXV Isolate weiter charakterisieren.

- **Untersuchung der Reservoirfunktion von Wildmauspopulationen für OPV:**

Bislang gibt es keine Nagetier-Virusisolate in Deutschland - jedoch konnten in Nagern (Mäusen) in England und in Rußland Antikörper gegen Orthopockenviren nachgewiesen werden (Marennikova et al., 1978; Kaplan et al., 1980; Chantrey et al., 1999; Hazel et al., 2000). Über den Infektionsverlauf in Wildnagern und damit die Rolle bei der Übertragung v.a. auf Katzen ist in Deutschland nichts bekannt. Um diese Interaktionen aufzuklären, haben wir in Bayern bereits 500 Wildmäuse eingefangen, die Nachweisgrenzen etablierter Nachweismethoden (PCR, Serologie) in Labormäusen getestet und sind derzeit dabei die Proben von den Wildmäusen zu analysieren.

- **Molekulare Charakterisierung von PPV Isolaten von Mensch und Tier:**

PPV Isolate vom Mensch und von verschiedenen Tierarten aus Deutschland sind bisher wenig verglichen und charakterisiert worden. Daher sollen PPV Isolate bzw. aus Patientenmaterial aus den letzten Jahren eingehend studiert werden, um Rückschlüsse auf deren Epidemiologie und auch mögliche Reservoirs ziehen zu können.

- **Etablierung neuer Nachweismethoden (PCRs, serologische Tests):**

Derzeit erarbeiten wir neue PCRs für den Nachweis von Schweinepockenviren und weitere serologische Tests für die Differenzierung von OPV Viren.

8. Literatur:

Antoine G., Scheiflinger F., Dorner F., Falkner F.G., 1998: The complete genomic sequence of the modified vaccinia virus Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244, 365-396.

Baxby D., Ashton D.G., Jones D., Thomsett L.R., Denham E.M., 1979: Cowpox virus infection in unusual hosts. *Vet. Rec.* 104, 175.

Becher P., König M., Müller G., Siebert U., Thiel H.-J., 2002: Characterization of sealpox virus, a separate member of the parapoxviruses. *Arch. Virol.* 147, 1133-1140.

Behbehani A.M., 1983: The smallpox story: life and death of an old disease. *Microbiol. Rev.* 47, 455-509.

Büttner M., Rhiza H.-J., 2002: Parapoxviruses: From the lesion to the viral genome. *J. Vet. Med. B* 49, 7-16.

- Chantrey J., Meyer H., Baxby D., Begon M., Bown K.J., Hazel S.M., Jones T., Montgomery W.I., Bennett M., 1999: Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol. Infect.* 122, 455-460.
- Chen H.D., Fraire A.E., Joris I., Brehm M.A., Welsh R.M., Selin L.K., 2001: Memory CD8⁺ T cells in heterologous antiviral immunity and immunopathology in the lung. *Nat. Immunol.* 2(11), 1067-1076.
- Czerny C.-P., Eis-Hübinger A.M., Mayr A., Schneeweis K.E., Pfeiff P.: Animal poxviruses transmitted from cat to man: current event with lethal end. *J. Vet. Med. B*, 1991, 38, 421-431.
- Czerny C.-P., Wagner K., Gessler K., Mayr A., Kaaden O.-R., 1996: A monoclonal blocking ELISA for detection of orthopox virus antibodies in feline sera. *Vet. Microbiol.* 52, 185-200.
- Damaso C.R., Esposito J.J., Condit R.C., Moussatche N., 2000: An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* 277, 439-449.
- Demkovicz W.E., Littau R.A., Wang J., Ennis F.A., 1996: Human cytotoxic T-cell memory : long-lived responses to vaccinia virus. *J. Virol.* 70 (4), 2627-2631.
- El-Ad C., Roth Y., Winder A., Tochner Z., Lublin-Tennenbaum T., Katz E., Schwartz T., 1990: The persistence of neutralizing antibodies after revaccination against smallpox. *J. Infect. Dis.* 161 (3), 446-448.
- Esposito J.J., Fenner F., 2001: Chapter 85: Poxviruses. In: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman and S. E. Straus, Eds, *Fields Virology*, Fourth Edition, Volumes 1 and 2. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 2885-2921.
- Essbauer S., Meyer H., Kaaden O.-R., Pfeffer M., 2002: Recent cases in the German poxvirus consular laboratory. *Rev. Med. Vet.* (in press)
- Fenner F., Wittek R., Dumbell K.R., 1989: *The orthopoxviruses*. Academic Press Inc., London, 1989.
- Gassmann U., Wyler R., Wittek R., 1985: Analysis of parapoxvirus genomes. *Arch. Virol.* 83, 17-31.
- Hazel S.M., Bennett M., Chantrey J., Brown J., Cavanagh R., Jones T.R., 2000: A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: cowpox and wild rodents. *Epidemiol. Infect.* 124, 551-562.
- Henderson D.A., Moss B., 1999: Chapter 6. Smallpox and Vaccinia. In: Plotkin S. A., Orenstein W.A.: *Vaccines*. W.B. Saunders Company, Philadelphia [<http://www.ncbi.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowSection&rid=vacc>].
- Huggins J.W., Baker R.O., Martinez M.J., Hostetler K.Y., Beadle J.R., Hensley L.E., Jahrling P.B., 2002: Status of the IV cidovir (Vistide™) and orally active ether lipid prodrugs for the treatment of smallpox resulting from abioterrorist or biowarfare attack. XIVth International Poxvirus and Iridovirus Workshop, September 20-25, Lake Placid/New York, S. 117.
- Inoshima Y., Murakami K., Yokoyama T., Sentsui H., 2001: Genetic heterogeneity among parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capricornis srispus*). *J. Gen. Virol.* 82, 1215-1220.
- Kaplan C., Healing T.D., Evans N., Healing L., Prior A., 1980: Evidence of infection by viruses in small British field rodents. *J. Hyg. (Lond)*. 84(2), 285-94.
- Lal S.M., Singh I.P., 1977: Buffalopox-a review. *Trop. Anim. Health Prod.* 9, 107-112.
- Lard S.L., Roehrig J.T., Pearson L.D., 1991: Differentiation of parapoxviruses by application of virus-specific monoclonal antibodies against cell surface proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28, 247-258.
- Mahnel H., 1991: Katzenpocken in Deutschland. *Tierärztl. Prax.* 19, 419-422.
- Mahnel H., Mayr A., 1994: Experiences with immunization against orthopoxviruses of humans and animals using vaccine strain MVA. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 107, 253-256.
- Marennikova S.S., Ladnyj I.D., Ogorodnikova Z.I., Shelukhina E.M., Maltseva N.N., 1978: Identification and study of a poxvirus isolated from wild rodents in Turkmenia. *Arch. Virol.* 56, 7-14.

- Mayr. A., 1999: Geschichtlicher Überblick über die Menschenpocken (Variola), die Eradikation von Variola und den attenuierten Pockenstamm MVA. Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 112, 322-328.
- Mayr A., Munz E., 1964: Changes in the vaccinia virus through continuing passages in chick embryo fibroblast cultures. Zentralbl. Bakteriol. 195, 23-35.
- Mayr A., Stickl H., Müller H.K., Danner K., Singer H., 1975: Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. Infection 3, 6-14.
- Mercer A., Fleming S., Robinson A., Nettleton P., Raid H., 1997: Molecular genetic analyses of parapoxviruses pathogenic for humans. Arch. Virol. Suppl. 13, 25-34.
- Meyer H., Pfeffer M., Rziha H.J., 1994: Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of Orthopoxvirus species by polymerase chain reaction. J Gen. Virol. 75, 1975-81.
- Meyer H., Ropp S. L., Esposito J. J., 1997: Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. J. Virol. Methods 64, 217-221.
- Meyer H., Sutter G., Mayr A., 1991: Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. J. Gen. Virol. 72, 1031-1038.
- Moyer R.W., Arif B.M., Black D.N., Boyle D.B., Buller R.M., Dumbell K.R., Esposito J.J., McFadden G., Moss B., Mercer A.A., Ropp S., Tripathy D.N., Upton C., 2000: Poxviridae. In: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (eds.) Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, San Diego, 137-157.
- Müller T., Henning K., Kramer M., Czerny C.P., Meyer H., Ziedler K., 1996: Seroprevalence of orthopox virus specific antibodies in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the Federal State Brandenburg. J. Wildl. Dis. 32 (2), 348-353.
- Paiba G.A., Thomas D.R., Morgan K.L., Bennett M., Salmon R.L., Chalmers R., Kench S.M., Coleman T.J., Meadows D., Morgan-Capner P., Softley P., Sillis M., Green L.E., 1999: Orf (contagious pustular dermatitis) in farmworkers: prevalence and risk factors in three areas of England. Vet. Rec. 145(1), 7-11.
- Pfeffer M., Burck G., Meyer H., 1999: Kuhpockenviren in Deutschland: Eine Analyse von 5 Fällen aus dem Jahr 1998. Berl. Munch. Tierärztl. Wschr. 112 (9), 334-338.
- Pfeffer M., Pflerhaar S., von Bomhard D, Kaaden O.-R., Meyer H., 2002: Retrospective investigation of feline cowpox in Germany. Vet. Rec. 150, 50-51.
- Robinson A.J., Mercer A.A., 1995 : Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus. Virology 208, 812-815.
- Sentsui H., Murakami K., Inoshima Y., Shibahara T., Yokomizo Y., 1999: Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon- γ . Vet. Microbiol. 70, 143-152.
- Stickl H., Hochstein-Mintzel V., Mayr A., Huber H.C., Schäfer H., Holzner A., 1974: MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA). Dtsch. Med. Wschr. 99, 2386-2392.
- Thomsett L.R., Baxby D., Denham E.M., 1978: Cowpox in the domestic cat. Vet. Rec. 103(25), 567.
- Yilma T., 1995: Vaccinia virus recombinant vaccines for rinderpest. Dev. Biol. Stand. 84, 201-208.