

Der Katzenfloh *Ctenocephalides felis* als viraler Vektor

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Michael Vobis
aus Ratingen

Ratingen 2006

Aus dem Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Mehlhorn
Korreferent: Prof. Dr. J. D'Haese

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 2007

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Flöhe	1
1.1.1 Der Katzenfloh <i>Ctenocephalides felis</i>	2
1.1.2 Entwicklungszyklus des Katzenflohs	3
1.1.3 Flöhe als Überträger und Auslöser von Krankheiten	4
1.2 Viren	6
1.2.1 Retroviren	7
1.2.2 Das feline Leukosevirus (FeLV)	8
1.2.3 Endogenes und exogenes FeLV und seine drei Subtypen	10
1.2.4 Klinischer Nachweis des FeLV	11
1.2.5 Übertragung des FeLV	11
1.2.6 Pathogenese einer FeLV-Infektion	12
1.3 Caliciviren	13
1.3.1 Das feline Calicivirus (FCV)	13
1.3.2 Klinischer Nachweis des FCV	14
1.3.3 Übertragung des FCV	14
1.3.4 Pathogenese einer FCV-Infektion	15
1.4 Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Lösungen und Zellkulturmedien	17
2.2 Primer	18
2.3 Aufzucht und Haltung des Katzenflohs	19
2.3.1 Der „Artificial Dog“	19
2.3.2 Umweltbedingungen	20
2.3.3 Umsetzen der Flöhe	21
2.3.4 Waschen der Flöhe	21

2.3.5	Absammeln der Floheier	21
2.3.6	Bebrüten der Floheier	22
2.3.7	Fütterung und Aufzucht der Flohlarven	22
2.4	Präparation genomischer Floh-DNA	22
2.5	DNA- und RNA-Quantifizierung durch UV-Absorption	23
2.6	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA (PCR)	24
2.7	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.8	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	25
2.9	System zur Quantifizierung des felines Leukose- und Calicivirus	25
2.9.1	RNase Behandlung der Proben	26
2.9.2	Präparation viraler RNA	27
2.9.3	Beseitigung von DNA-Kontaminationen in Präparationen viraler RNA	28
2.9.4	Reverse Transkription viraler RNA (RT-PCR)	29
2.9.5	Quantitative Real-time PCR (qPCR) mit SYBR Green I	30
2.9.6	Minimierung von DNA-Kreuzkontaminationen mit Uracil-N-Glykosylase (UNG)	32
2.9.7	Schmelzkurvenanalyse	32
2.9.8	Übersicht der Real-time PCR Programme	34
2.9.9	Berechnung absoluter FeLV- und FCV-Mengen	34
2.9.10	Herstellung eines RNA-Standards für die qPCR	35
2.10	Qualitativer Nachweis des FeLV und FCV	36
2.11	Techniken der Zellkultur	38
2.11.1	FeLV-3281 Lymphoblasten	38
2.11.2	CRFK-Zellen zum Nachweis infektiöser FC-Viren	38
2.11.3	Passagieren / Splitten der Zellen	39
2.11.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
2.11.5	Test auf infektiöse Viruspartikel mit Clone-81 und CRFK-Zellen mit Diethylaminoethyl-Dextran	40
2.12	Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop	40

3. Ergebnisse	41
3.1 Quantifizierung des felines Leukose- und Calicivirus im Floh und Flohkot	41
3.1.1 Zeitabhängige Quantifizierung des FCV im Floh	43
3.1.2 Zeitabhängige Quantifizierung des FCV im Flohkot	49
3.1.3 Zeitabhängige Quantifizierung des FeLV im Floh	51
3.1.4 Zeitabhängige Quantifizierung des FeLV im Flohkot	55
3.2 Titerabnahmegeschwindigkeit des FeLV und FCV im Floh und Flohkot	58
3.3 Verhältnis vom Floh aufgenommener und ausgeschiedener FeL-Viren	61
3.4 Annäherungsweise Berechnung des Aufnahmevolumentens an Blut eines Katzenflohs	63
3.5 <i>In vitro</i> Infektiositätstests mit dem FeLV und FCV im Floh und Flohkot	64
3.5.1 Infektiosität FCV-infizierter Flöhe	64
3.5.2 Infektiosität von FCV-infiziertem Flohkot	68
3.6 Nachweis einer <i>in vitro</i> Übertragung des FCV und FeLV durch den Katzenfloh	71
3.7 <i>In vivo</i> Infektiositätstests mit dem FeLV	73
3.7.1 Nachweis einer <i>in vivo</i> Übertragung des FCV durch den Katzenfloh	76
3.7.2 Nachweis einer <i>in vivo</i> Übertragung des FCV durch den Kot des Katzenflohs	79
4. Diskussion	82
4.1 Der Katzenfloh als viraler Vektor <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	82
4.2 Der Kot virusinfizierter Katzenflöhe als Infektionsquelle <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	94
4.3 Die Versuche mit dem Katzenfloh im Hinblick auf Flöhe im Allgemeinen	101
4.4 Ausblick und Bedeutung	102

5. Zusammenfassung	104
6. Abstract	105
7. Abkürzungen	106
8. Literatur	108
9. Danksagung	118
10. Erklärung	119

1. Einleitung

1.1 Flöhe

Flöhe gehören zur Ordnung der Siphonaptera und sind holometabole, flügellose Insekten mit lateral abgeflachtem Körper, die als blutsaugende Ektoparasiten stechend-saugende Mundwerkzeuge besitzen (Rommel et al. 2000). Flöhe parasitieren auf Säugern und Vögeln, wobei ihnen der abgeflachte Körper eine problemlose Fortbewegung zwischen Haaren bzw. Federn ermöglicht. Da Flöhe den Wirt meist nur zur Nahrungsaufnahme aufsuchen, werden sie als temporäre Ektoparasiten bezeichnet. Anderen Untersuchungen zu Folge sind sie jedoch als permanente Parasiten ihres Wirtes zu betrachten (Elbel 1951; Deoras und Prasad 1967; Dryden 1989; Dryden 1994). Meist lebt der größte Anteil einer Flohpopulation auf dem Boden, während der effektive Flohbefall des Wirtes meist nur 5% der gesamten Flohpopulation ausgeht (Dryden und Rust 1994). Flöhe umfassen dabei weltweit mehr als 3000 verschiedene Arten, von denen 95 % auf Säugern und 5 % auf Vögeln leben (Lewis 1993; Borror 1981). Die einzelnen Körpersegmente sind nicht besonders deutlich voneinander abgegrenzt. Eine morphologische Auffälligkeit sind die ausgeprägten „Sprungbeine“, mit denen Flöhe weite, aber ungerichtete Sprünge vollführen können. Flöhe sind je nach Art zwischen 1 und 6 mm groß. Alle Versuche innerhalb dieser Arbeit wurden mit dem Katzenfloh *Ctenocephalides felis* durchgeführt, weshalb im Folgenden überwiegend auf diese Art eingegangen werden soll.

1.1.1 Der Katzenfloh *Ctenocephalides felis*

Der Katzenfloh gehört zur Gattung *Ctenocephalides*, deren Vertreter sog. Ctenidien besitzen, 2 Stachelkämme am Kopf und ersten Thorakalsegment. Diese 2 Kämme, Genal- und Pronotalkamm genannt, besitzen 7 bis 9 Dorne pro Seite (Ménier und Beaucournu 1998). Da der Katzenfloh nicht streng wirtsspezifisch ist, findet man ihn auf vielen Wirtstieren, wie z.B. Igel, Hund oder auch Ratten. Ebenso kann er den Menschen befallen. Er ist daher die am häufigsten verbreitete Flohart in Deutschland. Katzenflöhe sind hastige Blutsauger, d.h. sie lassen sich beim Blutsaugen leicht stören, wandern dann ein Stück weiter und stechen erneut



Abbildung 1: Habitus eines des Katzenflohs *Ctenocephalides felis*. Auffällig sind die langen Sprungbeine, mit denen der Floh ungerichtete Sprünge vollführen kann. Zu erkennen ist ebenfalls der mit Blut gefüllte Darm des Tieres.

1.1.2 Entwicklungszyklus des Katzenflohs

Der Entwicklungszyklus des Katzenflohs umfasst fünf Stadien, deren Entwicklungsdauer stark von den Umweltbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchte abhängig ist. Nach der Paarung legt das Flohweibchen 11 bis 50 Eier pro Tag (Osbrink und Rust 1984; Dryden 1988; Dryden 1989; Hink et al. 1991). Die weißen, ca. 0,5 x 0,3 mm großen Eier werden dabei überwiegend auf dem Wirt abgelegt (Rust und Dryden 1997). Der Katzenfloh kann sich auch von menschlichem Blut ernähren, wobei das Flohweibchen dann aber weniger Eier produziert (Pullen und Meola 1995). Der Zeitraum bis zum Schlupf der Eier ist stark abhängig von Temperatur und Luftfeuchtigkeit, liegt aber meist bei 10 Tagen. Aus den Eiern schlüpfen fußlose Flohlarven, die man aufgrund ihrer Borsten am Körper auch als „Drahtwurm“ bezeichnet. Flohlarven besitzen kauende Mundwerkzeuge und sind frei lebend (Dryden und Reid 1993; Urquhart et al. 1987).

Beim Katzenfloh gibt es drei Larvenstadien (L1 bis L3), die sich auf dem Boden in der Umgebung des Wirtes entwickeln (Blagburn et al. 1994). Flohlarven ernähren sich überwiegend vom Kot der Adulten, wodurch ihre Farbe ins Bräunliche umschlägt (Strenger 1973; Rommel et al. 2000). Das Larvenstadium dauert je nach Umweltbedingung 5 bis 11 Tage. Die L3 spinnt dann mit Hilfe ihrer Speicheldrüsen einen seidenartigen Kokon, in dem sie sich verpuppt (Lyons 1915; Karandikar und Munshi 1950; Joseph 1981). Der Kokon ist für die Verpuppung nicht zwingend erforderlich. Wird die Larve während des Einspinnens gestört, kann die Kokonbildung entfallen, so dass eine nackte Puppe entsteht (Dryden und Smith 1994). Auf die Puppe folgt das Stadium der Adultenvorstufe.

Dieses auch als „preemerged adult“ (preemerged = vor dem Erscheinen) bezeichnete Entwicklungsstadium ermöglicht dem Floh ein Überleben bei Abwesenheit eines Wirtes und nicht optimalen Umgebungsbedingungen (Metzger und Rust 1996; Silverman und Rust 1985). Die Adultenvorstufe kann bis zu sechs Monate andauern (Dryden und Reid 1996).

Durch Erschütterungen als Folge der Bewegung eines potentiellen Wirtes schlüpft der adulte Floh und sucht seinen Wirt mit Hilfe von CO₂-Konzentration oder Temperatur auf (Osbrink und Rust 1985). Adulte zeigen positive Photo- und negative Geotaxis (Dryden 1988). Auf dem Wirt beginnt der Floh sofort mit der Blutaufnahme. Nach der ersten Blutmahlzeit muss der Floh kontinuierlich Blut zu sich nehmen, um seinen Metabolismus aufrechtzuerhalten (Baker 1985). Eine Blutmahlzeit dauert 2-10 Minuten (Rothschild 1975) und befähigt die Weibchen, zahlreiche Eier zu legen. Die Blutmahlzeit ist für die Eiablage obligatorisch.

1.1.3 Flöhe als Überträger und Auslöser von Krankheiten

Als einfachste Folge eines Flohbefalls tritt eine Flohspeichelallergie oder eine Dermatitis auf (Baker und O`Flanagan 1975; Halliwell et al. 1987; Muller et al. 1983). Ein Massenbefall von z.B. Jungtieren kann eine Anämie, unter Umständen sogar mit Todesfolge bewirken (Yeruham et al. 1989). Die zahlreichen Stiche der Flöhe stellen zusätzlich eine Eintrittspforte für pathogene Viren, Bakterien und Pilze dar (Keep 1983). Als blutsaugende Parasiten sind Flöhe allerdings generell als geeignete Vektoren für Krankheitserreger anzusehen, da sie Pathogene durch die gelegentlich vorkommenden Wirtswechsel beim nächsten Saugakt auf einen neuen Wirt übertragen können (Genchi 1992).

Der Floh überträgt z.B. den Erreger des Typhus (Azad und Beard 1998). Zu „Weltruhm“ gelangte der Rattenfloh *Xenopsylla cheopis* als einer der Überträger des Pestbakteriums *Yersinia pestis* (Engelthaler et al. 2000). Eine Besonderheit bei der Übertragung des Pestbakteriums durch den Floh ist dabei die sog. Regurgitation. Damit wird eine Art „Erbrechen“ von Darminhalt in die Stichwunde bezeichnet. Der Floh nimmt dabei nicht nur Blut des Wirts auf, sondern regurgitiert auch einen Teil wieder in die Stichwunde zurück.

Dabei muss jedoch erwähnt werden, dass sich das Pestbakterium zuvor massenhaft im Vorderdarm des Flohs vermehrt und diesen dadurch verstopft. Ob Flöhe generell bei einer Blutmahlzeit regurgitieren, ist experimentell bisher nicht bewiesen, jedoch wäre dies ein wichtiger Faktor bei der Übertragung von Pathogenen.

Der Floh muß jedoch nicht zwingend stechen, um Krankheiten und Pathogene zu übertragen. Auch die Funktion des Flohs als Zwischenwirt für Bandwürmer wurde nachgewiesen, so z.B. den Hundebandwurm *Dipylidium caninum* (Hinaidy 1991). So ist die Infektion mit *Dipylidium caninum* durch Verschlucken und Zerbeißen von infizierten Flöhen nicht nur für Hund und Katze, sondern auch für den Menschen (meist Kinder) von Bedeutung (Marx 1991; Minnaar und Krecek 2001). Eine flohbedingte Infektion mit dem nicht pathogenen Nematoden *Dipetalonema reconditum* wurde ebenfalls beschrieben (Georgi 1990). Aus dem Bereich der viralen Übertragung ist zumindest bekannt, daß das Friend Leukemia Virus (FLV) und das Myxomatosevirus wilder und domestizierter Kaninchen durch Flöhe übertragen werden können (Jellison 1959). In Großbritannien ist der Kaninchenfloh *Spilopsyllus cuniculi* Hauptvektor dieser als Myxomatose bezeichneten, tödlich verlaufenden Nagerkrankheit (Mead-Briggs und Vaughan 1975).

Das Potential des Flohs als Vektor von Viren und insbesondere deren Stabilität bzw. Infektiosität im Floh sind ansonsten jedoch weitgehend unbekannt. Diese könnten aktiv (durch den Flohstich bzw. den Flohspeichel) oder passiv (z.B. durch den massenhaft produzierten Flohkot bzw. durch kontaminierte Mundwerkzeuge) übertragen werden. Letzteres wäre jedoch nur dann möglich, wenn Viren die Darmpassage im Floh ohne Infektiositätsverlust überstehen. Ob dies möglich ist, soll unter anderem in dieser Arbeit untersucht werden.

1.2 Viren

Der Begriff Virus leitet sich von dem lateinischen Wort für Gift ab. Wurden bis zu Anfang des 20. Jahrhunderts infektiöse Erreger aller Art generell als Viren bezeichnet, so ist der Begriff nunmehr auf bestimmte infektiöse Partikel begrenzt. Diese Partikel besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und sind zur Vermehrung bzw. Replikation auf die Hilfe einer Wirtszelle angewiesen, die sie zuvor infizieren müssen.

Alle Viren sind daher vollständig abhängig von den Strukturen und Mechanismen ihrer jeweiligen Wirtszelle. Man kann sie daher als obligat intrazelluläre Schmarotzer ansehen, da sie sich des Replikationsapparates ihrer Wirtszelle bedienen müssen und dabei ebenso Ressourcen der Zelle verbrauchen. Viren weisen somit nicht alle Merkmale des Lebens auf. So zeigen sie zwar Reproduktion, Vererbung und Mutation, jedoch fehlt ihnen jeglicher Stoffwechsel und eine eigenständige Vermehrung (Viren vermehren sich nicht, sondern werden vermehrt).

Die kleinsten bekannten Viren sind 20 nm groß und damit kleiner als Ribosomen (z.B. Parvoviren). Andere, so z.B. die Pockenviren, erreichen Größen von bis zu 450 nm und damit ungefähr die Größe einer Bakterienzelle. Allen Viren ist jedoch gemein, dass sie sich aus 2 Grundbestandteilen zusammensetzen: Nukleinsäuren und Proteinen. Das Genom eines Virus kann in Form von DNA oder RNA vorliegen, wobei diese Nukleinsäure wiederum als Einzelstrang oder Doppelstrang auftreten kann. Bei Einzelstrang-RNA kann diese wiederum in negativer oder positiver Polarität vorliegen, bei letzterer Art also direkt als mRNA fungieren. Weiterhin bestehen alle Viren aus Proteinen, die das Capsid formen, einen Hohlkörper, in dem die Nukleinsäure eingelagert ist. Das Capsid selbst besteht aus symmetrisch angeordneten Untereinheiten, den Capsomeren und kann eine kubische, helikale oder komplexe Symmetrie aufweisen.

Die Einheit aus Genom und Capsid wird als Nukleocapsid bezeichnet, in dessen Inneren das Genom des Virus vor schädigenden Umwelteinflüssen und Abbau durch Nukleasen geschützt ist. Bei RNA-Viren liegt die Genomgröße zwischen 7 Kb und 20 Kb, bei DNA Viren innerhalb einer größeren Spannbreite zwischen 3 Kb und 200 Kb. Die kleineren Genome der RNA-Viren sind offensichtlich Folge der fehlenden Proof-Reading Funktion bei der RNA-Replikation, aus der sich eine erhöhte Mutationsrate für RNA-Viren ergibt.

Bei einigen Virustypen ist das Nukleocapsid zusätzlich von einer Lipidmembran umschlossen. Diese Membranhülle, in die neben zellulären vorwiegend viruskodierte Proteine eingelagert sind, stammt von der Wirtszelle. Besitzt ein Virus eine solche äußere Lipiddoppelschicht, wird es als umhüllt bzw. als „enveloped“ bezeichnet. Fehlt sie, spricht man von einem unbehüllten oder „non-enveloped“ Virus. Vertreter der behüllten Viren ist unter anderem die Familie der Retroviren.

1.2.1 Retroviren

Unter den RNA-Viren nehmen die Retroviren eine Sonderstellung ein. In den 70er Jahren entdeckten Howard Temin und David Baltimore, dass genetische Information nicht nur von DNA zu RNA, sondern auch umgekehrt fließen kann (Baltimore 1970; Temin & Mizutani 1970). Sie widerlegten damit das jahrelang postulierte sog. „zentrale Dogma“ der Genetik, nach dem genetische Information nur von DNA zu RNA fließt. Die Entdeckung dieses umgekehrten Informationsflusses wurde dann für die Retroviren namensgebend (lateinisch retro=zurück). Retroviren besitzen unter den Viren den komplexesten Reproduktionszyklus. Sie sind stets behüllt und besitzen 2 Einzelstrang-RNA Moleküle als Genom in positiver Polarität. Ihre Größe variiert zwischen 80 und 120 nm. Innerhalb des Capsids liegt ein besonderes Enzym: die reverse Transkriptase.

Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase transkribiert Einzelstrang-RNA in einen Doppelstrang RNA-DNA Hybrid. Zusätzlich besitzt sie eine RNase H Aktivität, welche die RNA in diesem Hybrid hydrolisiert. Der so entstandene, zu der RNA komplementäre DNA Strang (cDNA) wird nun in das Genom der Wirtszelle als sog. Provirus integriert. Die Integration bewerkstelligt ein Enzym namens Integrase. Das Provirus ist fortan fester Bestandteil der Wirtszelle. Die RNA-Polymerase des Wirts transkribiert nun diese provirale DNA dann in ein RNA-Molekül, welches einerseits als mRNA, andererseits als Baustein für das Zusammensetzen neuer Viren (sog. Assembly) benutzt wird. Retroviren werden von einer infizierten Zelle durch Knospung (sog. Budding) freigesetzt und umgeben sich während dieser Abschnürung mit der für sie charakteristischen Hülle, einem Teil der zellulären Plasmamembran.

Retroviren können sowohl human- und tier- als auch pflanzenpathogen sein. Ein bedeutender und weltweit bekannter humanpathogener Vertreter der Retroviren ist z.B. das HIV (Human Immunodeficiency Virus), welches die erworbene Immunschwäche AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) hervorruft. Aufgrund der Integration in das Wirtszellgenom haben Retroviren häufig transformierende Auswirkungen auf die Wirtszelle. Diese Eigenschaft kann auf einer Enhancer-Funktion der Provirus-Sequenz für benachbarte, zelleigene Gene beruhen, so dass diese sog. Proto-Onkogene zu Onkogenen werden. Ein solch zelltransformierendes Retrovirus ist das feline Leukämievirus (FeLV), das die sog. Katzenleukose auslösen kann.

1.2.2 Das feline Leukosevirus (FeLV)

Das feline Leukämievirus wurde zum ersten Mal 1964 in Schottland bei einer Katze entdeckt bzw. isoliert (Jarrett et al. 1964). Das Virus infiziert die Familie der Feliden, wurde den Gammaretroviridae zugeordnet und zählt zu den oncogenen Retroviren (Luzt 1990). Das FeLV ist ein weltweit verbreitetes Virus. Die Durchseuchung der Katzen in Europa, den USA, Kanada, Taiwan und Japan variiert zwischen 1,3 % und 11,5 % (Miyazawa 2002).

Das Genom des FeLV besteht aus zwei einzelsträngigen, linearen RNA-Molekülen von 8,44 kB in positiver Polarität (Miyazawa 2002). Es beinhaltet dabei die für alle Retroviren typischen drei Hauptgene *gag*, *env* und *pol* und die flankierenden LTR-Sequenzen, die sog. Long Terminal Repeats (Donahue et al. 1988). Die LTR's enthalten Steuersequenzen zur viralen Genexpression und unterteilen sich wiederum in drei Regionen, die mit U3, R und U5 bezeichnet werden (Donahue et al. 1988). Da diese Sequenzabschnitte hochkonserviert sind, liegen die in dieser Arbeit zur Detektion des FeLV mittels PCR verwendeten Primer innerhalb dieser Regionen. Das *gag*-Gen codiert für Bestandteile des Capsids, vornehmlich das Capsidprotein p27 und das Nukleokapsidprotein p10 (Stephenson et al. 1977). Das *pol*-Gen enthält die Informationen für die vom Virus benötigten Enzyme, allen voran der Reversen Transkriptase, Integrase und Protease (Hardy 1981). Das *env*-Gen ist unter anderem für die Bildung des Proteins gp70 der Virushülle verantwortlich (Miyazawa 2002). Abbildung 1 zeigt einen schematischen Überblick über den Aufbau des FeLV-Genoms.

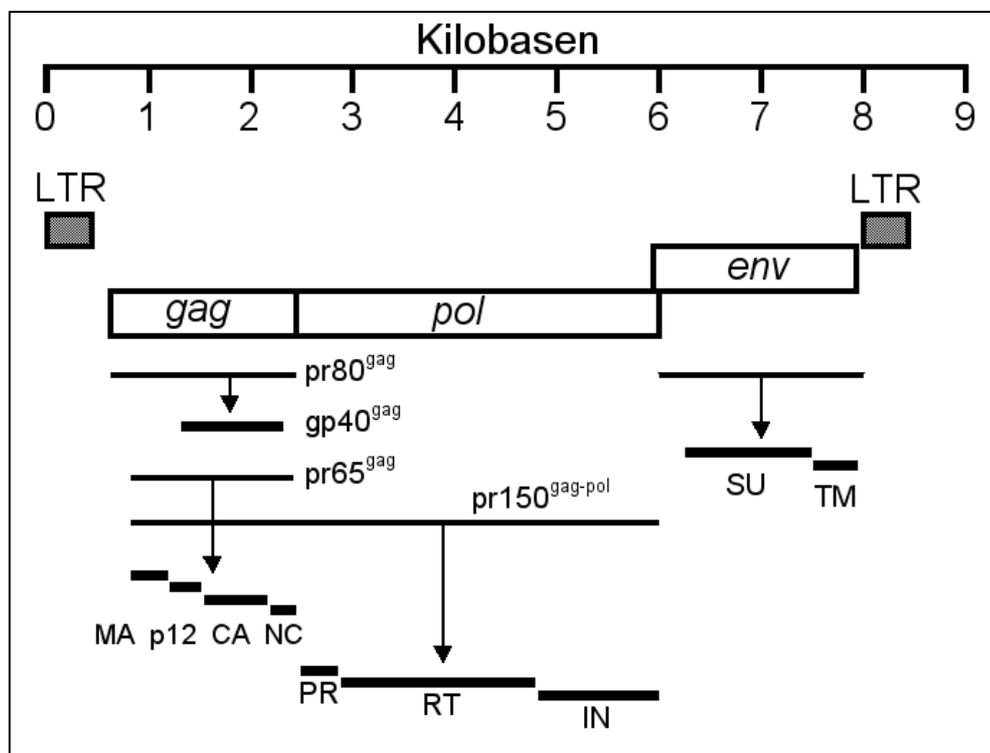


Abbildung 2: Genomorganisation des FeLV. Das *gag* Gen codiert das Matrixprotein p15 (MA), das Protein p12 (unbekannte Funktion), das Kapsidprotein p27 (CA), das Nukleo-kapsidprotein p10 (NC) und das glykosyliertes Gag-Protein (gp40^{gag}). Das *pol* Gen codiert die Enzyme Protease (PR), die Reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN). Das *env* Gen codiert die Oberflächenproteine (SU) und Transmembran-Proteine (TM). Nach Miyazawa et al. 1997.

Aufgrund von Sequenzvariationen des *env*-Gens können strukturelle Unterschiede des gp70-Proteins entstehen, die zu einer unterschiedlichen Antigenität und damit auch Wirtsspezifität führen (Essex 1975; Sarma et al. 1975). Diese veränderte Antigenität ist auch verantwortlich für das Auftreten sog. Subtypen des FeLV, die sich also lediglich in der Zusammensetzung der Virushülle unterscheiden. Die Replikation des FeLV erfolgt nach dem für Retroviren typischen Ablauf wie unter 1.2 beschrieben.

1.2.3 Endogenes und exogenes FeLV und seine drei Subtypen

Das Genom einer jeder Haus- und einiger Wildkatzen beinhaltet Sequenzen, die dem des FeLV verwandt sind (Benveniste et al. 1975; Benveniste und Sherr 1975; Okabe et al. 1976). Diese Sequenzen werden als endogenes FeLV (enFeLV) bezeichnet. Das endogene FeLV muss daher vom exogenen FeLV (exFeLV), also dem eigentlich übertragbaren und infektiösen Virus, unterschieden werden. Die endogene FeLV Sequenz wird nur in Form von subgenomischen Transkripten exprimiert, was daher keine infektiösen Viren erzeugt (Bush et al. 1983; Niman et al 1980). Der Vollständigkeit halber muß erwähnt werden, dass das Vorkommen endogener Retroviren keinesfalls nur auf Katzen beschränkt ist, sondern sich bei vielen Tierarten finden lässt. Als Beispiel seien die PERVs (porcine endogene Retroviren) beim Schwein oder die HERVs (humane endogene Retroviren) beim Menschen erwähnt.

Wie unter 1.2.2 ausgeführt wurde, kann eine Sequenzvariation des *env*-Gens im FeLV-Genom zu einer veränderten Antigenität führen. Mit Hilfe eines Interferenz- und Neutralisationstests kann diese unterschiedliche Antigenität differenziert und das FeLV daher in die drei Subtypen A, B und C unterteilt werden (Sarma und Log 1973). Einzig Subtyp A ist die übertragbare Form des FeLV und wird daher als „stabiler“ Prototyp bezeichnet. Aus ihm gehen jeweils die beiden anderen Subtypen hervor. Subtyp B entsteht *in vivo* durch Rekombination des FeLV-A mit den Sequenzen des enFeLV (Stewart et al. 1986; Overbaugh et al. 1988).

Das FeLV-C entsteht aus einer Mutation des env-Gens des FeLV-A (Rigby et al. 1992). Aufgrund dieses Sachverhalts wurden alle Versuche in dieser Arbeit mit dem FeLV Subtyp A durchgeführt, da er dem in der Natur transmissiblen und infektiösen Virus entspricht.

1.2.4 Klinischer Nachweis des FeLV

Der Nachweis einer FeLV-Infektion erfolgt heutzutage durch ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Schnelltests, die auf diesem System basieren, detektieren das p27 des FeLV. Das p27-Antigen lässt sich im Serum, Plasma, Speichel, Knochenmark, Tränenflüssigkeit und in allen infizierten Geweben einer FeLV-infizierten Katze nachweisen (Hardy 1991). Es wird zum Nachweis einer Infektion bevorzugt, weil es mit 25 % bis 50 % den größten Teil der Masse des FeLV ausmacht (Lutz und Jarrett 1987). Meist wird zum Nachweis eine Blutprobe auf p27 untersucht. Ebenso kann auch ein Immunfluoreszenztest durchgeführt werden, der auf Blutaussstrichen das Antigen im Cytoplasma von Neutrophilen nachweist.

1.2.5 Übertragung des FeLV

Das FeLV ist ein hochinfektiöses Virus, das sich bei infizierten Katzen in allen Körperflüssigkeiten, wie z. B. Blut, Urin, Speichel und sogar der Tränenflüssigkeit nachweisen lässt. Dementsprechend wird das Virus oronasal, also über den Nasen-Rachenraum, durch Nutzung des gleichen Fressnapfes, durch engen Kontakt der Tiere untereinander oder bei Katzenbabys bereits im Mutterleib oder über die Muttermilch übertragen (Hoover & Mullins, 1991). Die Übertragung des FeLV ist also horizontal (von Tier zu Tier), vertikal (von der Mutter auf die Jungen) und transplazentar (im Mutterleib) möglich.

1.2.6 Pathogenese einer FeLV-Infektion

Der Verlauf einer FeLV-Infektion ist entscheidend abhängig vom Alter, dem allgemeinem Gesundheitszustand und der Infektionsdosis (Hardy et al. 1976; Hardy 1980). Nach einer Infektion erfolgt zunächst eine lokale Virusvermehrung (Rojko et al. 1979; Hoover et al. 1980). Einige Katzen können das Virus bereits in diesem Stadium eliminieren. Sie werden als Regressorkatzen bezeichnet. Geschieht dies nicht, kommt es zu einer transienten Virämie, innerhalb der das Virus mit Lympho- und Monozyten in die Blutbahn gelangt, und die bis maximal 16 Wochen andauert. In diesem Stadium kann die Katze eine Immunität gegen das Virus aufbauen und es in der Folge vollständig eliminieren.

Bei Katzen ohne Ausprägung dieser Immunität kommt es nunmehr zu einem Befall des Knochenmarks, was zur Produktion großer Menge freier und zellgebundener Viren im Körper und der Blutbahn führt (Rojko et al. 1982). Auch in diesem Stadium kann durch die zelluläre und humorale Immunantwort das Virus eliminiert werden, so dass das Virus zwar nicht mehr im Blut nachzuweisen ist, jedoch als Provirus in den Knochenmarkszellen verbleibt, was als latente Infektion bezeichnet wird (Rojko et al. 1982). Bei latent infizierten Katzen kann es Jahre nach der eigentlichen Infektion durch Stress oder Immunsuppression erneut zu einer Virämie kommen (Rojko et al. 1982; Neil und Onions 1985).

Bei den meisten Tieren geht die latente Virusinformation jedoch nach ein bis zwei Jahren durch Absterben der Provirus enthaltenden Zellen oder durch DNA-Replikationsfehler bei der Zellteilung verloren (Pacitti und Jarrett 1985; Pacitti 1987). Kann eine Katze das Virus in keiner Phase eliminieren, kommt es zur sog. persistierenden Virämie. Diese Katzen scheiden das Virus lebenslang aus und sterben meist innerhalb der ersten 5 Jahre *post infectionem*. Diese Dauerausscheider sind das Hauptreservoir des FeLV (Aiello und Mays 1998).

Da das Krankheitsbild einer persistierenden FeLV-Infektion vielfältig ist, wird eine Infektion nicht immer korrekt diagnostiziert. Am häufigsten beobachtet werden Blutarmut, Fieber und ständige Durchfälle (Willis, 2000). Die Erkrankung von Organen mit Tumorbildung, insbesondere im Darmtrakt und in den inneren Organen, wird meist nur bei älteren Tieren angetroffen und ist eher selten. Die Namensgebung „Kattenleukose“ ist daher unglücklich gewählt.

1.3 Caliciviren

Der Name der Caliciviren zielt auf eine morphologische Besonderheit des Capsids der Viren hin. Dieses besitzt 32 becher- oder kelchartige Vertiefungen auf seiner Oberfläche, was daher für diese Virusgruppe namensgebend wurde (griechisch calyx = Becher), jedoch nicht bei jedem Calicivirus ausgeprägt sein muss (Clarke und Lambden 1997). Die ikosaedrischen Caliciviren sind im Gegensatz zu den Retroviren unbehüllt, und gehören jedoch ebenso wie diese zu den RNA-Viren. Caliciviren sind mit einer Größe zwischen 35 bis 40 nm sehr viel kleiner als Retroviren und aufgrund der fehlenden Hülle weitaus weniger anfällig gegen Umwelteinflüsse.

1.3.1 Das feline Calicivirus (FCV)

Das feline Calicivirus wurde erstmalig 1957 in Neuseeland entdeckt bzw. isoliert (Fastier 1957). Das Capsid des FCV besteht aus nur einem einzigen Kapsidprotein von 65 kDa Größe, welches die genomische RNA umschließt (Gillespie und Scott 1973). Das Genom selbst besteht aus einem RNA-Molekül in positiver Polarität. Im Genom des FCV fehlen die beim FeLV vorhandenen LTR Sequenzen. Stattdessen befindet sich am 5'-Ende ein vom Virus codiertes Protein, das Vpg (viral protein genome linked), das kovalent mit der RNA verknüpft ist (Herbert et al. 1997).

Das Genom des FCV besteht aus 3 ORF's (open reading frames), von denen der erste der größte ist und für Nichtstrukturproteine codiert (Neill 1990). Der in der Mitte gelegene ORF codiert für einen Precursor des Kapsidproteins, der dritte ORF für ein charakteristisches, stark basisches Protein mit noch nicht vollkommen geklärter Funktion. Die Replikation des FCV erfolgt im Cytoplasma der Wirtszelle. Nach der Freisetzung der RNA kann diese direkt als mRNA für die Virusgene genutzt werden. Der Zusammenbau neuer Viren erfolgt selbstständig, ein Prozess der als „self assembly“ bezeichnet wird. Anders als bei der Replikation des FeLV schnürt sich das FCV jedoch nicht von der Wirtszelle ab, sondern wird durch Zellyse freigesetzt.

1.3.2 Klinischer Nachweis des FCV

Der Nachweis des FCV ist einfach über eine Zellkultur zu führen. Anders als beim FeLV, scheiden mit dem FCV infizierte Katzen das Virus meist durchgehend aus. Es werden daher feline Zellkulturen benutzt, um das infektiöse Virus nachzuweisen (Gillespie und Scott 1973).

1.3.3 Übertragung des FCV

Das FCV wird oronasal übertragen und von infizierten Katzen mit einer Reihe von Körperflüssigkeiten wie z.B. Speichel oder Nasensekret ausgeschieden (Povey und Johnson 1970; Wardley und Povey 1977). Eine Übertragung durch kontaminierte Gegenstände ist ebenso gegeben, wie die direkte Übertragung von Tier zu Tier (Wardley und Povey 1977). Mit dem FCV infizierte Tiere können das Virus auch nach überstandener Infektion über Jahre hinweg ausscheiden (Povey und Hale 1974). Generell ist selbst nach Abklingen der Krankheitssymptome eine Ausscheidung von Viren über einen längeren Zeitraum gegeben (Wardley und Povey 1977). Es kann daher angenommen werden, dass diese Tiere ähnlich den persistent infizierten Katzen beim FeLV als Reservoir des Virus dienen.

1.3.4 Pathogenese einer FCV-Infektion

Vom feline Calicivirus existieren zahlreiche Serovarianten unterschiedlicher Virulenz (Gaskell und Wardley 1978). Als eigentlicher Referenzstamm wird das FCV-F9 angesehen (Knowles et al. 1990). Nachdem sich eine Katze mit dem FCV infiziert hat, vermehrt sich das Virus im Bereich der Infektionsstelle. Daran schließt sich eine transiente Virämie an (Crandell und Madin 1960; Povey 1970), in deren Verlauf das Virus in den Epithelien des Nasen-Rachenraums, der Zunge, dem Gaumen und den Tonsillen repliziert (Bürki 1965; Gillespie und Scott 1973). Eine Infektion mit feline Caliciviren führt häufig zu Geschwüren der Mundschleimhaut und der Zunge (Karpas und Routledge 1968; Flagstad 1973; Wardley und Povey 1977).

Diese Symptome sind bei einigen Katzen die einzigen (Povey und Johnson 1971), während sich bei anderen Katzen schwere interstitielle Pneumonien ausprägen, die bis zum Tode führen können (Kahn und Gillespie 1971; Hoover und Kahn 1973; Wardley und Povey 1977b). Selten sind Entzündungen der Gelenke zu beobachten (Crandell und Madin 1960; Pedersen et al. 1983). Die Dauer einer FCV-Infektion ist unterschiedlich und kann mehrere Wochen oder auch nur Tage andauern (Prydie 1966). In der Praxis finden sich FCV-Infektionen häufig bei Katzenwelpen (Hoover und Kahn 1973; Wardley und Povey 1977) und in Katzenschulen oder Mehrkatzenhaushalten, also dort, wo die Populationsdichte hoch ist. Fast jede Katze hat im Laufe ihres Lebens Kontakt mit mehreren FCV-Stämmen, entwickelt im Laufe ihres Lebens jedoch eine mehr oder weniger ausgeprägte Altersresistenz (Pedersen et al. 1983).

1.4 Zielsetzung

Flöhe parasitieren auf zahlreichen Wirten, darunter auch auf dem Menschen und seinen Haustieren. Als blutsaugende Ektoparasiten stellen sie dabei als Überträger zahlreicher Pathogene, wie z.B. Bakterien oder sogar Bandwürmer, ein beträchtliches Gesundheitsrisiko dar. Die Rolle der Flöhe bei der Übertragung von Viren ist bisher jedoch weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit soll das Potential des Katzenfloh als Vektor von Viren am Beispiel eines feline Retro- und eines feline Calicivirus untersucht werden. Beide Viren sind von veterinärmedizinischer Bedeutung. In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, welcher Mechanismus der Übertragung zugrunde liegt. Von großer Wichtigkeit ist dabei die Frage, ob die Viren die Darmpassage im Floh unbeschadet überstehen und wie lange sie in welchen Mengen im Floh überdauern können. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei der Frage, ob von infizierten Flöhen eine Gefahr nicht nur für den Wirt, sondern auch für die unmittelbare Umgebung ausgeht, so z.B. durch den Flohkot. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit können dabei ebenso für die Einschätzung potentieller Risiken für den Menschen hilfreich sein, so z.B. bei der Übertragung zoonotischer Viren.

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen und Zellkulturmedien

PBS (10 fach)

80 g NaCl
2 g KCl
26,8 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O
2,4 g KH₂PO₄
ad 1 l H₂O pH 7,4

TBE-Puffer (10fach)

108 g Tris-OH
55 g Borsäure
9,3 g Na₂ EDTA x 2 H₂O
ad 1000 ml

TAE (50 fach)

242 g Tris-OH
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH8)
ad 1000 ml

Laufpuffer 6fach

0,02 % Bromphenolblau
0,2 % Xylencyanol
60 mM EDTA
60 % Glycerin

FeLV-3281 Medium (500 ml)

500 ml RPMI-1640 Medium (Sigma, England)
55 ml hitzeinaktiviertes (56 °C für 30 Minuten) FBS (Biochrom)
5 ml Penicillin-/Streptomycinsulfat-Lösung 10.000 IE (Biochrom)

Clone-81 Medium (500 ml)

500 ml DMEM Medium mit 1mg/L Glucose (Biochrom)
55 ml hitzeinaktiviertes (56 °C für 30 Minuten) FBS (Biochrom)
5 ml Penicillin-/Streptomycinsulfat-Lösung 10.000 IE (Biochrom)

CRFK-Medium (500 ml)

500 ml DMEM mit 4,5 g/L D-Glucose und 3,7 g/L NaHCO₃ (Biochrom)
55 ml hitzeinaktiviertes (56 °C für 30 Minuten) FBS (Biochrom)
5 ml Penicillin-/Streptomycinsulfat-Lösung 10.000 IE (Biochrom)
5 ml NEA-Mix 100x (Biochrom)

2.2 Primer

Primer	Sequenz 5'-3'	T _m	Herkunft
Sense-FeLV1	ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC	57,3 °C	Miyazawa und Jarrett 1997
Rev-FeLV1	GACCAGTGATCAAGGGTGAG	59,4 °C	Miyazawa und Jarrett 1997
Sense-FeLV2	GCTCCCCAGTTGACCAGAGT	61,4 °C	Miyazawa und Jarrett 1997
Rev-FeLV2	GCTTCGGTACCAAACCGAAA	57,3 °C	Miyazawa und Jarrett 1997
Fe74Out	ACCTGGGCCCCCGGCT	58,8 °C	Hofmann-Lehmann et al. 2001
Fe74In	GCGGCCTTGAACTTCTGCT	59,4 °C	Hofmann-Lehmann et al. 2001
FCVSen497	AATCTGCATTGGGAGTGTGCA	60,7 °C	Eigene Berechnung
FCVRev497	TAGAGACCTTGATGCTTGACCA	59,5 °C	Eigene Berechnung
FCVSen209	CTGACAAGGTTCTGCAA	53,7 °C	Eigene Berechnung
FCVRev209	TGGCATTGTCTGGGCAGA	57,6 °C	Eigene Berechnung
FCVSen83	TAATTCGGTGTTTGATTTGGCCTGGGCT	65,1 °C	Helps und Harbour 2003
FCVRev83	CATATGCGGCTCTGATGGCTTGAACTG	66,6 °C	Helps und Harbour 2003

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

2.3 Aufzucht und Haltung des Katzenflohs

2.3.1 Der „Artificial Dog“

Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurde der sog. „Artificial Dog“ („Künstlicher Hund“), der Firma FleaData Inc. zur Haltung und Aufzucht des Katzenflohs benutzt (Matthes und Hiepe 1996). Das Gerät stellt einerseits eine für die Flöhe optimale Umgebungstemperatur her, und bietet andererseits spezielle Halterungen für Flohcontainer zur Verfügung, so dass bis zu 104 Flohpopulationen gleichzeitig gefüttert und gehalten werden können. Das Gerät besteht aus einem Acrylkasten mit einem Heizblock, über den ein Ventilator die angewärmte Luft gleichmäßig im Innenraum verteilt. Abbildung 3 soll den Aufbau des Gerätes verdeutlichen.

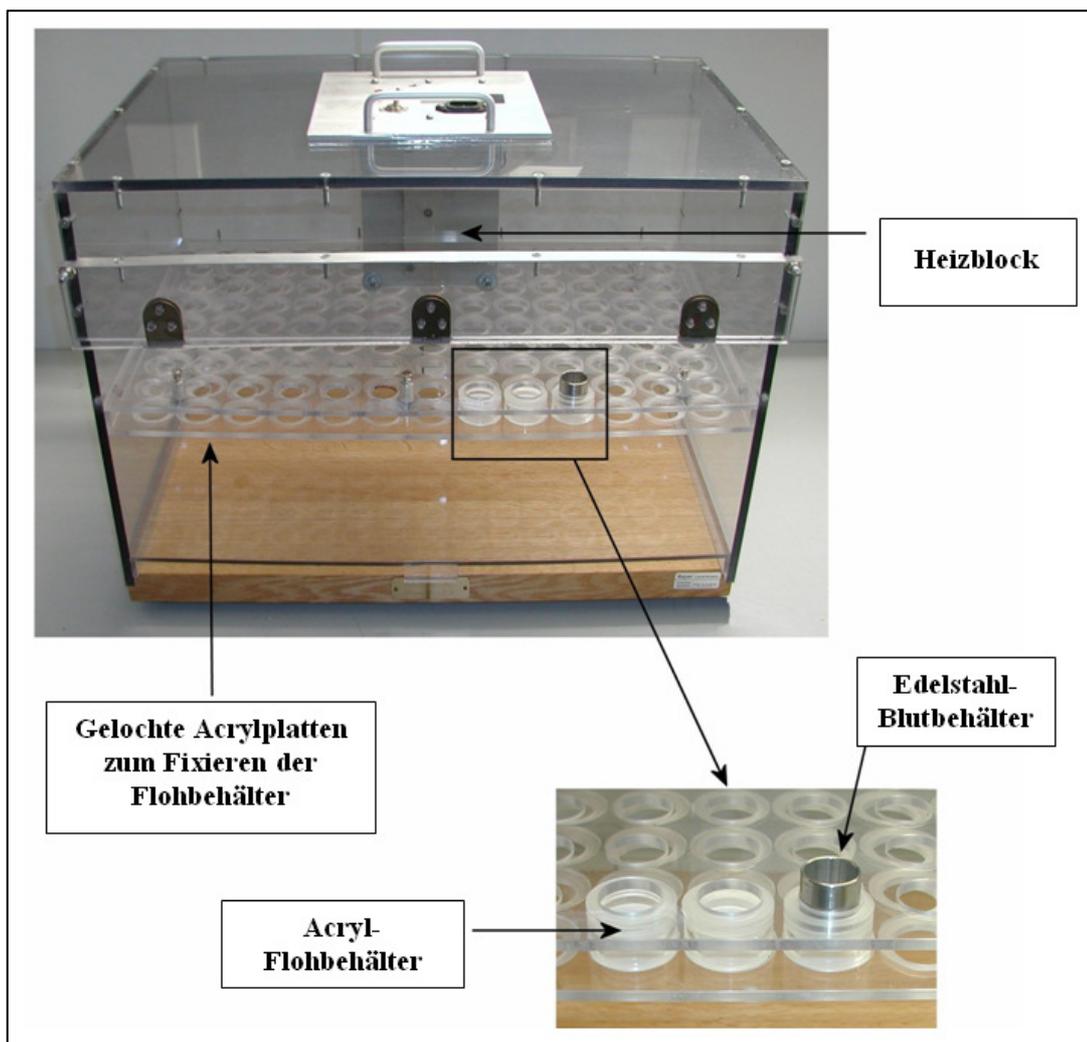


Abbildung 3: Der Aufbau des "Artificial Dog"

Die Flöhe werden in runden Acryl-Behältern gehalten, die zwischen zwei gelochten Platten im Gerät fixiert werden. Diese Flohbehälter sind nach oben und unten durch feine Gaze begrenzt. Die eigentliche Blutquelle wird über dem Flohbehälter angebracht. Dazu wird ein rundes, 2,5 cm hohes und aus Edelstahl bestehendes Rohrstück an einer Seite mit Parafilm als Membran überspannt und mit Blut gefüllt. Der so hergestellte Blutbehälter wird durch die gelochte Platte mit dem Parafilm nach unten auf den Flohbehälter gestellt. Die Flöhe können nun nach oben an die Gaze springen, und durch den Parafilm in die Blutquelle stechen. Da der Flohbehälter wie bereits erwähnt auch von unten mit Gaze verschlossen ist, wird eine Versorgung der Flöhe mit Sauerstoff gewährleistet.

Der Blutbehälter aus Edelstahl wird ständig durch zirkulierende warme Luft vom Heizblock beheizt. Das zur Fütterung der Flöhe verwendete Rinderblut enthielt zur Gerinnungshemmung eine Citrat-Konzentration von 0,8 %. Bei Verwendung anderer Antikoagulanzen wie z.B. EDTA oder Heparin nehmen die Flöhe deutlich weniger Blut zu sich. Oxalat als Gerinnungshemmer erwies sich als völlig ungeeignet, da fast alle Flöhe nach der ersten Blutmahlzeit innerhalb von 24 Stunden sterben.

2.3.2 Umweltbedingungen

Als optimal erwies sich eine Temperatur innerhalb des „Artificial Dog“ von 38 °C. Das Blut im Blutbehälter erwärmt sich dabei auf ca. 36 °C und wird von den Flöhen sehr gut angenommen. Bluttemperaturen unter 32 °C führen zu einer verminderten Aufnahme durch die Flöhe, was wiederum eine verminderte Kotscheidung und Eierproduktion zur Folge hat. Innerhalb des Gerätes wurde eine Glasschale (Durchmesser 14 cm) mit Wasser aufgestellt. Die Luftfeuchte im „Artificial Dog“ lag dadurch zwischen 70% und 80%.

2.3.3 Umsetzen der Flöhe

Um die Flöhe von einem benutzten in einen gereinigten Flohcontainer zu transferieren, ist eine Betäubung der Tiere unumgänglich. Eine Betäubung mit CO₂ erwies sich als ungeeignet, da diese zu schnell an Wirkung verliert, so daß die ersten Flöhe bereits nach 45 Sekunden wieder aus der Betäubung erwachen. Zum Umsetzen wurde daher der gesamte Flohcontainer mit den darin befindlichen Flöhen für 5 bis 10 Minuten bei -20 °C gelagert. Danach konnten die in Kältestarre befindlichen Flöhe problemlos mit einer feinen Pinzette abgesammelt und in einen frischen Container überführt werden. Die Betäubung hielt für mehrere Minuten an. Bei einer größeren Menge an Tieren wurde auf Eis gearbeitet, was die Tiere für mehrere Stunden in der Starre halten kann. Die einmalige Lagerung bei -20 °C sollte nicht länger als 10 Minuten andauern, da sonst ein Großteil der Tiere stirbt.

2.3.4 Waschen der Flöhe

In einigen Versuchen war es nötig, am Floh befindliche Kot- oder Blutreste zu entfernen, so z.B. bei der Virustiterbestimmung im Floh. Um die Flöhe von äußeren Kontaminationen zu reinigen, wurden die jeweiligen Tiere für 10 Minuten bei -20°C betäubt und anschließend mit 20 ml Eiswasser in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gefäß wurde anschließend für 1 Minute geschüttelt. Danach wurde die Flöhe über ein Sieb abgefiltert. Diese Prozedur wurde 3 mal wiederholt.

2.3.5 Absammeln der Floheier

Zum Absammeln der Floheier müssen die Flöhe ebenfalls betäubt bzw. getötet werden. Da die Floheier sehr kälteempfindlich sind, kann eine Betäubung der Flöhe durch Kälte nicht durchgeführt werden. Der Container mit Flöhen und Floheiern wurde daher in ein kleines Plasticaquarium gestellt.

Dieses wurde dann bis zur Sättigung mit CO₂ begast. Danach wurde der Container geöffnet und die Eier wurden vorsichtig mit einer Stahlfederpinzette abgesammelt. Bei ersten Anzeichen des Erwachens der Tiere (Zittern, Beinbewegung) wurde erneut begast. Die Begasung mit CO₂ hatte keinerlei Auswirkungen auf die Eier hinsichtlich ihrer Vitalität, während viele der adulten Flöhe diese langfristige Betäubung mit CO₂ nicht überlebten.

2.3.6 Bebrüten der Floheier

Die abgesammelten Floheier wurden in kleine Plastikboxen überführt, die zum Gasaustausch nach oben hin mit Gaze bespannt wurden. Die Plastikbox wurde in einer Klimakammer bei konstanter Temperatur von 24 °C und einer Luftfeuchte von 65% bebrütet. Der Schlupf der Eier erfolgte in der Regel nach 6 Tagen.

2.3.7 Fütterung und Aufzucht der Flohlarven

Nach dem Schlupf der Eier wurde je nach Versuch reiner Flohkot oder Blutmedium direkt in die Plastikboxen gegeben. Die Larven gruben sich meist unter den Kot bzw. das Medium. Nach einem Tag wurde kontrolliert, ob die Larven Nahrung zu sich nehmen, was an einer Schwarzfärbung der Larve bzw. des Darms zu erkennen war.

2.4 Präparation genomischer Floh-DNA

Für die Präparation genomischer Floh-DNA wurde das DNEasy™ Tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Zur Extraktion wurden je nach Versuch 1-10 Tiere in einem Stahlmörser mit flüssigem Stickstoff für ein bis zwei Minuten schockgefroren und danach zu einem feinen Pulver zermahlen.

Das Pulver wurde in 180 µl Puffer ATL aufgenommen, mit 20 µl Proteinase K Lösung versetzt und für mindestens vier Stunden oder über Nacht zum Gewebeaufschluß bei 55 °C inkubiert. Die so erhaltene Lösung wurde anschließend nach dem Protokoll für tierisches Gewebe laut Herstellerangaben weiterbearbeitet. Nach den Waschsritten wurde die DNA zwei Mal in je 100 µl H₂O eluiert.

Es ist auch möglich, die Tiere ohne Schockfrieren mit einem Homogenisator in einem Eppendorf-Gefäß zu zerreiben und in Lyse-Puffer aufzunehmen, jedoch resultiert daraus eine weitaus niedrigere DNA-Ausbeute. Bei der Präparation von Einzeltieren ist daher auf jeden Fall dem Schockfrieren mit Stickstoff der Vorzug zu geben.

Die einzelnen Flohpopulationen und Arten wurden nach Erhalt bei -80 °C gelagert. Es hat sich dabei gezeigt, daß die DNA-Extraktion allerdings auch aus Tieren extrahiert werden kann, die z. B. in Ethanol für einen Monat bei Raumtemperatur gelagert worden waren. Eine Lagerung bei mind. -20 °C ist jedoch vorzuziehen und erhöht die Ausbeute an DNA, die je nach Größe des Tieres im Mittel bei ein bis zwei Mikrogramm DNA liegt.

2.5 DNA- und RNA-Quantifizierung durch UV-Absorption

Die Bestimmung der Konzentration von DNA- und RNA-Präparationen wurde durch UV-Spektrometrie bestimmt. Dabei wurde eine Präparation gegen einen Puffer- bzw. H₂O-Leerwert gemessen. Eine Extinktion bei 260 nm von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml bei einer DNA- bzw. 40 µg/ml bei einer RNA-Lösung. Die Reinheit einer DNA- bzw. RNA-Lösung (Verunreinigung durch Proteine) kann dabei aus dem Quotienten aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) ersehen werden. Für reine DNA-Präparationen liegt der Quotient bei 1,8 bis 2,0, für eine reine RNA-Lösung bei 1,9 bis 2,2 (Sambrook et al. 1989).

2.6 Polymerase Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA wurde das HotStar Master Mix Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in 30 µl Gesamtvolumen bei folgenden Endkonzentrationen bzw. -mengen durchgeführt:

MgCl ₂	1,5 mM
Template-DNA	200 bis 300 ng
dNTP	200 µM von jedem dNTP
Primer	0.5 µM je Primer

Die Amplifikationen wurde unter Verwendung des folgenden Programmschemas durchgeführt:

1. 95 °C für 15 Minuten (Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase)
2. 94 °C für 30 Sekunden (Denaturierung der dsDNA)
3. Hybridisierungstemperatur für 45 Sekunden
4. 72 °C für 45 Sekunden (Elongation)
5. 30 x Schritte 2 bis 4
6. 72 °C für 10 Minuten (finale Elongation)
7. Kühlung bei 4 °C bis zur Entnahme der Probe

Die Hybridisierungstemperatur wurde auf 5 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaars eingestellt. Die Schmelztemperaturen der Primer sind unter 2.2 aufgeführt.

2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Proben wurde durch Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Dazu wurden Gele mit der unter den jeweiligen Abbildungen angegebenen Agarosekonzentration in TBE-Puffer verwendet. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TBE eingesetzt. Sofern DNA-Banden aus einem Gel extrahiert werden sollten, wurde TAE-Puffer statt TBE verwendet, da die DNA-Extraktion bei Einsatz von TAE zu einer höheren Ausbeute führt. Zur Färbung der DNA wurden 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Gellösung zugegeben. Die Elektrophorese wurde in einer Kammer von 10 x 12 cm (Breite x Länge) bei einer Geldicke von 3 mm und einer Trennstrecke von 7 cm durchgeführt. Die Spannung betrug 8 V/cm. Zur Dokumentation wurde das Gel nach der Elektrophorese auf einen UV-Leuchttisch gelegt und bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einer Digitalkamera der (Nikon Coolpix 4500) fotografiert.

2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die Banden zur Sequenzierung aus dem Gel ausgeschnitten, und die DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) extrahiert. Die Isolation der DNA aus der ausgeschnittenen Bande wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die DNA in 50 µl sterilem H₂O eluiert.

2.9 System zur Quantifizierung des feline Leukose- und Calicivirus

Für eine möglichst präzise Quantifizierung der feline Leukämie- oder Caliciviren müssen alle möglichen Fehlsignale beseitigt werden. Da nur die Quantifizierung intakter Viren erfolgen sollte, hätte freie virale RNA als Folge zerstörter Viren oder, im Falle des FeLV, durch provirale DNA entstehen können. Abbildung 4 verdeutlicht den Ablauf der Quantifizierungsversuche.

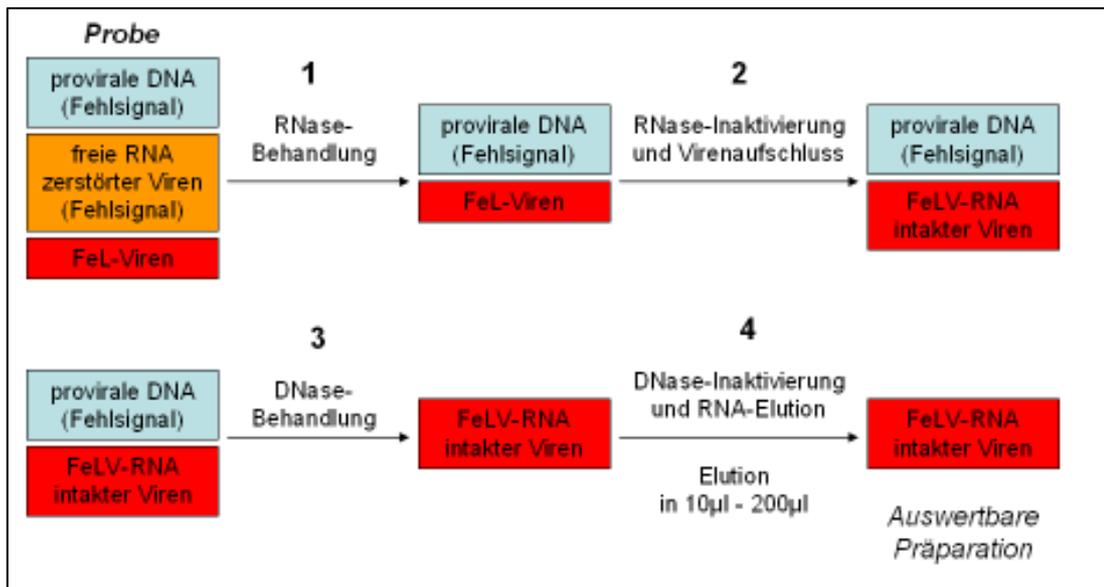


Abbildung 4: Mögliche Fehlsignale und deren Beseitigung bei der Präparation viraler RNA aus Flohkot, Zellkulturüberstand oder Flöhen.

2.9.1 RNase Behandlung der Proben

Um in allen Proben ausschließlich intakte Viren zu quantifizieren, müssen Fehlsignale durch freie virale RNA (z. B. als Folge zerstörter Capside) ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurden alle in der Real-time PCR ausgewerteten Proben mit dem RNase Cocktail der Firma Ambion behandelt. Der RNase Cocktail ist eine Mischung von RNase A (500 U/ml) und RNase T1 (20.000 U/ml). RNase A hydrolysiert Einzelstrang RNA an Cytosin- und Uracil-, RNase T1 an Guaninresten, so dass freie virale RNA, die nicht im Kapsid geschützt vorliegt, bis in Kleinstfragmente verdaut wird.

Eine in den Proben gegebenenfalls vorhandene freie virale RNA wird somit vollständig verdaut. Sie steht damit nicht als Template für eine reverse Transkription zur Verfügung, und wird damit während der quantifizierenden PCR nicht erfasst. Die Proben (je nach Versuch Zellkulturüberstand, Blutplasma, PBS mit darin zerstampften Flöhen oder gelöstem Flohkot) wurden mit 5 µl RNase Cocktail versetzt und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Während der Inkubation wurde der Ansatz 2 bis 3 mal mit Hilfe eines Vibrationsschüttlers gemischt.

Nach der Inkubation wurden die virale RNA der intakten Viren wie unter 2.9.2 beschrieben extrahiert. Da der zur Lyse der viralen Kapside verwendete Puffer des QiAamp Viral RNA Mini Kit eine hohe Konzentration an chaotropen Salzen enthält, werden die RNasen effektiv inaktiviert und mit dem ersten Waschschrift aus der Präparation entfernt.

Alle folgenden Präparationsschritte müssen in Abwesenheit von RNasen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden die verwendeten Verbrauchsmaterialien, wie unter 2.9.2 beschrieben, mit dem RNase inaktivierenden Reagenz DEPC behandelt.

2.9.2 Präparation viraler RNA

Für die Präparation von viraler RNA aus den zu untersuchenden Proben wurde das QiAamp® Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Bei der Präparation und Verarbeitung von RNA-Proben muß jede Kontaminierung mit RNasen vermieden werden. RNasen sind sehr stabile und aktive Enzyme, die im allgemeinen keinerlei Co-Faktoren zu ihrer Funktionalität benötigen. Schon einige Minuten Inkubation reichen aus, um eine RNA-Präparation vollständig zu zerstören.

RNasen sind so gut wie überall zu finden (Staub, Haut) und können auch durch Autoklavieren nicht vollständig inaktiviert werden. Daher ist eine spezielle Behandlung aller verwendeten Labormaterialien unerlässlich. Ein für diesen Zweck geeignetes Reagenz ist Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC). DEPC modifiziert die Histidin-Reste im aktiven Zentrum der RNasen und führt dadurch zu einer Inaktivierung der Enzyme.

Durch anschließendes Autoklavieren kann DEPC in CO₂ und EtOH gespalten werden, so daß es bei evtl. folgenden PCR-Reaktionen keine Behinderung der verwendeten Polymerase darstellt.

Alle bei der RNA-Präparation verwendeten Pipettenspitzen, PCR-Reaktionsgefäße und Gefäße wurden daher in 0,1 % DEPC-Lösung über Nacht bei 37 °C in geschlossenen Glasflaschen auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Flaschen bei 120 °C autoklaviert und die Pipettenspitzen in RNase-freie Bechergläser zum Trocknen überführt. Die verwendeten Bechergläser wurden zuvor für fünf Stunden bei 240 °C in einem Hitze-Sterilisator vorbehandelt, um so ebenfalls RNasen zu inaktivieren.

Zur Präparation viraler RNA aus Flöhen wurden die Tiere in flüssigem Stickstoff kurz schockgefroren, im Stahlmörser zerrieben, das daraus resultierende Pulver in 140 µl PBS aufgenommen und mit 560 µl Lyse-Puffer versetzt. Dieser Ansatz wurde dann laut dem Protokoll für Blutplasma weiterverarbeitet. Viruspartikel, die sich im Magen oder Darmtrakt des Flohs befinden, werden so für den Lyse-Puffer zugänglich.

Bei der Inkubation für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur werden alle viralen Kapside aufgeschlossen. Kotproben wurden in 140 µl PBS aufgenommen, mit einem Vibrationsschüttler bis zur vollständigen Lösung geschüttelt und laut Protokoll für Blutplasma weiterverarbeitet. Eine erhebliche Kontamination mit DNA wurde dabei in Kauf genommen, aber während der folgenden Präparationsschritte beseitigt (siehe 2.11.13). RNA Präparationen aus Blutplasma und Kulturüberstand wurden laut Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

2.9.3 Beseitigung von DNA-Kontaminationen in Präparationen viraler RNA

Bei der unter 2.11.2 beschriebenen Präparation wird neben viraler RNA auch DNA präpariert. Eine mit Zellen kontaminierte Probe von Kulturüberständen und Blutplasma, besonders aber von zellreichem Flohkot, bringt daher auch eine Kontamination mit erheblichem Mengen an DNA mit sich. Diese DNA-Kontamination können die nachgeschaltete RT-PCR stark beeinträchtigen, und im Falle von proviraler FeLV-DNA auch zu falschen Positiven führen.

Um diese DNA-Kontaminationen zu beseitigen, wurde das RNase-Free DNase Set von Qiagen verwendet. Die DNase Verdauung erfolgt dabei direkt „on column“, also auf der Silika-Membran. Das Kit bietet für diese Inaktivierung den Vorteil, daß die DNase in einem Waschschrift herausgewaschen werden kann und nicht erst durch Erhitzen inaktiviert werden muss. Dies ist ein die RNA schonendes Verfahren.

Die DNase-Behandlung erfolgte nach dem ersten Waschschrift mit Puffer AW1 der viralen Präparation. Die im RNase-Free DNase Set enthaltene, lyophilisierte DNase wurde in 550 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

10 µl dieser Stammlösung wurden mit 70 µl RDD-Puffer (Qiagen) gemischt und auf die resultierenden 80 µl DNase-Lösung direkt auf die Silikamembran pipettiert. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur von 15 Minuten wurde die DNase mit 350 µl Waschpuffer AW1 heruntergewaschen.

Anschließend wurde mit 500 µl Waschpuffer AW2 gewaschen und die Probe laut Herstellervorschrift weiterbearbeitet.

2.9.4 Reverse Transkription viraler RNA (RT-PCR)

Die Reverse Transkription von viraler RNA wurde mit dem SensiScript RT Kit (Qiagen) durchgeführt. Es wurden jeweils 5 µl einer RNA-Präparation eingesetzt. Da die eingesetzte Menge an viraler RNA nicht bekannt war und auf eine Messung im Photometer aufgrund der Kontaminationsgefahr mit RNasen verzichtet wurde, wurde ein 1:1 Mischung der Reversen Transkriptasen SensiScript (optimiert für Mengen unter 50 ng) und OmniScript (optimiert für Mengen von 50 ng bis 2 µg) eingesetzt, um eine jeweils optimale reverse Transkription zu gewährleisten.

Alle RT-PCR Reaktionen wurden in 20 µl Gesamtvolumen bei folgenden Endkonzentrationen bzw. -mengen durchgeführt:

10fach RT-Puffer	2 µl
Primer	0,8 µM
dNTP-Mix	2 µl
Template	7 µl aus 2.8.1
RNase Inhibitor*	10 U
Sensi/Omni RT	0,5 U je Enzym

*SUPERase In RNase Inhibitor (Ambion). Inhibiert RNase A, B, C, 1 und T1.

Um die Spezifität der reversen Transkription zu erhöhen, wurde auf den Einsatz von random-Hexamer oder oligo-dT Primern verzichtet, und stattdessen der jeweilige reverse-Primer für den zu detektierenden Sequenzabschnitt verwendet. Weiterhin wurde in Abänderung der Herstellervorschrift die reverse Transkription für 75 Minuten bei 50 °C durchgeführt.

Alle bei der reversen Transkription benutzten Gefäße, Pipettenspitzen und PCR-Reaktionsgefäße wurden wie unter 2.9.2 beschrieben durch DEPC-Behandlung von RNase-Kontamination befreit und das DEPC durch anschließendes Autoklavieren beseitigt.

2.9.5 Quantitative Real-time PCR (qPCR) mit SYBR Green I

Die quantitative PCR wurde mit einem ABI SDS 7700 und dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit hoher Affinität an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet und damit auch an den in einer PCR amplifizierten DNA-Abschnitt.

Im ungebundenen Zustand fluoresziert SYBR Green nicht, so dass unter Anregung bei einer Wellenlänge von 494 nm und einer Emission von 521 nm spezifisch doppelsträngige DNA detektiert werden kann. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt in Echtzeit (Real time) bei jedem durchgeführten Amplifikationsschritt normalerweise während der Elongation, kann aber auch in einem Einzelschritt nach der Elongation durchgeführt werden. Dabei steigt die Fluoreszenz mit zunehmender Zyklenzahl an. Die so gewonnenen Daten ermöglichen die Berechnung der Ausgangsmenge an Template-DNA in einem Ansatz und damit die Quantifizierung der eingesetzten bzw. vorhandenen DNA.

Ein Nachteil der Real-time PCR mit SYBR Green ist die Detektion jedweder Doppelstrang DNA innerhalb eines PCR Ansatzes, also auch unspezifischer Produkte oder Primer-Dimere.

Um das Risiko der damit verbundenen Fehlsignale zu minimieren, wurde die Fluoreszenzmessung in einem gesonderten Schritt nach der Elongation bei einer Temperatur 3 °C unter der Schmelztemperatur des Amplikons durchgeführt. Bei dieser Temperatur liegen kleinere, unspezifische Produkte wie z.B. Primerdimere, in Form von Einzelstrang DNA-Molekülen vor, so daß sie mit einer SYBR Green Markierung nicht detektiert werden.

Dieser zusätzliche Datensammelschritt setzt eine Schmelzkurvenanalyse voraus, um den Schmelzpunkt des Amplikons exakt zu bestimmen. Diese Analyse ist unter 2.9.7 beschrieben.

2.9.6 Minimierung von DNA-Kreuzkontaminationen mit Uracil-N-Glykosylase (UNG)

Das SDS 7700 System kann bei Gebrauch durch Amplifikationsprodukte vorheriger PCR-Reaktionen (durch Aerosole, Verschütten usw.) mit DNA kontaminiert werden. Diese Kontaminationen würden in den folgenden PCR-Reaktionen möglicherweise Fehlsingale erzeugen.

Um eine größtmögliche Sicherheit und Genauigkeit bei der Real-time PCR zu gewährleisten, wurde in jeden PCR-Ansatz 1U Uracil-N-Glykosylase (UNG) gegeben. Das Qiagen QuantiTect SYBR Green Kit enthält neben dTTP auch dUTP (Verhältnis 1:1). Eine Inkubation des PCR-Ansatzes vor der eigentlichen PCR-Reaktion mit UNG zerstört dUTP haltige DNA und damit mögliche DNA-Moleküle bzw. Amplifikate vorangegangener PCR-Reaktionen. Die Erhitzung des Ansatzes für mind. 10 Minuten auf 95 °C inaktiviert die UNG, so dass die in der eigentlichen PCR-Reaktion entstehenden Amplifikate nicht mehr zerstört bzw. verdaut werden können.

2.9.7 Schmelzkurvenanalyse

Spezifische und unspezifische PCR-Produkte der Real-time PCR können durch eine Schmelzpunktanalyse unterschieden werden. Dabei macht man sich den definierten Schmelzpunkt eines gebildeten DNA-Strangs zu Nutze. In der vorliegenden Arbeit wurde nach jeder Real-time PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wurden alle Reaktionsansätze auf 60 °C erhitzt und dann über einen Zeitraum von 20 Minuten mit gleichmäßigem Temperaturanstieg (in diesem Fall also ca. 1,75 °C pro Minute) bis zum Erreichen von 95 °C erhitzt. Während dieser Erhitzung wurde kontinuierlich die Fluoreszenzveränderung gemessen.

Anhand der gewonnenen Daten kann einerseits die Schmelztemperatur eines Amplikons bestimmt werden und andererseits eine PCR auf unspezifische Produktbildung hin untersucht werden.

Abbildung 5 soll die Schmelzkurvenanalyse zur Eliminierung bzw. Erkennung von Fehlsignalen verdeutlichen.

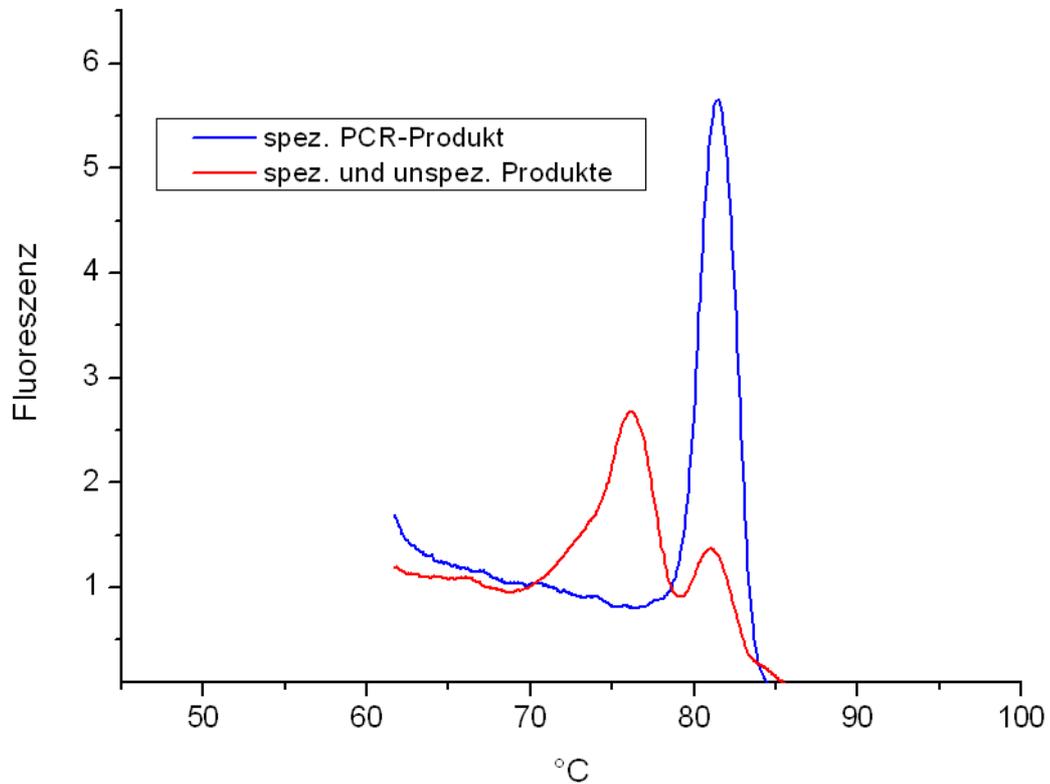


Abbildung 5: Schmelzkurvenanalyse. Die blaue Kurve zeigt den Schmelzpunkt eines Amplikons bei ca. 82 °C. Die rote zeigt die gleiche PCR, jedoch ist in diesem Ansatz neben spezifischem Produkt auch unspezifisches gebildet worden (zweiter Peak bei ca. 75 °C). Ohne Schmelzkurvenanalyse würde das Signal des unspezifischen Produkts fälschlicherweise dem spezifischen Produkt zugewiesen werden.

2.9.8 Übersicht der Real-time PCR Programme

Alle Real-time PCR-Reaktionen wurden nach dem folgenden Programmschema durchgeführt:

1. 50 °C für 2 Minuten (UNG-Verdauung kontaminierender DNA)
2. 95 °C für 15 Minuten (Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase)
3. 94 °C für 15 Sekunden (Denaturierung der dsDNA)
4. Hybridisierungstemperatur¹ für 30 Sekunden
5. 72 °C für 30 Sekunden (Elongation)
6. Fluoreszenzmessung 3 °C unter T_m des Amplikons
7. Wiederholung der Schritte 3 bis 6
8. Schmelzkurvenanalyse (siehe 2.11.7)
9. Kühlung bei 4 °C bis zur Entnahme der Probe

¹ Die Hybridisierungstemperatur wurde auf 5 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur eines verwendeten Primerpaars eingestellt. Die Schmelztemperaturen der Primer sind unter 2.2 aufgeführt.

Für die Quantifizierung des FeLV wurden die Primer Fe74Out / Fe74In, für die des FCV das Primerpaar FCVSen83 / FCVRev83 verwendet (siehe 2.2).

2.9.9 Berechnung absoluter FeLV- und FCV-Mengen

In einer PCR-Reaktion wird der zu amplifizierende Abschnitt theoretisch exponentiell vermehrt. Unter idealen Bedingungen ergäbe sich für die Anzahl der amplifizierten Moleküle (N) daher folgende Gleichung:

$$N = N_0 \times 2^n$$

N_0 Anzahl der Ausgangsmoleküle

n Anzahl der Amplifikationszyklen

Die eigentliche Quantifizierung der Ausgangsmenge erfolgt nun über das Erstellen einer Regressionsgeraden, aus der dann die Ursprungsmenge aller Proben abgeleitet werden kann. Eine solche Gerade muß über mindestens 5 Standardstufen verfügen, um eine verlässliche Berechnung durchzuführen.

In dieser Arbeit wurden 6 Standardstufen in einer Folge von 1:10 Verdünnungen verwendet. Zur Erstellung einer Regressionsgeraden wird die obige Gleichung in ihre logarithmierte Form

$$\log N = \log N_0 + n \log$$

umgeschrieben. Die aus der Fluoreszenzmessung gewonnenen Daten wurden anhand einer solchen Regressionsgeraden mit der Software SDS Version 1.9.1 des ABI Prism Sequence Detection System 7700 ausgewertet (Applied Biosystems). Nach Eingabe der Ausgangskonzentration der 6 Standardstufen wurden die daraus ableitbaren Mengen aller PCR-Ansätze durch die Software berechnet. Für alle Reaktionen wurde dabei die gleiche Effizienz vorausgesetzt.

2.9.10 Herstellung eines RNA-Standards für die qPCR

Die unter 2.11.9 verwendete Methode zur Berechnung der Mengenverhältnisse setzt eine Regressionsgerade mit Messpunkten bekannter RNA-Mengen voraus. Zur Herstellung eines solchen Standards für das FCV wurde virale RNA aus Zellkulturüberstand mit 10^8 Viren / ml wie unter 2.9.2 beschrieben isoliert. Aliquots mit definierter Konzentration wurden freundlicherweise von der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt.

Da der Überstand vor der Präparation viraler RNA mit RNase behandelt wurde, ist die erhaltene RNA rein viralen Ursprungs und somit als Grundlage für eine Quantifizierung geeignet. Die so isolierte RNA wurde als Standard in den bereits unter 2.11.9 beschriebenen 6 Verdünnungsstufen als Standard in die Real-time PCR eingesetzt.

Zur Herstellung eines RNA-Standards für das FeLV wurde virale RNA aus 140 µl Zellkulturüberstand einer FeLV-3281 Zellkultur wie unter 2.9.2 beschrieben isoliert, die Menge an viraler RNA wie unter 2.5 beschrieben gemessen und daraus der Virustiter bestimmt.

2.10 Qualitativer Nachweis des FeLV und FCV

Zum qualitativen Nachweis geringster Mengen an FeLV oder FCV wurde eine sog. „nested“-PCR angewendet. Diese Methode beruht auf zwei hintereinander ablaufenden PCR-Reaktionen, wobei die Primer in der ersten Amplifikation einen größeren Bereich um die Zielsequenz herum flankieren. Darauf folgt die zweite Amplifikation eines kleineren, innerhalb der ersten Zielsequenz liegenden Genabschnitts. Der Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität, da der in der zweiten PCR zu detektierende Sequenzabschnitt zwei mal amplifiziert wird, was ein Signal auch bei nur wenigen DNA-Molekülen als Ausgangsmaterial erkennen lässt.

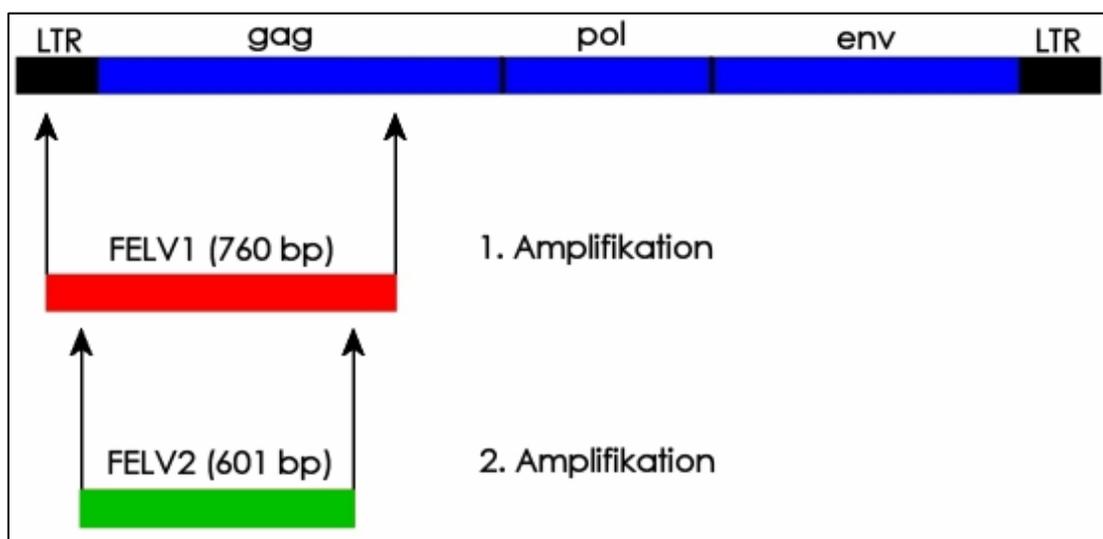


Abbildung 6: Schematische Übersicht einer nested-PCR anhand der beim Nachweis des FeLV amplifizierten Bereiche FELV1 und FELV2.

Abbildung 6 zeigt zum besseren Verständnis das Prinzip der „nested PCR“ anhand der aus dem 8448 bp Genom des FeLV amplifizierten Bereiche der ersten (FELV1) und der zweiten (FELV2) PCR und die zu erwartenden Fragmentgrößen: die erste PCR mit den Primern Sense-FeLV1 und Rev-FeLV1 führt zu einer Amplifikation eines 770 bp großen Bereiches. Diese Amplifikation ist bei geringer Menge an Template-DNA nicht unbedingt durch Ethidiumbromid-Färbung nachweisbar, da die Nachweisgrenze bei ca. fünf Nanogramm Nukleinsäure oder weniger liegt (Sambrook et al. 1989). Eine elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel zeigt also unterhalb dieses Schwellenwerts keine sichtbaren Banden.

Im zweiten Schritt wird eine PCR mit den Primern Sense-FeLV2 und Rev-FeLV2 (FELV2) durchgeführt. Dabei dient der Reaktionsansatz der ersten Reaktion als Template-DNA. Die ursprünglich eingesetzte FeLV-cDNA ist so zwei Mal amplifiziert worden, so daß bereits wenige Viren in einer Probe ausreichen, durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht zu werden. Die amplifizierten Bereiche liegen im Fall des FeLV in der LTR-Region (**L**ong **T**erminal **R**epeats), einem hochkonservierten Bereich aller drei Subtypen des Virus, so dass Typ A, B und C gleichermaßen erfaßt werden.

Im Falle des FCV wurde für die nested PCR das Primerpaar FCVSen497 und FCVRev497 (erste PCR) und FCVSen209 bzw. FCVRev209 (zweite PCR) durchgeführt.

Innerhalb des qualitativen Nachweises des FeLV und FCV werden somit in den PCR-Reaktionen Fragmente von 770 bp (FeLV) bzw. 497 bp (FCV) in der ersten PCR-Reaktion, und 601 bp bzw. 209 bp in der zweiten Reaktion amplifiziert.

2.11 Techniken der Zellkultur

2.11.1 FeLV-3281 Lymphoblasten

Die FeLV-3281 Zellen sind feline Lymphoblasten, die stabil mit dem feline Leukämievirus infiziert sind. Die Zellen produzieren den FeLV-A Subtyp und damit den in der Natur transmissiblen Virus. FeLV-3281 Zellen wachsen als sog. Suspensionszellkultur, adhären also nicht an den Boden der Zellkulturflasche.

2.11.2 CRFK-Zellen zum Nachweis infektiöser FC-Viren

Zum Nachweis infektiöser feline Caliciviren wurden Crandall-Reese Feline Kidney (CRFK) Zellen verwendet. Diese Zelllinie wird im Allgemeinen zur Anzucht vieler verschiedener feline Viren verwendet, unter anderem auch feline Caliciviren. Die Zellen wachsen als Monolayer. Eine Infektion mit dem FCV zeigt sich in der Zerstörung der CRFK-Zellen und damit in einer Ablösung des Monolayers vom Boden der Zellkulturflasche. Je nach infektiöser Dosis dauerte die komplette Ablösung zwischen 1 und 4 Tagen. Die Zellen zeigen so einerseits infektiöse Viruspartikel an und dienen gleichzeitig der Zucht infektiöser Viren. Die CRFK-Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen in 30 ml CRFK-Medium bei 37 °C und 5% CO₂ gezüchtet und alle 5 bis 7 Tage 1 zu 5 geteilt.

Proben bzw. Zellkulturen, bei denen nach 2 Tagen keine cytopathischen Effekte zu erkennen sind, werden in der Regel noch einmal mit Wachstumsmedium versetzt und durchlaufen eine weitere Virusisolierung. Dieses Verfahren wird als Subkultivierung bezeichnet. Mit Hilfe der Subkultivierung ist es möglich, bereits eine sehr kleine Virusmenge zu isolieren, die mit anderen Verfahren nicht detektiert wird (De Noronha et al. 1977).

2.11.3 Passagieren / Splitten der Zellen

Monolayer-Zellkulturen wurden passagiert, sobald sie zu ca. 80% konfluent gewachsen waren. Das Zellkulturmedium wurde verworfen und die Zellen mit 15 ml einer auf 37 °C vorgewärmten Trypsin / EDTA Lösung (0,05% / 0,02% w/v in PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) inkubiert, bis sich alle Zellen abgerundet bzw. vom Boden der Flasche gelöst hatten. Die so erhaltene Lösung wurde für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert, das Zellpellet in 25 ml CRFK-Medium resuspendiert. 5 ml dieser Lösung wurde zum Animpfen einer 250 ml Zellkulturflasche verwendet.

2.11.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden je $1,5 \times 10^6$ Zellen in je 2 ml Zellkulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen und in ein Cryotube pipettiert. Das Tube wurde für 2 Stunden bei 4 °C gelagert und danach in dickwandigen Styroporboxen bei -80 °C tiefgefroren. Die Kühlrate betrug ca. 1 °C pro Minute. Nach 24 Stunden wurden die Cryotubes mit den darin befindlichen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden Aliquots dem flüssigen Stickstoff entnommen und unverzüglich in ein 37 °C Wasserbad überführt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurde das Tube für 1 Minute in 70% Ethanol überführt. Danach wurden 40 ml des jeweiligen Zellkulturmediums mit den Zellen angeimpft und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium zur Entfernung des DMSO komplett ausgetauscht.

2.11.5 Test auf infektiöse Viruspartikel mit Clone-81 und CRFK-Zellen mit Diethylaminoethyl-Dextran

Um die Effizienz einer Infektion von Zellen mit Viren zu erhöhen, wurde Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) verwendet. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass auch geringste Mengen an infektiösen Viren in der Zellkultur von Clone-81 oder CRFK-Zellen zu einem sichtbaren Signal führen, in diesem Fall also der Ablösung des Monolayers vom Boden der Zellkulturflasche. Da DEAE-Dextran jedoch in hohen Dosen toxisch wirkt, wurde die Verträglichkeit für beide Zelllinien bestimmt. Für beide Zelllinien wurde eine geeignete Konzentration von 75 µg DEAE-Dextran pro ml Zellkulturmedium bestimmt. Bei dieser Konzentration zeigten die Zellen keine sichtbare Schädigung (z.B. Abrundung) innerhalb einer 8-stündigen Inkubation.

2.12 Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop der Firma Olympus Modell IMT-2 hergestellt. Fotografiert wurde mit einer Digitalkamera der Firma Nikon (Coolpix 4500) unter Verwendung eines speziellen Aufsatzes.

3. Ergebnisse

3.1 Quantifizierung des feline Leukose- und Calicivirus im Floh und Flohkot

Zur Quantifizierung der Viren wurde, wie unter 2.9.9 beschrieben, eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration an DNA erstellt, um damit eine Regressionsgerade zu erstellen. Anhand dieser Geraden konnte dann die Ausgangsmenge an DNA von Proben mit unbekanntem Titer bestimmt werden. Abbildung 8 zeigt exemplarisch anhand einer Verdünnungsreihe mit 6 Meßpunkten den Verlauf der Zunahme an Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zykluszahl bei der Realtime PCR unter Verwendung von SYBRGreen als Fluoreszenzfarbstoff. Je früher die Fluoreszenz einer Reaktion den definierten Schwellwert überschreitet, desto mehr DNA lag in der Probe vor. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis einer solchen Realtime-PCR für die Erstellung der Regressionsgeraden zur Quantifizierung des FCV.

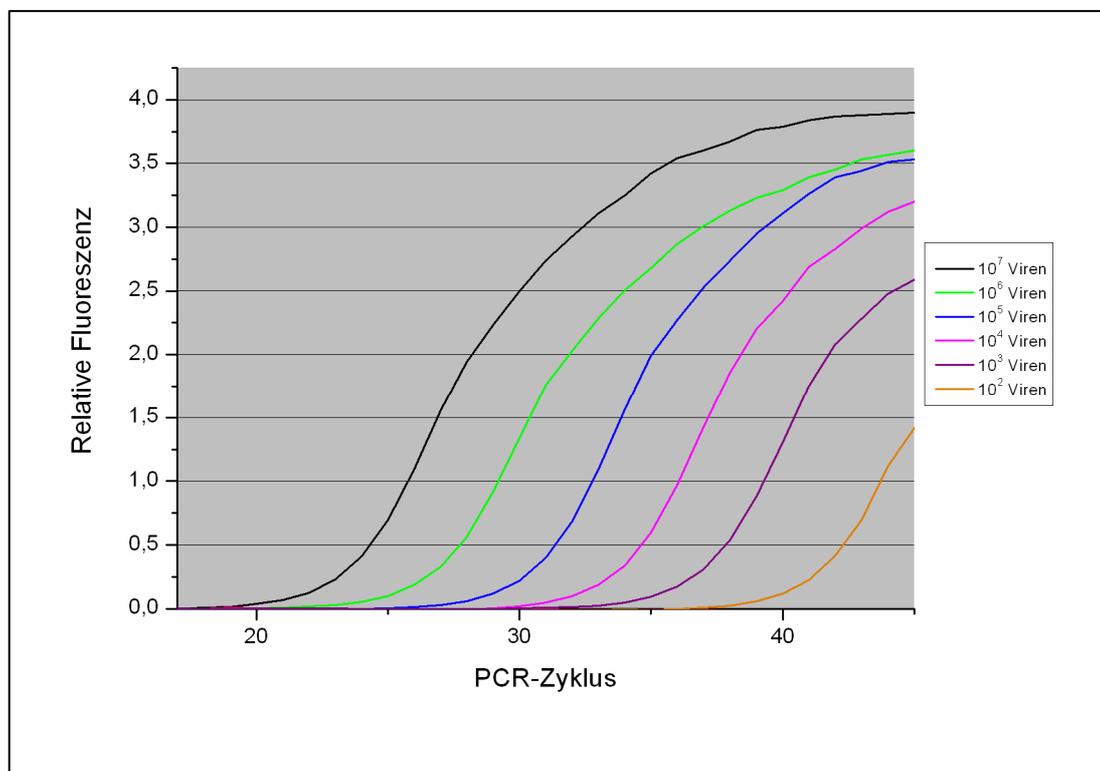


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzzunahme der PCR-Reaktionen für die Erstellung der Regressionsgeraden anhand einer 6fachen Verdünnungsreihe des FCV.

Nach jeder Realtime PCR wurde, wie unter 2.9.7 beschrieben, eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. So wurde sichergestellt, daß es sich bei den während der Realtime-PCR gebildeten Produkten um die gewünschten Segmente handelte. Abbildung 8 zeigt die Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte, die für die Erstellung der Regressionsgeraden zur Quantifizierung des FCV dienten.

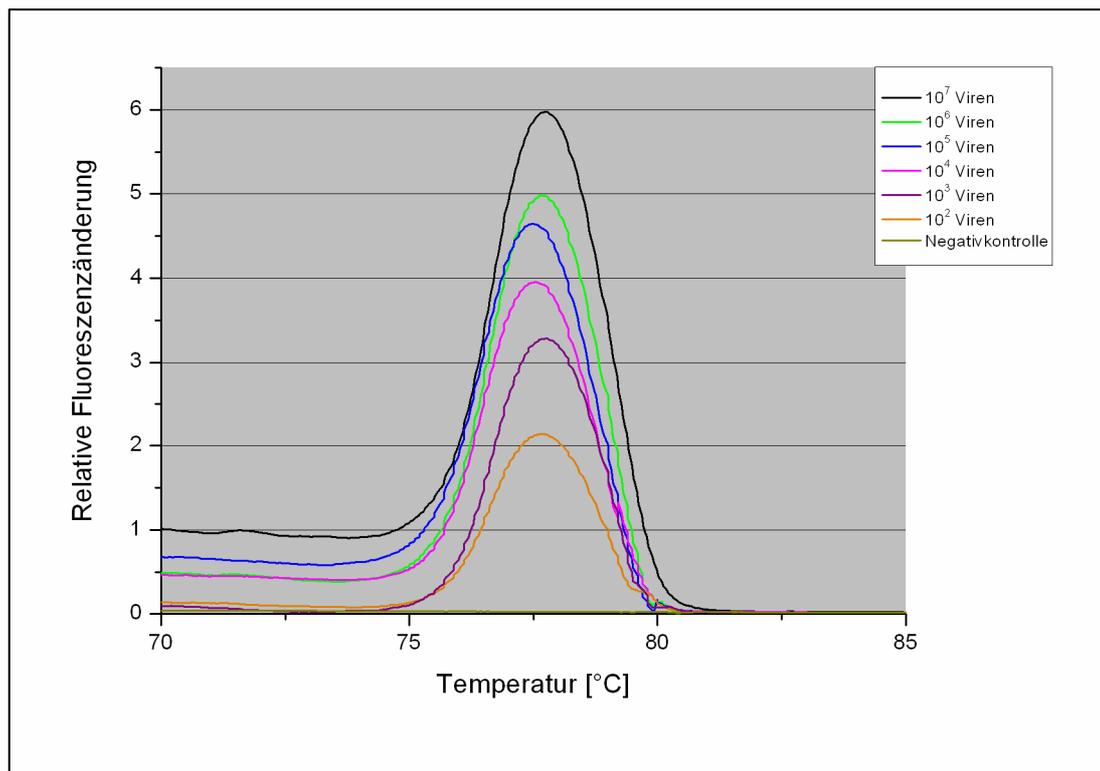


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Fluoreszenzzunahme der PCR-Reaktionen für die Erstellung der Regressionsgeraden anhand einer 6fachen Verdünnungsreihe des FCV.

Wie zu sehen ist, zeigen die einzelnen Graphen jeweils nur einen Peak. Eine unspezifische Amplifizierung unerwünschter Nebenprodukte fand nicht statt. Alle innerhalb dieser Arbeit durchgeführten quantifizierenden PCR-Reaktionen wurden auf diese Weise durchgeführt und verifiziert.

Da für die in dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungen lediglich die zu Grunde liegende Regressionsgerade und der C_T -Wert der PCR-Reaktionen von Interesse ist, werden innerhalb des Ergebnisteils auch nur diese angegeben. Es wird somit auf eine graphische Darstellung der Fluoreszenzmessungen aller durchgeführten PCR-Reaktionen verzichtet.

3.1.1 Zeitabhängige Quantifizierung des FCV im Floh

Anhand der Messung der C_t -Werte der PCR-Reaktionen unter 3.1 konnte eine Regressionsgerade erstellt werden, welche die Quantifizierung des FCV in Proben mit unbekanntem Titer erlaubt. Abbildung 9 zeigt die Messpunkte der Verdünnungsreihe und die daraus resultierende Regressionsgerade.

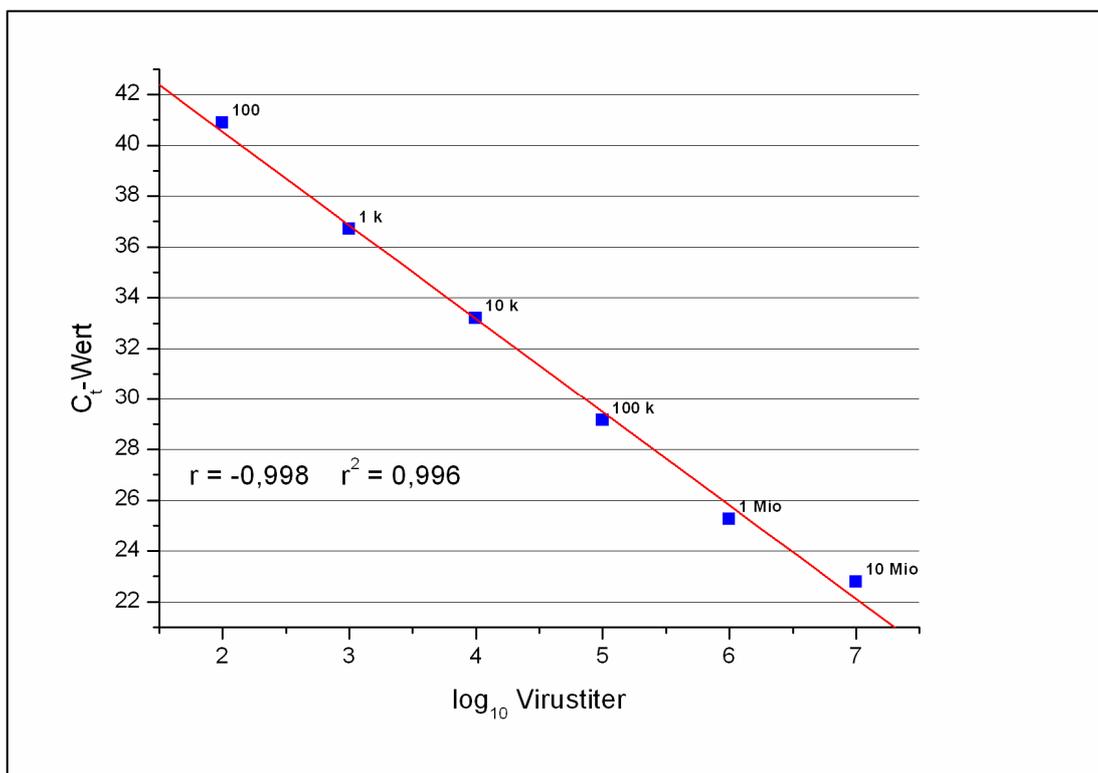


Abbildung 9: Regressionsgerade (rote Linie) anhand einer FCV-Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^2 Viren (blaue Messpunkte). Anhand dieser Regressionsgeraden wurden die Virustiter der Proben bestimmt.

Bei einer Regressionsgeraden ist der Korrelationskoeffizient r und das daraus resultierende Bestimmtheitsmaß r^2 zu berücksichtigen. Je näher das Bestimmtheitsmaß an 1 liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit des linearen Zusammenhangs der Meßwerte. Das Bestimmtheitsmaß für die Regressionsgerade bei der FCV-Titerbestimmung lag bei 0,996. Die Gerade kann daher als äußerst verlässlich angesehen werden.

Die Titerbestimmung wurde wie unter 2.9.9 beschrieben durch die Software SDS Version 1.9.1 des ABI Prism Sequence Detection System 7700 durchgeführt.

Um die Verweildauer des FCV im Floh zu untersuchen, wurden 1000 Flöhe für 24 Stunden mit FCV-infiziertem Blut gefüttert. Danach wurde die Blutquelle entfernt, und je 500 Tiere wurden bei Raumtemperatur bzw. 4 °C gehalten. Pro Messpunkt wurden 10 Flöhe der jeweiligen Population entnommen, und dann der Virustiter in ihnen bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, für alle Messungen möglichst gleichgroße Tiere zu entnehmen.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Titermessung der bei 23°C gehaltenen Flöhe. Angegeben sind die von der Software ausgegebenen C_t -Werte, die daraus resultierenden prozentualen Mengenverhältnisse zum Anfangstiter (Flöhe direkt nach Absetzen von der Blutquelle) und die zum jeweiligen Zeitpunkt erreichte Abnahme des Titers in % pro Stunde. Ebenso werden zu den beiden letztgenannten Werten der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Es wurden insgesamt 3 unabhängige Messreihen durchgeführt.

Wie zu sehen ist, nimmt der Virustiter im Floh bei Raumtemperatur schnell ab. Bereits nach 6 Stunden wurde das FCV in den Flöhen zu mehr als 60% ausgeschieden oder abgebaut. Nach 46 Stunden ist in lediglich einer Probe, nach 60 Stunden in keiner Probe mehr FCV nachweisbar.

FCV-Titer im Floh bei 23 °C					
Messpunkt	Messung 1 ($1,23 \cdot 10^4$)	Messung 2 ($1,51 \cdot 10^4$)	Messung 3 ($1,54 \cdot 10^4$)	Mittelwert	SD
Initial (0h)	$C_t=32,85$ 100%	$C_t=32,51$ 100%	$C_t=32,48$ 100%	100	0
Nach 3h	$C_t=33,56$ ~64 % 12 %/h	$C_t=33,33$ ~59 % 13,7 %/h	$C_t=33,47$ ~54 % 15,3 %/h	59 % 13,7 %/h	5 % 1,7 %/h
Nach 6h	$C_t=34,49$ ~35% 10,8 %/h	$C_t=34,55$ ~28% 12 %/h	$C_t=34,75$ ~24% 12,7 %/h	29 % 12,9 %/h	5,6 % 2,6 %/h
Nach 24h	$C_t=35,95$ ~14% 3,6 %/h	$C_t=35,24$ ~18% 3,4 %/h	$C_t=35,72$ ~13% 3,6 %/h	15 % 3,5 %/h	2,6 % 0,1 %/h
Nach 30h	$C_t=37,35$ ~6% 3,1 %/h	$C_t=37,3$ ~5% 3,2 %/h	$C_t=39,8$ ~1% 3,3 %/h	4 % 3,2 %/h	2,6 % 0,1 %/h
Nach 46h	$C_t=40,22$ ~1% 2,2 %/h	$C_t > 45$	$C_t > 45$	0,3 % 0,7 %/h	0,6 % 1,3 %/h
Nach 60h	$C_t > 45$	$C_t > 45$	$C_t > 45$	-	-
Nach 115h	$C_t > 45$	$C_t > 45$	$C_t > 45$	-	-
Nach 170h	$C_t > 45$	$C_t > 45$	$C_t > 45$	-	-

Tabelle 1: Meßergebnisse der 3 Messungen des FCV-Titers im Floh bei 23°C innerhalb eines Zeitraums von 170 Stunden. Unter dem jeweiligen C_t -Wert ist der Virustiter in Bezug auf den Ausgangstiter (Flöhe direkt nach Absetzen von der Blutquelle) angegeben. Der Wert darunter gibt die Abnahme des Titers in % pro Stunde an, die an dem jeweiligen Meßpunkt in Bezug auf den Ausgangstiter erreicht wurde. SD = Standardabweichung der Meßwerte (ohne C_t -Wert).

Von Interesse ist nun die Frage, ob sich die Titerabnahme verlangsamen läßt, wenn die Umgebungstemperatur gesenkt und damit auch der Stoffwechsel des Flohs herabgesetzt wird. Bei niedrigen Temperaturen verfallen die Flöhe in eine Art Kältestarre und bewegen sich kaum mehr. Ebenso wird die Kotproduktion (und damit die Ausscheidung von Viren) herabgesetzt.

Um die Ausmaße der Stoffwechselreduzierung und verringerten Kotproduktion zu verdeutlichen, zeigt Abbildung 10 zwei Flohpopulationen, die nach einer dreistündigen Blutmahlzeit in eine Petrischale überführt, und danach für 24 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 4°C gehalten wurden.

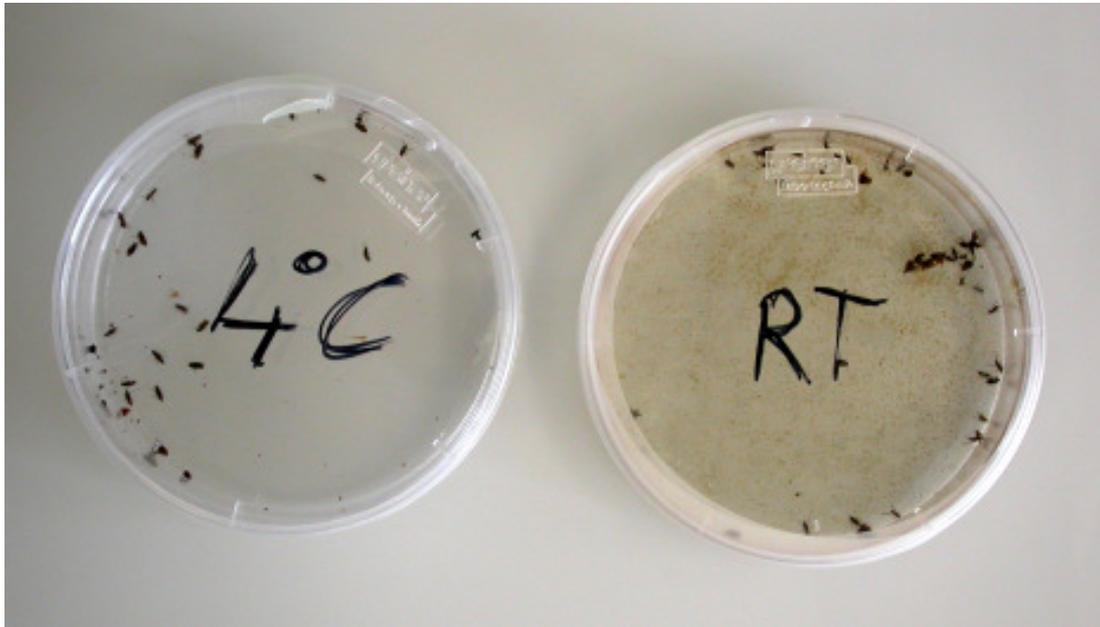


Abbildung 10: Kotproduktion von Flöhen bei 4°C (linke Schale) und Raumtemperatur (rechte Schale). Zu sehen ist die Braunfärbung des Bodens der Petrischale auf der rechten Seite in Folge einer deutlich erhöhten Kotproduktion im Vergleich zu einer Flohhaltung bei 4°C, welche zu einer drastisch verringerten Kotproduktion führt.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die rechte Petrischale vom Flohkot braun gefärbt ist, während in der linken Schale kaum Kotspuren zu erkennen sind. Eine Herabsetzung der Umgebungstemperatur sollte also zu einer verlängerten Verweildauer von Viren im Floh führen, weswegen die Titerbestimmung des FCV im Floh über 170 Stunden auch bei einer Umgebungstemperatur von 4°C durchgeführt wurde. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Titermessung von den bei 4°C gehaltenen Flöhen. Es wurden insgesamt 3 unabhängige Messreihen durchgeführt.

FCV-Titer im Floh bei 4 °C					
Messpunkt	Messung 1 ($1,23 \cdot 10^4$)	Messung 2 ($1,51 \cdot 10^4$)	Messung 3 ($1,54 \cdot 10^4$)	Mittelwert	SD
Initial (0h)	$C_t=32,85$ 100%	$C_t=32,51$ 100%	$C_t=32,48$ 100%	100	0
Nach 3h	$C_t=33,05$ ~ 87% 4,3 %/h	$C_t=33,02$ ~ 73% 9 %/h	$C_t=32,54$ ~ 95% 1,7 %/h	85 % 5 %/h	11,1 % 3,7 %/h
Nach 6h	$C_t=33,02$ ~ 89% 1,8 %/h	$C_t=32,85$ ~ 79% 3,5 %/h	$C_t=32,74$ ~ 84% 2,7 %/h	84 % 2,7 %/h	5 % 0,9 %/h
Nach 24h	$C_t=33,1$ ~ 86% 0,6 %/h	$C_t=32,9$ ~ 77% 1 %/h	$C_t=32,75$ ~ 83% 0,7 %/h	82 % 0,8 %/h	4,6 % 0,2 %/h
Nach 30h	$C_t=33,26$ ~ 78% 0,7 %/h	$C_t=32,96$ ~ 74% 0,9 %/h	$C_t=32,9$ ~ 76% 0,8 %/h	76 % 0,8 %/h	2 % 0,1 %/h
Nach 46h	$C_t=33,33$ ~ 73% 0,6 %/h	$C_t=33,05$ ~ 71% 0,6 %/h	$C_t=33,27$ ~ 60% 0,9 %/h	68 % 0,7 %/h	7 % 0,2 %/h
Nach 60h	$C_t=33,38$ ~ 69% 0,5 %/h	$C_t=33,16$ ~ 66% 0,6 %/h	$C_t=33,27$ ~ 60% 0,7 %/h	65 % 0,6 %/h	4,6 % 0,1 %/h
Nach 115h	$C_t=33,66$ ~ 60% 0,3 %/h	$C_t=33,18$ ~ 65% 0,3 %/h	$C_t=33,26$ ~ 61% 0,3 %/h	62 % 0,3 %/h	2,6 % 0 %/h
Nach 170h	$C_t=33,86$ ~ 52% 0,4 %/h	$C_t=33,49$ ~ 54% 0,27 %/h	$C_t=33,29$ ~ 59% 0,35 %/h	55 % 0,3 %/h	7 % 0,1 %/h

Tabelle 2: Meßergebnisse der 3 Messungen des FCV-Titers im Floh bei 4°C innerhalb eines Zeitraums von 170 Stunden. Pro Meßpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 10 Flöhen bestimmt. Unter dem jeweiligen C_t -Wert ist der Virustiter in Bezug auf den Ausgangstiter angegeben. Der Wert darunter gibt die Abnahme des Titers in % pro Stunde an, die an dem jeweiligen Meßpunkt in Bezug auf den Ausgangstiter erreicht wurde. SD = Standardabweichung der Meßwerte (ohne C_t -Wert).

Es zeigt sich, daß eine Herabsetzung der Umgebungstemperatur die Nachweisbarkeit des FCV im Floh tatsächlich erheblich verlängert. War bei Raumtemperatur nach 30 Stunden bei fast allen Flöhen das FCV nicht mehr nachweisbar, so waren bei einer Umgebungstemperatur von 4°C selbst nach 170 Stunden noch mehr als 50% der ursprünglich bei der Blutmahlzeit aufgenommenen Viren im Floh nachweisbar.

Abbildung 11 zeigt den Titerverlauf des FCV im Floh im Vergleich zum Ausgangstiter basierend auf den in Tabelle 1 und 2 angegebenen Mittelwerten, und belegt eindrucksvoll die Temperaturabhängigkeit der Titerabnahme des FCV im Floh. Die senkrechten Balken geben die Standardabweichung am jeweiligen Meßpunkt wieder.

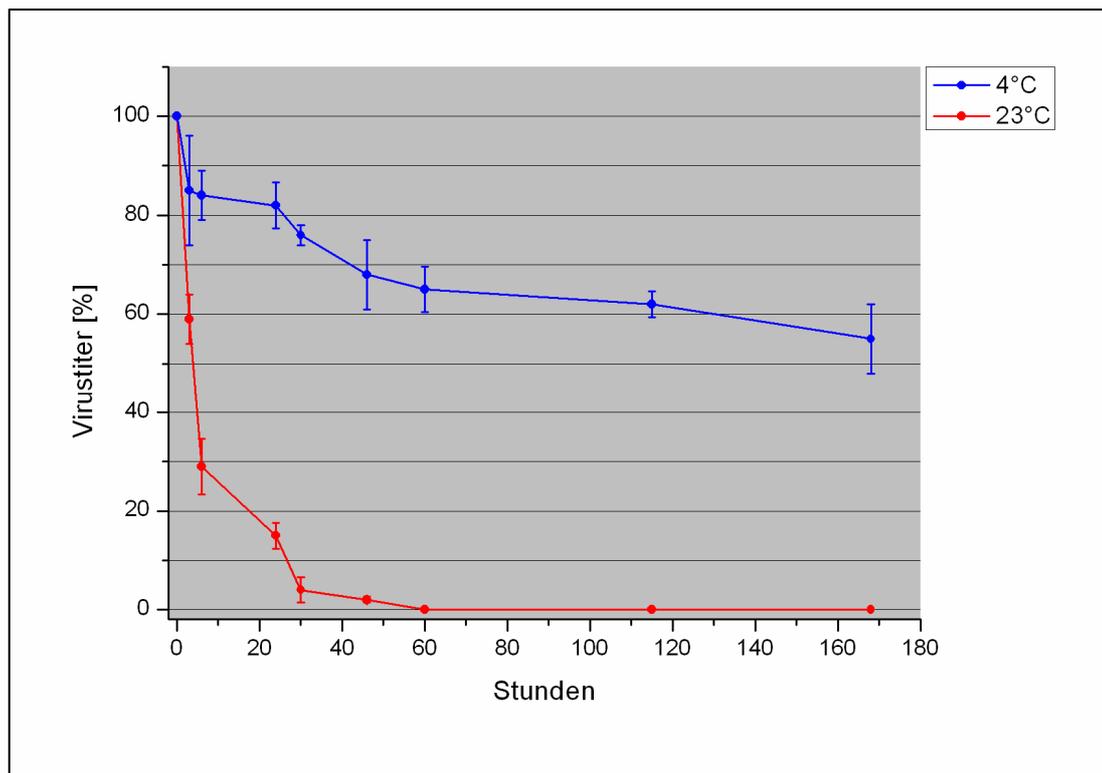


Abbildung 11: Verlauf des FCV-Titers im Floh innerhalb eines Zeitraums von 170 Stunden. Pro Messpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 10 Flöhen bestimmt. Den Graphen liegt der jeweilige Mittelwert von 3 unabhängigen Messungen zu Grunde (Meßergebnisse siehe Tabellen 1 und 2). Die senkrechten Balken geben jeweils die Standardabweichung an einem Messpunkt wieder.

3.1.2 Zeitabhängige Quantifizierung des FCV im Flohkot

Zur Bestimmung des Virustiters im Flohkot über die Zeit wurden 2000 Flöhe für 24 Stunden mit FCV-infiziertem Rinderblut gefüttert. Danach wurde der bis dahin ausgeschiedene Kot abgesammelt, gut durchmischt und in zwei Hälften geteilt. Jede Hälfte wurde dann bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C gelagert.

Pro Messpunkt wurden je 20 mg Kot entnommen und der Virustiter bestimmt. Den Messungen lag dabei die in Abbildung 9 gezeigte Regressionsgerade zu Grunde. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Titermessung von dem bei 23°C gelagerten Flohkot. Angegeben sind die von der Software ausgegebenen C_t -Werte, die daraus resultierenden prozentualen Mengenverhältnisse zum Anfangstiter (Kot spätestens 24 Stunden nach Ausscheidung) und die zum jeweiligen Zeitpunkt erreichte Abnahme des Titers in % pro Tag. Ebenso werden zu den beiden letztgenannten Werten der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Es wurden insgesamt 3 unabhängige Messreihen durchgeführt.

FCV-Titer im Flohkot bei 23 °C					
Messpunkt	Messung 1 ($3,7 \cdot 10^6$)	Messung 2 ($3,7 \cdot 10^6$)	Messung 3 ($3,5 \cdot 10^6$)	Mittelwert	SD
Initial (0d)	$C_t=23,7$ 100%	$C_t=23,7$ 100%	$C_t=23,82$ 100%	100 %	0
Nach 3d	$C_t=23,99$ ~ 85 % 5 %/h	$C_t=24,05$ ~ 81 % 6,4 %/h	$C_t=23,95$ ~ 86 % 4,7 %/h	84 % 5,4 %/h	2,6 % 0,9 %/h
Nach 7d	$C_t=24,54$ ~ 59 % 5,9 %/h	$C_t=24,28$ ~ 69 % 4,4 %/h	$C_t=24,5$ ~ 61 % 5,6 %/h	63 % 5,3 %/h	5,3 % 0,8 %/h
Nach 10d	$C_t=24,64$ ~ 55 % 4,5 %/h	$C_t=24,43$ ~ 64 % 3,6 %/h	$C_t=24,5$ ~ 61 % 3,9 %/h	60 % 4 %/h	4,6 % 0,5 %/h
Nach 14d	$C_t=24,87$ ~ 48 % 3,7 %/h	$C_t=24,34$ ~ 67 % 3,1 %/h	$C_t=24,52$ ~ 60 % 2,9 %/h	55 % 3,2 %/h	6,2 % 0,4 %/h

Tabelle 3: Meßergebnisse der 3 Messungen des FCV-Titers im Flohkot bei 23°C innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen. Pro Meßpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 20 mg Flohkot bestimmt. Unter dem jeweiligen C_t -Wert ist der Virustiter in Bezug auf den Ausgangstiter (Kot spätestens 24 Stunden nach Ausscheidung) angegeben. Der Wert darunter gibt die Abnahme des Titers in % pro Tag an, die an dem jeweiligen Meßpunkt in Bezug auf den Ausgangstiter erreicht wurde. SD = Standardabweichung der Meßwerte (ohne C_t -Wert).

Auch hier wurde überprüft, wie sich der Virustiter im Flohkot bei einer Herabsetzung der Umgebungstemperatur auf 4 °C verhält. Tabelle 4 zeigt die dazu erhaltenen Meßergebnisse.

FCV-Titer im Flohkot bei 4 °C					
Messpunkt	Messung 1 ($3,7 \cdot 10^6$)	Messung 2 ($3,7 \cdot 10^6$)	Messung 3 ($3,5 \cdot 10^6$)	Mittelwert	SD
Initial (0d)	$C_t=23,7$ 100%	$C_t=23,7$ 100%	$C_t=23,82$ 100%	100 %	0
Nach 3d	$C_t=23,72$ ~ 98 % 0,7 %/h	$C_t=23,83$ ~ 92 % 2,7 %/h	$C_t=23,72$ ~ 98 % 0,7 %/h	96 % 1,4 %/h	3,5 % 1,2 %/h
Nach 7d	$C_t=23,9$ ~ 88 % 1,7 %/h	$C_t=23,83$ ~ 92 % 1,1 %/h	$C_t=23,88$ ~ 90 % 1,4 %/h	90 % 1,4 %/h	2 % 0,3 %/h
Nach 10d	$C_t=24,07$ ~ 79 % 2,1 %/h	$C_t=23,95$ ~ 86 % 1,4 %/h	$C_t=23,99$ ~ 84 % 1,6 %/h	83 % 1,7 %/h	3,6 % 0,4 %/h
Nach 14d	$C_t=24,3$ ~ 69 % 2,2 %/h	$C_t=24,14$ ~ 76 % 1,7 %/h	$C_t=24,08$ ~ 80 % 1,4 %/h	75 % 1,8 %/h	5,6 % 0,4 %/h

Tabelle 4: Meßergebnisse der 3 Messungen des FCV-Titers im Flohkot bei 4 °C innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen. Pro Meßpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 20 mg Flohkot bestimmt. Unter dem jeweiligen C_t -Wert ist der Virustiter in Bezug auf den Ausgangstiter (Kot spätestens 24 Stunden nach Ausscheidung) angegeben. Der Wert darunter gibt die Abnahme des Titers in % pro Tag an, die an dem jeweiligen Meßpunkt in Bezug auf den Ausgangstiter erreicht wurde. SD = Standardabweichung der Meßwerte (ohne C_t -Wert).

Es zeigt sich, daß die Lagerung des Kots bei 4 °C zu einer verlangsamten Abnahme des Virustiters führt. Auch bei Raumtemperatur sind jedoch nach 14 Tagen im Mittel mehr als 50% der ursprünglich ausgeschiedenen Viren im Kot nachweisbar.

Der Graph in Abbildung 12 zeigt den Titerverlauf des FCV im Flohkot im Vergleich zum Ausgangstiter basierend auf den in Tabelle 3 und 4 angegebenen Mittelwerten. Die senkrechten Balken geben die Standardabweichung am jeweiligen Meßpunkt wieder.

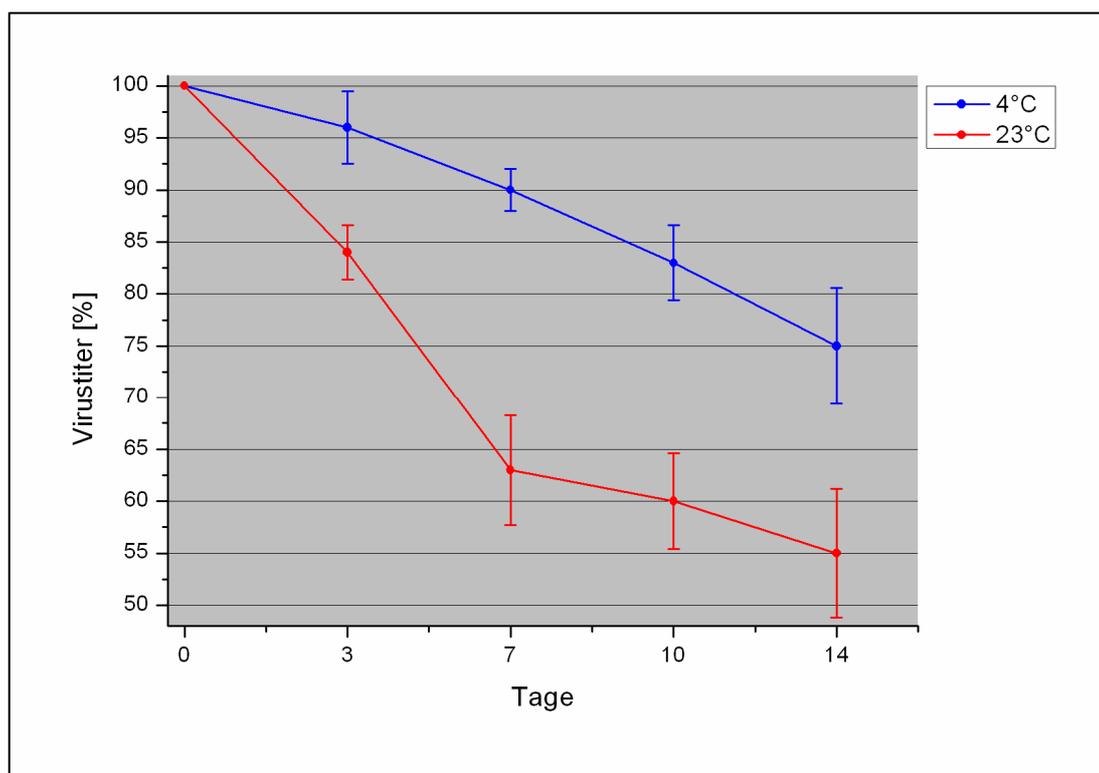


Abbildung 12: Verlauf des FCV-Titers im Flohkot innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen. Pro Messpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 20 mg Flohkot bestimmt. Den Graphen liegt der jeweilige Mittelwert von 3 unabhängigen Messungen zu Grunde (Meßergebnisse siehe Tabelle 3 und 4). Die senkrechten Balken geben jeweils die Standardabweichung an einem Messpunkt wieder.

3.1.3 Zeitabhängige Quantifizierung des FeLV im Floh

Um die Verweildauer von Retroviren am Beispiel des FeLV im Floh zu betrachten, wurden (wie bereits im FCV-Versuch) 1000 Flöhe für 24 Stunden mit FeLV-infiziertem Blut gefüttert. Danach wurde die Blutquelle entfernt, und es wurden je 500 Tiere bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C gehalten. Pro Messpunkt wurden 10 Tiere der jeweiligen Population entnommen. Danach wurde der Virustiter in diesen 10 Flöhen bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, für alle Messungen möglichst gleichgroße Tiere zu entnehmen. Der Virustiter der einzelnen Proben wurde anhand einer Regressionsgeraden bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde in der PCR-Reaktion wie bereits bei der FCV-Quantifizierung eine Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^2 Viren eingesetzt. Abbildung 13 zeigt die Messpunkte der Verdünnungsreihe und die daraus resultierende Regressionsgerade.

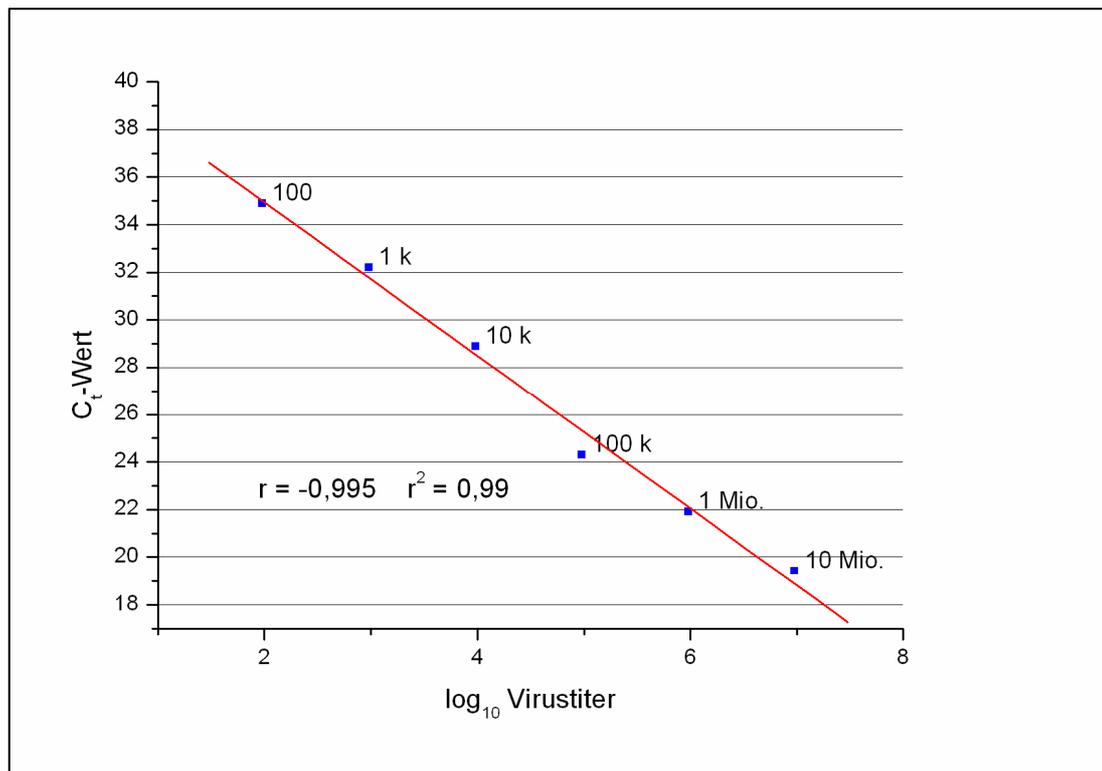


Abbildung 13: Regressionsgerade (rote Linie) anhand einer FeLV-Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^2 Viren (blaue Messpunkte). Anhand dieser Regressionsgeraden wurde der Virustiter der Proben bestimmt.

Das Bestimmtheitsmaß für die Regressionsgerade bei der Titerbestimmung des FeLV liegt bei 0,99. Die Gerade kann daher als verlässlich angesehen werden.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Titermessung von den bei 23°C gehaltenen Flöhen. Angegeben sind die von der Software ausgegebenen C_t-Werte, die daraus resultierenden prozentualen Mengenverhältnisse zum Anfangstiter (Flöhe direkt nach Absetzen von der Blutquelle) und die zum jeweiligen Zeitpunkt erreichte Abnahme des Titers in % pro Stunde.

Ebenso werden zu den beiden letztgenannten Werten der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Es wurden insgesamt 3 unabhängige Messreihen durchgeführt.

FeLV-Titer im Floh bei 23 °C					
Messpunkt	Messung 1 ($2 \cdot 10^4$)	Messung 2 ($1,5 \cdot 10^4$)	Messung 3 ($1,6 \cdot 10^4$)	Mittelwert	SD
Initial (0h)	$C_t=27,55$ 100%	$C_t=27,94$ 100%	$C_t=27,8$ 100%	100	0
Nach 3h	$C_t=28,08$ ~ 65 % 11,7 %/h	$C_t=28,28$ ~ 76 % 8 %/h	$C_t=28,26$ ~ 72 % 9,3 %/h	71 % 9,7 %/h	5,6 % 1,9 %/h
Nach 6h	$C_t=28,74$ ~ 41 % 9,8 %/h	$C_t=28,77$ ~ 54 % 7,8 %/h	$C_t=29,09$ ~ 40 % 10 %/h	45 % 9,2 %/h	7,8 % 1,2 %/h
Nach 24h	$C_t=31,09$ ~ 8 % 3,8 %/h	$C_t=30,7$ ~ 14 % 3,6 %/h	$C_t=31,33$ ~ 8 % 3,8 %/h	10 % 3,7 %/h	3,5 % 0,1 %/h
Nach 30h	$C_t=33,01$ ~ 2 % 3,3 %/h	0	0	0,7 % 1,1 %/h	1,2 % 1,9 %/h
Nach 46h	0	0	0	0	0
Nach 60h	0	0	0	0	0
Nach 115h	0	0	0	0	0
Nach 170h	0	0	0	0	0

Tabelle 5: Meßergebnisse der 3 Messungen des FeLV-Titers im Floh bei 23 °C innerhalb eines Zeitraums von 170 Stunden. Pro Meßpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 10 Flöhen bestimmt. Unter dem jeweiligen C_t -Wert ist der Virustiter in Bezug auf den Ausgangstiter angegeben. Der Wert darunter gibt die Abnahme des Titers in % pro Stunde an, die an dem jeweiligen Meßpunkt in Bezug auf den Ausgangstiter erreicht wurde. SD = Standardabweichung der Meßwerte (ohne C_t -Wert).

Auch beim FeLV sollte eine Herabsetzung der Umgebungstemperatur zu einer verlängerten Verweildauer der Viren im Floh führen. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Titermessung bei den bei 4 °C gehaltenen Flöhen. Es wurden insgesamt 3 unabhängige Messreihen durchgeführt.

FeLV-Titer im Floh bei 4 °C					
Messpunkt	Messung 1 ($2 \cdot 10^4$)	Messung 2 ($1,5 \cdot 10^4$)	Messung 3 ($1,6 \cdot 10^4$)	Mittelwert	SD
Initial (0h)	$C_t=27,55$ 100%	$C_t=27,94$ 100%	$C_t=27,8$ 100%	100	0
Nach 3h	$C_t=27,84$ ~ 80% 6,7 %/h	$C_t=28,14$ ~ 84 % 5,3 %/h	$C_t=28,14$ ~ 79% 7 %/h	81 % 6,3 %/h	2,6 % 0,9 %/h
Nach 6h	$C_t=28,06$ ~ 69% 5,2 %/h	$C_t=28,36$ ~ 73 % 4,5 %/h	$C_t=28,18$ ~ 77% 3,8 %/h	73 % 4,5 %/h	4 % 0,7 %/h
Nach 24h	$C_t=28,28$ ~ 56% 1,8 %/h	$C_t=28,6$ ~ 60% 1,7 %/h	$C_t=28,52$ ~ 61% 1,2 %/h	59 % 1,6 %/h	2,6 % 0,3 %/h
Nach 30h	$C_t=28,21$ ~ 59% 1,4 %/h	$C_t=28,6$ ~ 60% 1,3 %/h	$C_t=28,57$ ~ 58 % 1,4 %/h	59 % 1,4 %/h	1 % 0,1 %/h
Nach 46h	$C_t=28,19$ ~ 61% 0,8 %/h	$C_t=28,6$ ~ 60% 0,9 %/h	$C_t=28,69$ ~ 53 % 1 %/h	58 % 0,9 %/h	4,4 % 0,1 %/h
Nach 60h	$C_t=28,21$ ~ 59% 0,7 %/h	$C_t=28,71$ ~ 57% 0,7 %/h	$C_t=28,66$ ~ 55 % 0,8 %/h	57 % 0,7 %/h	2 % 0,1 %/h
Nach 115h	$C_t=28,21$ ~ 59% 0,4 %/h	$C_t=28,79$ ~ 54% 0,4 %/h	$C_t=28,66$ ~ 55 % 0,4 %/h	56 % 0,4 %/h	2,6 % 0 %/h
Nach 170h	$C_t=28,3$ ~ 55% 0,3 %/h	$C_t=29,06$ ~ 43% 0,3 %/h	$C_t=28,72$ ~ 52 % 0,3 %/h	50 % 0,3 %/h	6,2 % 0 %/h

Tabelle 6: Meßergebnisse der 3 Messungen des FeLV-Titers im Floh bei 4 °C innerhalb eines Zeitraums von 170 Stunden. Pro Meßpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 10 Flöhen bestimmt. Unter dem jeweiligen C_t -Wert ist der Virustiter in Bezug auf den Ausgangstiter angegeben. Der Wert darunter gibt die Abnahme des Titers in % pro Stunde an, die an dem jeweiligen Meßpunkt in Bezug auf den Ausgangstiter erreicht wurde. SD = Standardabweichung der Meßwerte (ohne C_t -Wert).

Wie es schon beim FCV zu beobachten war, zeigt sich auch beim FeLV eine starke Temperaturabhängigkeit der Nachweisbarkeit des Virus im Floh. Bei Haltung der Flöhe bei 4 °C können auch nach 170 Stunden noch ca. 50% der bei der Blutmahlzeit aufgenommenen Viren nachgewiesen werden. Bei einer Haltung bei Raumtemperatur hingegen lassen sich bereits nach 30 Stunden keine Viren mehr im Floh nachweisen.

Abbildung 14 zeigt den Titerverlauf des FeLV im Floh im Vergleich zum Ausgangstiter basierend auf den in Tabelle 5 und 6 angegebenen Mittelwerten. Die senkrechten Balken geben die Standardabweichung am jeweiligen Meßpunkt wieder. Auch hier ist eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit bei der Titerabnahme zu erkennen.

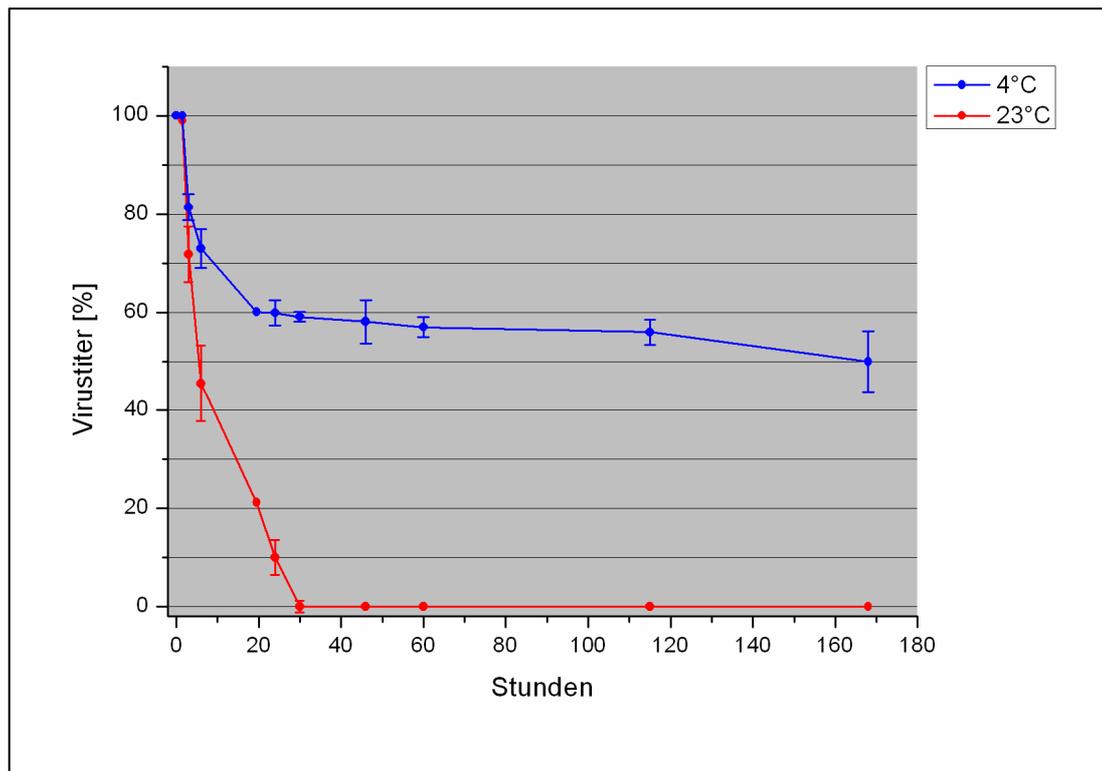


Abbildung 14: Verlauf des FeLV-Titers im Floh innerhalb eines Zeitraums von 170 Stunden. Pro Messpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 10 Flöhen bestimmt. Den Graphen liegt der jeweilige Mittelwert von 3 unabhängigen Messungen zu Grunde (Meßergebnisse siehe Tabellen 5 und 6). Die senkrechten Balken geben jeweils die Standardabweichung an einem Messpunkt wieder.

3.1.4 Zeitabhängige Quantifizierung des FeLV im Flohkot

Zur Bestimmung des Virustiters im Flohkot über die Zeit wurden 2000 Flöhe für 24 Stunden mit FeLV-infiziertem Rinderblut gefüttert. Danach wurde der bis dahin ausgeschiedene Kot abgesammelt, gut durchmischt und in zwei Hälften geteilt. Jede Hälfte wurde dann bei Raumtemperatur bzw. 4 °C gelagert.

Pro Messpunkt wurde je 15 mg Kot entnommen und der Virustiter bestimmt. Den Messungen lag dabei die in Abbildung 14 gezeigte Regressionsgerade zu Grunde.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Titermessung des bei 23°C gelagerten Flohkots. Angegeben sind die von der Software ausgegebenen C_t -Werte, die daraus resultierenden prozentualen Mengenverhältnisse zum Anfangstiter (Kot spätestens 24 Stunden nach Ausscheidung) und die zum jeweiligen Zeitpunkt erreichte Abnahme des Titers in % pro Tag. Ebenso werden zu den beiden letztgenannten Werten der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Es wurden insgesamt 3 unabhängige Messreihen durchgeführt.

FeLV-Titer im Flohkot bei 23°C					
Messpunkt	Messung 1 ($4,1 \cdot 10^6$)	Messung 2 ($4,1 \cdot 10^6$)	Messung 3 ($4,3 \cdot 10^6$)	Mittelwert	SD
Initial (0d)	$C_t=20,08$ 100%	$C_t=20,08$ 100%	$C_t=19,98$ 100%	100 %	0
Nach 3d	$C_t=20,48$ ~ 75 % 8,3 %/h	$C_t=20,41$ ~ 77 % 7,7 %/h	$C_t=20,41$ ~ 73 % 9 %/h	75 % 8,3 %/h	8,7 % 0,7 %/h
Nach 7d	$C_t=20,92$ ~ 55 % 6,4 %/h	$C_t=20,76$ ~ 60 % 5,7 %/h	$C_t=20,66$ ~ 62 % 5,4 %/h	59 % 5,8 %/h	3,6 % 0,5 %/h
Nach 10d	$C_t=20,82$ ~ 59 % 4,1 %/h	$C_t=20,9$ ~ 54 % 4,6 %/h	$C_t=20,74$ ~ 58 % 4,2 %/h	57 % 4,3 %/h	2,6 % 0,3 %/h
Nach 14d	$C_t=20,97$ ~ 52 % 3,4 %/h	$C_t=20,97$ ~ 52 % 3,4 %/h	$C_t=20,74$ ~ 58 % 3 %/h	54 % 3,3 %/h	3,5 % 0,2 %/h

Tabelle 7: Meßergebnisse der 3 Messungen des FeLV-Titers im Flohkot bei 23°C innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen. Pro Messpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 15mg Flohkot bestimmt. Unter dem jeweiligen C_t -Wert ist der Virustiter in Bezug auf den Ausgangstiter angegeben. Der Wert darunter gibt die Abnahme des Titers in % pro Tag an, die an dem jeweiligen Meßpunkt in Bezug auf den Ausgangstiter erreicht wurde. SD = Standardabweichung der Meßwerte (ohne C_t -Wert).

Auch hier wurde überprüft, wie sich der Virustiter im Flohkot bei einer Herabsetzung der Umgebungstemperatur auf 4 °C verhält. Tabelle 8 zeigt die dabei erhaltenen Meßergebnisse.

FeLV-Titer im Flohkot bei 4 °C					
Messpunkt	Messung 1 ($4,1 \cdot 10^6$)	Messung 2 ($4,1 \cdot 10^6$)	Messung 3 ($4,3 \cdot 10^6$)	Mittelwert	SD
Initial (0d)	$C_t=20,08$ 100%	$C_t=20,08$ 100%	$C_t=19,98$ 100%	100 %	0
Nach 3d	$C_t=20,21$ ~ 88 % 5,7 %/h	$C_t=20,14$ ~ 93 % 1,7 %/h	$C_t=20,15$ ~ 89 % 2,7 %/h	90 % 3,4 %/h	2,6 % 2 %/h
Nach 7d	$C_t=20,35$ ~ 80 % 2,9 %/h	$C_t=20,29$ ~ 85 % 2,1 %/h	$C_t=20,27$ ~ 81 % 2,7 %/h	82 % 2,6 %/h	2,6 % 0,4 %/h
Nach 10d	$C_t=20,45$ ~ 75 % 2,5 %/h	$C_t=20,48$ ~ 74 % 2,6 %/h	$C_t=20,4$ ~ 76 % 2,4 %/h	75 % 2,5 %/h	1 % 0,1 %/h
Nach 14d	$C_t=20,54$ ~ 70 % 2,1 %/h	$C_t=20,7$ ~ 63 % 2,6 %/h	$C_t=20,6$ ~ 65 % 2,5 %/h	66 % 2,4 %/h	3,6 % 0,3 %/h

Tabelle 8: Meßergebnisse der 3 Messungen des FeLV-Titers im Flohkot bei 4 °C innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen. Pro Messpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 15mg Flohkot bestimmt. Unter dem jeweiligen C_t -Wert ist der Virustiter in Bezug auf den Ausgangstiter angegeben. Der Wert darunter gibt die Abnahme des Titers in % pro Tag an, die an dem jeweiligen Meßpunkt in Bezug auf den Ausgangstiter erreicht wurde. SD = Standardabweichung der Meßwerte (ohne C_t -Wert).

Auch hier zeigt sich, dass eine Temperaturabhängigkeit bei der Nachweisbarkeit des Virus im Flohkot gegeben ist. Bei einer Lagerung des Kots bei 4 °C sind nach 14 Tagen noch mehr als 65% der ursprünglich vorhandenen Viren nachweisbar, bei Raumtemperatur immerhin noch über 50%.

Abbildung 15 zeigt den Titerverlauf des FeLV im Flohkot im Vergleich zum Ausgangstiter basierend auf den in Tabelle 7 und 8 angegebenen Mittelwerten. Die senkrechten Balken geben die Standardabweichung am jeweiligen Meßpunkt wieder.

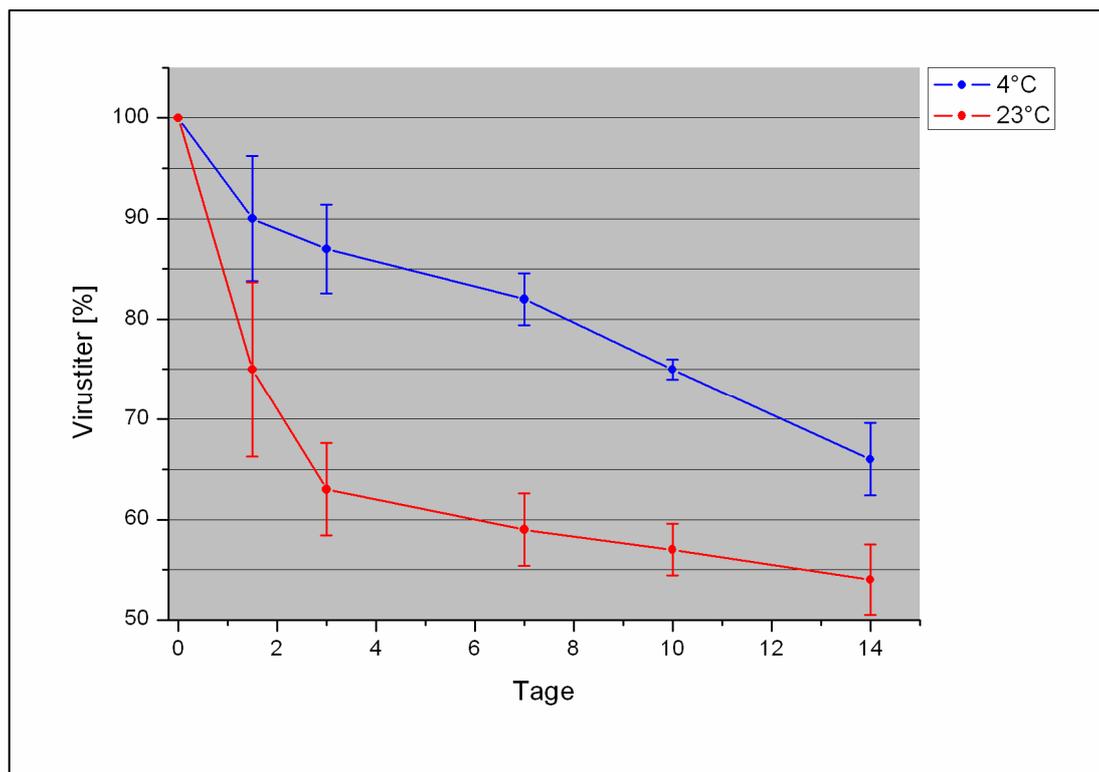


Abbildung 15: Verlauf des FeLV-Titers im Flohkot innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen. Pro Messpunkt wurde die Gesamtmenge an Viren in 10 Flöhen bestimmt. Den Graphen liegt der jeweilige Mittelwert von 3 unabhängigen Messungen zu Grunde (Meßergebnisse siehe Tabellen 7 und 8). Die senkrechten Balken geben jeweils die Standardabweichung an einem Messpunkt wieder.

3.2 Titerabnahmegeschwindigkeit des FeLV und FCV im Floh und Flohkot

In den Tabellen 2 bis 8 der Quantifizierungsversuche sind ebenfalls die durchschnittlichen Titerabnahmegeschwindigkeiten in % pro Stunde (Floh) bzw. Tag (Flohkot) angegeben. Die Werte zeigen, daß sich die Titerabnahmegeschwindigkeit im Floh mit der Zeit reduziert. Dies ist bei Raumtemperatur ebenso der Fall wie bei 4°C. Jedoch sind die Abnahmegeschwindigkeit für das FCV und FeLV bei Raumtemperatur deutlich erhöht und erreichen Werte von über 13,5 % bzw. 9,5 % (vom Ausgangswert) pro Stunde. Abbildung 16 zeigt den Verlauf der Titerabnahmegeschwindigkeit des FCV und FeLV im Floh innerhalb von 120 Stunden basierend auf den Mittelwerten aus den Tabellen 1, 2, 5 und 6.

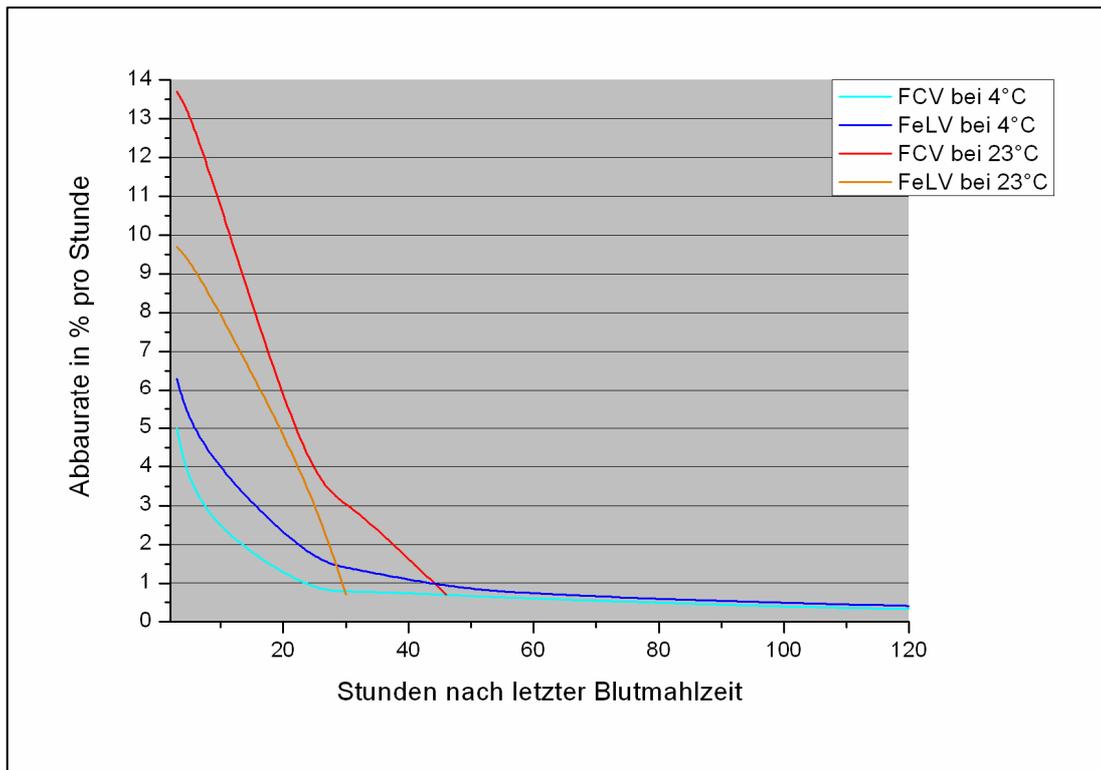


Abbildung 16: Gemessene Veränderung der Virustiterabnahmegeschwindigkeit (in Prozent der initial aufgenommenen Viren pro Stunde) des FeLV und FCV im Floh über einen Zeitraum von 120 Stunden anhand von B-Spline Kurven der Mittelwerte der jeweiligen Abbauraten aus den Tabellen 1, 2, 5 und 6.

Während sich die Veränderung der Titerabnahmegeschwindigkeit der Viren im Floh bei Raumtemperatur fast linear verhält, ist dies bei 4°C nicht mehr der Fall. Nach einem anfänglich starken Abfall erreicht sie nach ca. 40 Stunden relativ konstante Werte.

Ein völlig anderes Bild ergibt sich für die Veränderung der Titerabnahmegeschwindigkeit der Viren im Flohkot. Abbildung 17 zeigt den Verlauf der Titerabnahmegeschwindigkeit des FCV und FeLV im Flohkot innerhalb von 14 Tagen basierend auf den Mittelwerten aus den Tabellen 3, 4, 7 und 8.

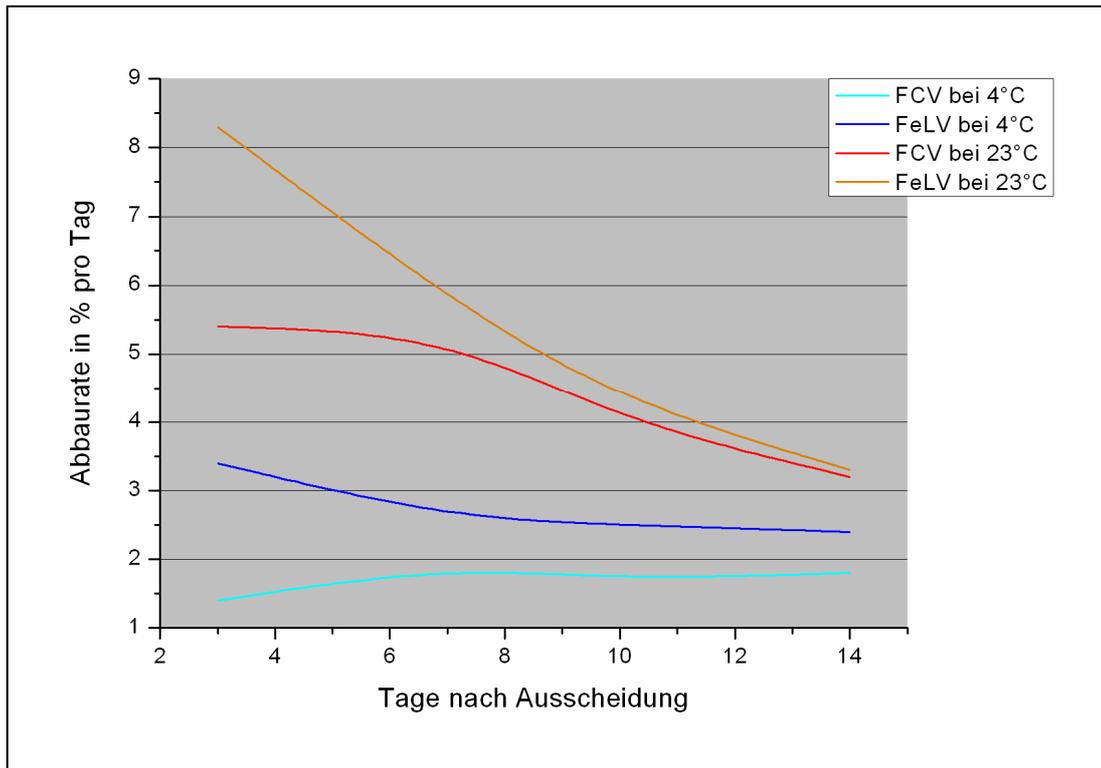


Abbildung 17: Gemessene Veränderung der Virustiterabnahmegeschwindigkeit (in Prozent der initial aufgenommenen Viren pro Stunde) des FeLV und FCV im Flohkot über einen Zeitraum von 14 Tagen anhand von B-Spline Kurven der Mittelwerte der jeweiligen Abbauraten aus den Tabellen 3, 4, 7 und 8.

Im Vergleich zu der Veränderung der Titerabnahmegeschwindigkeit der Viren im Floh sind die Kurven sehr viel flacher und die Titerabnahmegeschwindigkeit ist bei 4°C nahezu konstant.

3.3 Verhältnis vom Floh aufgenommenener und ausgeschiedener FeL-Viren

Um das Verhältnis der vom Floh bei einer Blutmahlzeit aufgenommenen im Vergleich zu den ausgeschiedenen Viren zu testen, wurden 150 Flöhe für 24h mit FeLV-infiziertem Blut gefüttert. Nach Entfernen der Blutquelle wurden 50 Flöhe zermörsert. Danach wurde die in ihnen enthaltene Virusmenge bestimmt. Dieser Wert gilt als Initialwert (100% der Viren im Floh, 0% im Flohkot). Die verbleibenden Flöhe wurden bei 23°C in Petrischalen zu je 50 Tieren gehalten. Nach 20 Stunden wurde erneut der Virustiter in 50 Flöhen bestimmt. Zusätzlich wurde ebenfalls der Virustiter im bis dahin angefallenen Flohkot der Tiere bestimmt. Die gleiche Prozedur wurde nach 30 Stunden wiederholt. Das Ergebnis zu dieser Bestimmung des Mengenverhältnisses des FeLV im Floh und Flohkot ist in Tabelle 9 dargestellt.

FeLV-Titerverhältnis Floh/Flohkot bei 23 °C					
Messpunkt	Messung 1 (Floh:Kot)	Messung 2 (Floh:Kot)	Messung 3 (Floh:Kot)	Mittelwerte	SD
Nach 10h	38:62	31:53	42:56	37:57	5,6 / 4,6
Nach 20h	24:64	18:76	21:67	21:69	3 / 6,2
Nach 30h	2:86	0:79	1:81	1:82	1 / 3,6

Tabelle 9: Mengenverhältnisse des FeLV im Floh und Flohkot bei 23°C nach Absetzen der Flöhe von der Blutquelle über einen Zeitraum von 30h. Die Werte geben die jeweiligen prozentualen Verhältnisse in Bezug auf die Menge der vom Floh aufgenommenen Viren an. SD=Standardabweichung der Messungen (Floh / Flohkot).

Abbildung 18 zeigt das Verhältnis von aufgenommenem und ausgeschiedenem FeLV innerhalb 30 Stunden basierend auf den Mittelwerten aus Tabelle 9. Deutlich zeigt sich, daß der größte Teil an aufgenommenen Viren die Passage „durch den Floh“ schadlos übersteht.

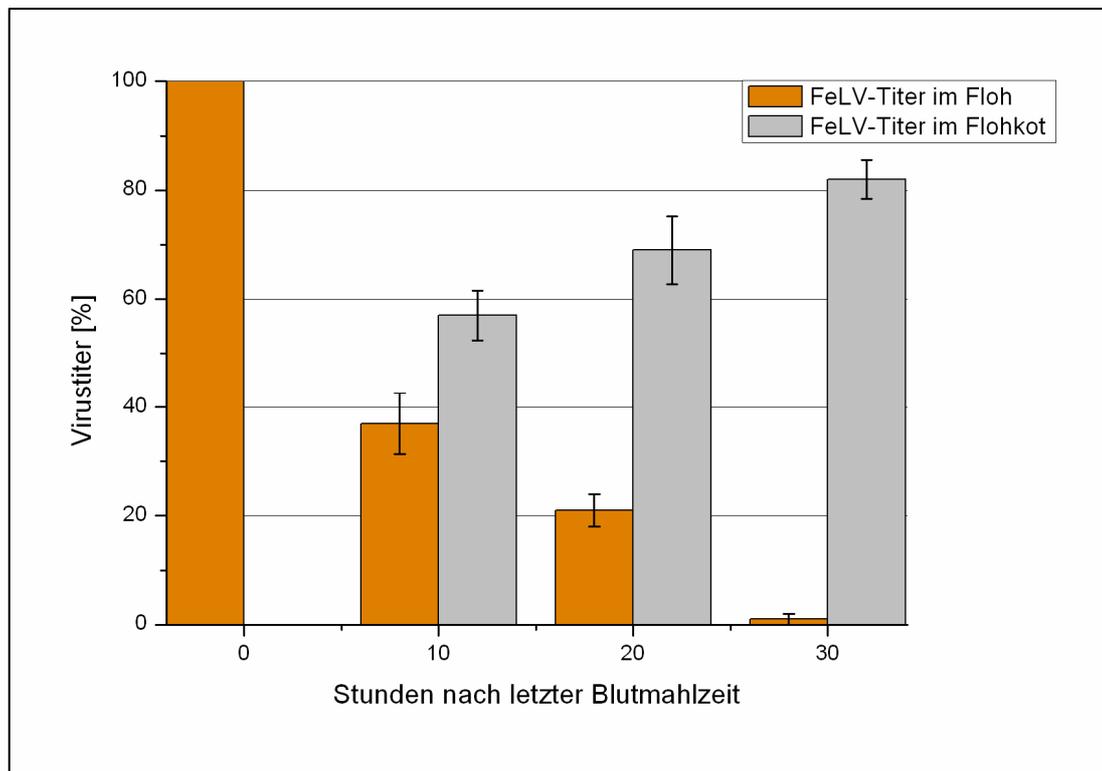


Abbildung 18: Mengenverhältnisse des FeLV im Floh und Flohkot über die Zeit. Die Werte sind Mittelwerte von 3 Messungen.

Im Durchschnitt werden 82% der aufgenommenen Viren innerhalb von 30 Stunden nach der letzten Blutmahlzeit eines Flohs wieder mit dem Kot ausgeschieden. 18% der Viruspartikel bzw. viralen RNA (auf deren Nachweis die Quantifizierung beruht) werden während der Magen-Darmpassage verdaut bzw. zerstört, oder konnten innerhalb der Messung nicht erfaßt werden.

3.4 Annäherungsweise Berechnung des Aufnahmevolumens an Blut eines Flohs

Innerhalb des unter 3.1.9 beschriebenen Versuches war es möglich, annäherungsweise das durchschnittliche Aufnahmevolumen an Blut eines Flohs zu bestimmen. 10 Flöhe wurden mit FCV-infiziertem Blut gefüttert. Dabei wurden die Flohcontainer groß genug gewählt, daß sich die Tiere bei der Blutmahlzeit nicht gegenseitig stören und so möglichst effektiv bis zum Erreichen des maximalen Aufnahmevolumens saugen. Um möglichst wenig Abbau von Virusmaterial durch Verdauung zu gewährleisten, wurden die Flöhe bei der Blutmahlzeit beobachtet und die Blutquelle genau in dem Moment entfernt, in dem sich die ersten Kottröpfchen am After der Flöhe zeigten. Die Flöhe wurden abgesammelt und sofort der Virustiter bestimmt. Anschließend wurde der Virustiter des verfütterten Blutes mit dem Virustiter der Flöhe verglichen:

Viruskonzentration des verfütterten Blutes $2,5 * 10^6$ Viren / ml

Viruskonzentration in 1µl verfüttertem Blut $2,5 * 10^3$ Viren

Gemessene Viruskonzentration in 10 Flöhen nach 24h Blutmahlzeit $17 * 10^3$ Viren

Durchschnittliche Viruskonzentration in 1 Floh $1,7 * 10^3$

Das entspricht einem berechneten „Fassungsvermögen“ von Blut pro Floh (Flohdarm plus Flohmagen) von durchschnittlich 0,68µl.

3.5 *In vitro* Infektiositätstests mit dem FCV

Die obigen Versuchsergebnisse zeigen, daß sowohl Flöhe als auch der Flohkot potentiell infektiös sein können, sofern die Infektiosität der Viren im Floh oder nach Ausscheidung im Kot erhalten bleibt. Um dies zu überprüfen, wurden die bereits unter 2.11.3. beschriebenen CrFK-Zellen verwendet, die anhand cytopathischer Effekte das infektiöse Virus anzeigen können.

3.5.1 Infektiosität FCV-infizierter Flöhe

Um den Zeitrahmen zu bestimmen, in dem das FCV im Floh infektiös bleibt, wurden Flöhe wie unter 2.3.1 beschrieben mit FCV infiziertem Blut gefüttert und danach ohne weitere Blutmahlzeit bei Raumtemperatur gehalten. Je 5 lebende Flöhe wurden nach Tag 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 10 entnommen, mit flüssigem Stickstoff übergossen, zermörsert, das resultierende Pulver mit 1 ml PBS gemischt und die Suspension auf einen intakten CrFK-Monolayer (mit 25 ml Wachstumsmedium) gegeben. Die folgende Abbildung zeigt die jeweiligen Monolayer nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C.

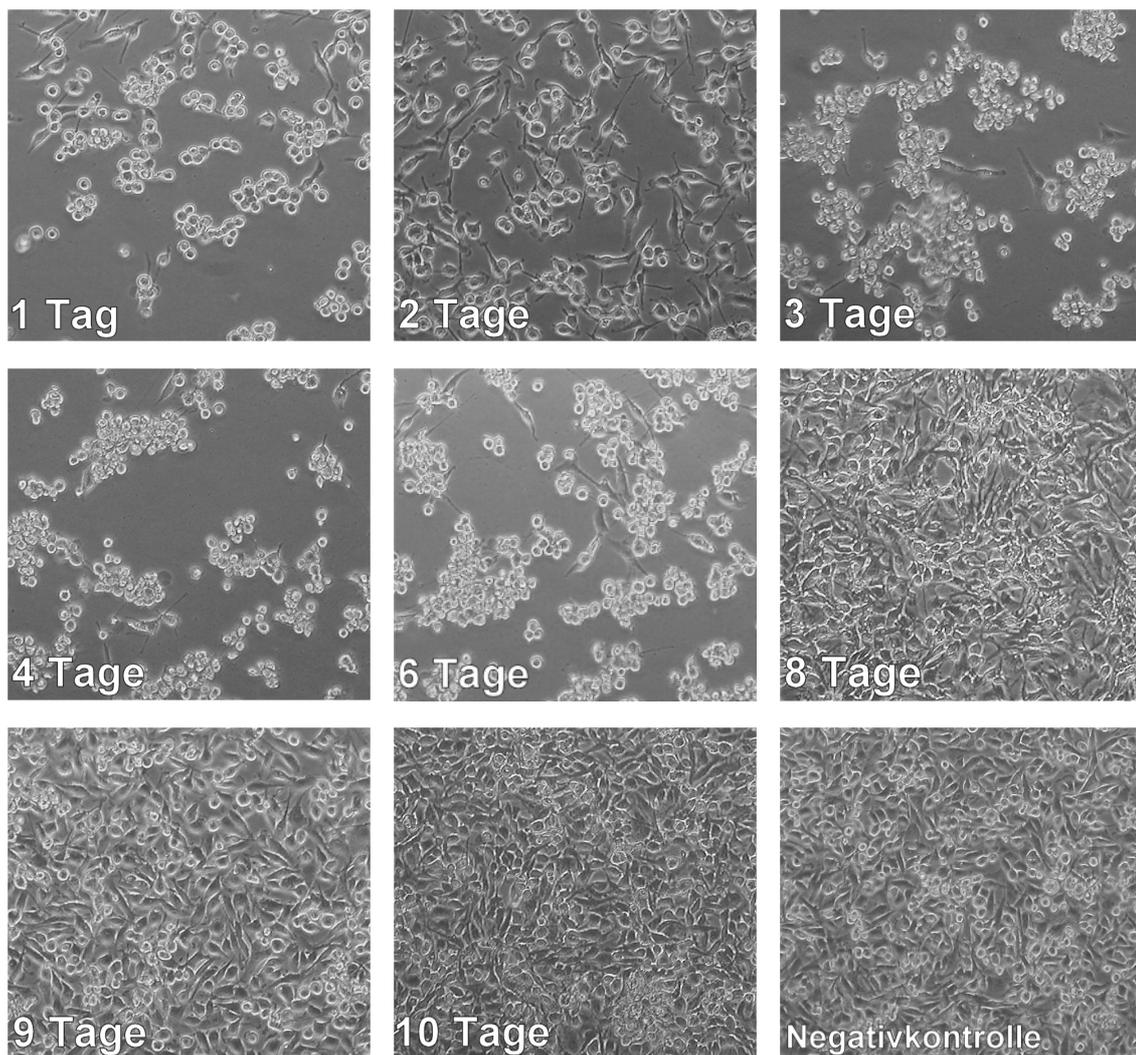


Abbildung 19: CrFK-Monolayer nach 48h Inkubation mit zermörserten, FCV-infizierten Flöhen. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitraum, in dem die Flöhe nach initialer Fütterung mit FCV-infiziertem Blut ohne weitere Blutmahlzeit gehalten wurden. Negativkontrolle: Flöhe, die mit virusfreiem Blut gefüttert wurden.

Die CrFK-Zellkulturen mit den für 1, 2, 3 und 6 Tage ohne weitere Blutmahlzeit gehaltenen Flöhe zeigen eindeutig infektiöse Viren an, was sich in einer Abrundung der Zellen und einer damit einhergehenden Ablösung und Zerstörung des Monolayers zeigt. Alle anderen Zellkulturen ließen nach 48 Stunden Inkubation keine Veränderung des Monolayers erkennen und wurden daher für weitere 24 Stunden inkubiert. Die folgenden Abbildung zeigt die jeweiligen Monolayer nach insgesamt 72 Stunden Inkubation bei 37°C.

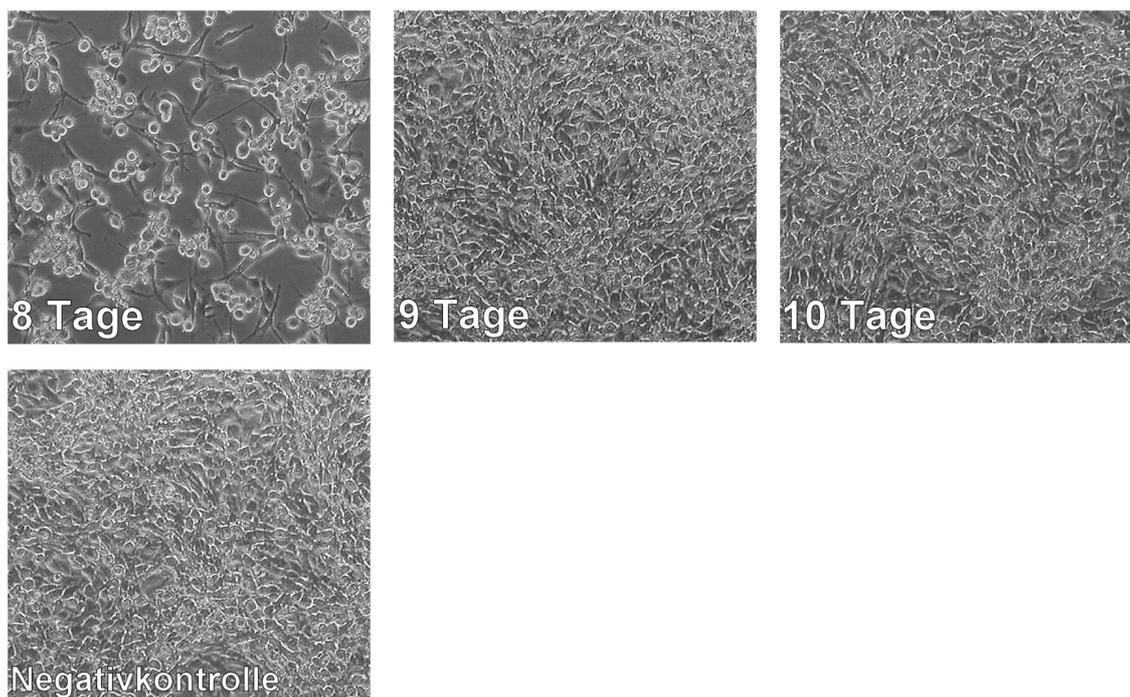


Abbildung 20: CrFK-Monolayer nach 72h Inkubation mit zermörsterten, FCV-infizierten Flöhen. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitraum, in dem die Flöhe nach initialer Fütterung ohne weitere Blutmahlzeit gehalten wurden. Negativkontrolle: Flöhe, die mit virusfreiem Blut gefüttert wurden.

Nach insgesamt 72 Stunden Inkubation zeigt auch der Ansatz mit den für 8 Tage ohne weitere Blutmahlzeit gehaltenen Flöhe infektiöse Viren an. Die Ansätze mit den 9 bzw. 10 Tage ohne weitere Blutmahlzeit gehaltenen Flöhen zeigten allerdings auch dann keine Veränderung des Monolayers. Um sicherzugehen, daß in diesen Ansätzen nicht doch geringe Mengen an infektiösen Viren vorhanden sind, wurden diese beiden Kulturen subkultiviert (siehe 2.11.2) und erneut für 48 Stunden inkubiert. Dies führte jedoch ebenso zu keiner Veränderung des Monolayers (nicht gezeigt), so daß davon ausgegangen werden konnte, daß diese Flöhe keine infektiöse Viren mehr enthielten. Alle Testansätze wurden jeweils 2 Mal mit reproduzierbarem Ergebnis wiederholt.

Der Versuch zeigt, daß die Flöhe nach einer mit FCV infizierten Blutmahlzeit bis zu 8 Tage bei Raumtemperatur infektiös bleiben. Flöhe, die nach einer FCV-Blutmahlzeit kein weiteres Blut zu sich nehmen, waren nach 9 Tagen nicht mehr infektiös.

Interessant ist jedoch ebenso die Frage, ob eine verlängerte Infektiosität der Viren bzw. der Flöhe zu beobachten ist, wenn man die Tiere bei gleicher Versuchsanordnung nach einer FCV-Blutmahlzeit bei 4°C hält, ihren Stoffwechsel also stark herabsetzt. Die folgende Abbildung zeigt die dazu erhaltenen Versuchsergebnisse. Da aus dem vorherigen Versuch bereits eine maximale Infektiositätsdauer bei Raumtemperatur von 8 Tagen festgestellt werden konnte, wurde dieser Versuch nur mit Flöhen durchgeführt, die nach initialer FCV-Blutmahlzeit für 8, 9 und 10 Tage ohne weitere Blutmahlzeit bei 4°C gehalten wurden.

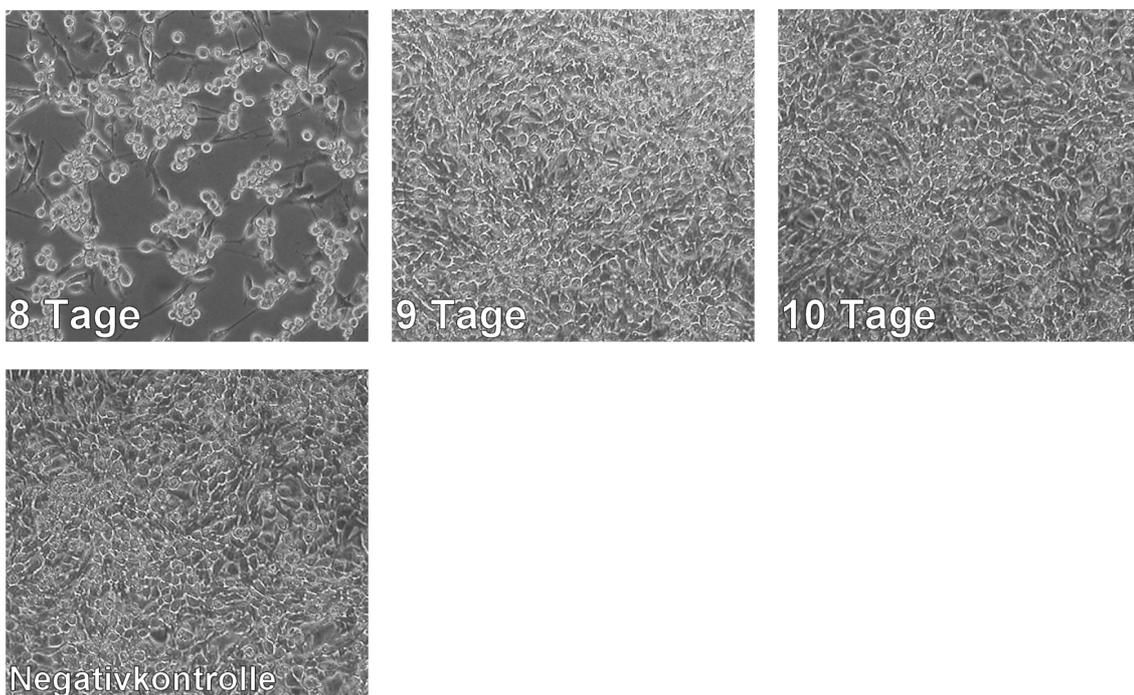


Abbildung 21: CrFK-Monolayer nach 48h Inkubation mit zermörserten FCV-Flöhen, die nach einer FCV-Blutmahlzeit bei 4°C gehalten wurden. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitraum, in dem die Flöhe ohne weitere Blutmahlzeit gehalten wurden.

Die CrFK-Zellkulturen mit den für 8 Tage ohne weitere Blutmahlzeit gehaltenen Flöhe zeigen eindeutig infektiöse Viren an. Die beiden anderen ließen nach 48 Stunden Inkubation keine Veränderung des Monolayers erkennen und wurden daher für weitere 24 Stunden inkubiert. Die folgende Abbildung zeigt die jeweiligen Monolayer nach insgesamt 72 Stunden Inkubation bei 37°C.

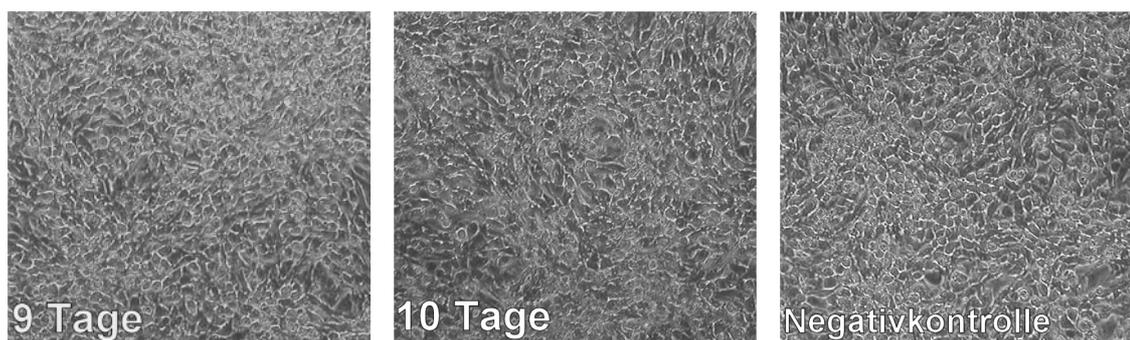


Abbildung 22: Inkubation der CrFK- Monolayer aus Abbildung 22 für weitere 24h.

Wie zu sehen ist, führte auch eine Inkubation für zusätzliche 24 Stunden zu keiner weiteren Veränderung des Monolayers, ebenso eine anschließende Subkultivierung. Alle Testansätze wurden jeweils 2 mal mit reproduzierbarem Ergebnis wiederholt.

Insgesamt gesehen hatte somit die Umgebungstemperatur, bei der die Flöhe gehalten wurden, keinen Einfluß auf die Infektiosität des FCV bzw. der Flöhe. Beide Male sind die Flöhe bis zu 8 Tage nach einer FCV infizierten Blutmahlzeit infektiös.

3.5.2 Infektiosität von FCV-infiziertem Flohkot

Um den Zeitrahmen zu bestimmen, in dem FCV infizierter Flohkot infektiös bleibt, wurden 2000 Flöhe mit FCV infiziertem Blut gefüttert. Dann wurde der innerhalb 24 Stunden produzierte Kot abgesammelt, durchmischt, in zwei gleiche Mengen geteilt und bei Raumtemperatur bzw. 4°C gelagert. Je 15 mg Kot wurde an den Tagen 6, 7, 8, 9 und 10 entnommen und mit 1 ml PBS vermischt. Die resultierende Suspension wurde anschließend auf einen intakten CrFK-Monolayer (mit 25 ml Wachstumsmedium) gegeben. Abbildung 23 zeigt die jeweiligen CrFK-Monolayer nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C mit der Kotsuspension der bei 23°C gelagerten Kotproben.

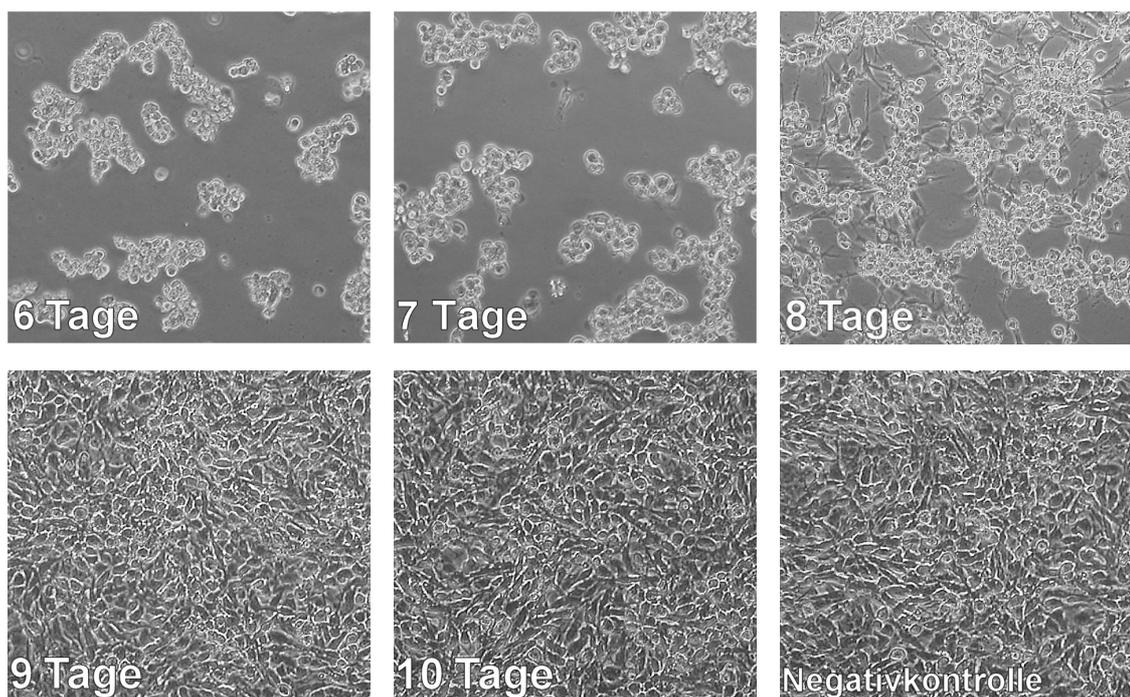


Abbildung 23: CrFK-Monolayer nach 24h Inkubation mit FCV-Flohkot. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitraum, in dem der Kot nach Ausscheidung bei 23°C gelagert wurde. Negativkontrolle: Uninfizierter Flohkot.

Eine Inkubation für weitere 48h mit dem 9 bzw. 10 Tage alten Flohkot brachte keine Veränderung des Monolayers.

Um sicherzugehen, daß in diesen Ansätzen nicht doch geringe Mengen an infektiösen Viren vorhanden waren, wurden diese beiden Kulturen subkultiviert (siehe 2.11.2) und erneut für 48 Stunden inkubiert. Dies führte zu keiner Veränderung des Monolayers, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß diese Kotproben keine infektiöse Viren enthielten. Alle Testansätze wurden jeweils 2 Mal mit gleichem Ergebnis wiederholt.

Die Bilder zeigen, daß FCV-infizierter Flohkot bei Raumtemperatur mindestens bis zu 8 Tage nach Ausscheidung infektiös bleibt. Auch hier ist jedoch interessant, ob sich dieser Zeitrahmen verlängern läßt, sofern die Lager- bzw. Umgebungstemperatur herabgesetzt wird. Abbildung 24 zeigt die jeweiligen Monolayer nach 48 Stunden Inkubation mit der Kotsuspension der bei 4°C gelagerten Kotproben.

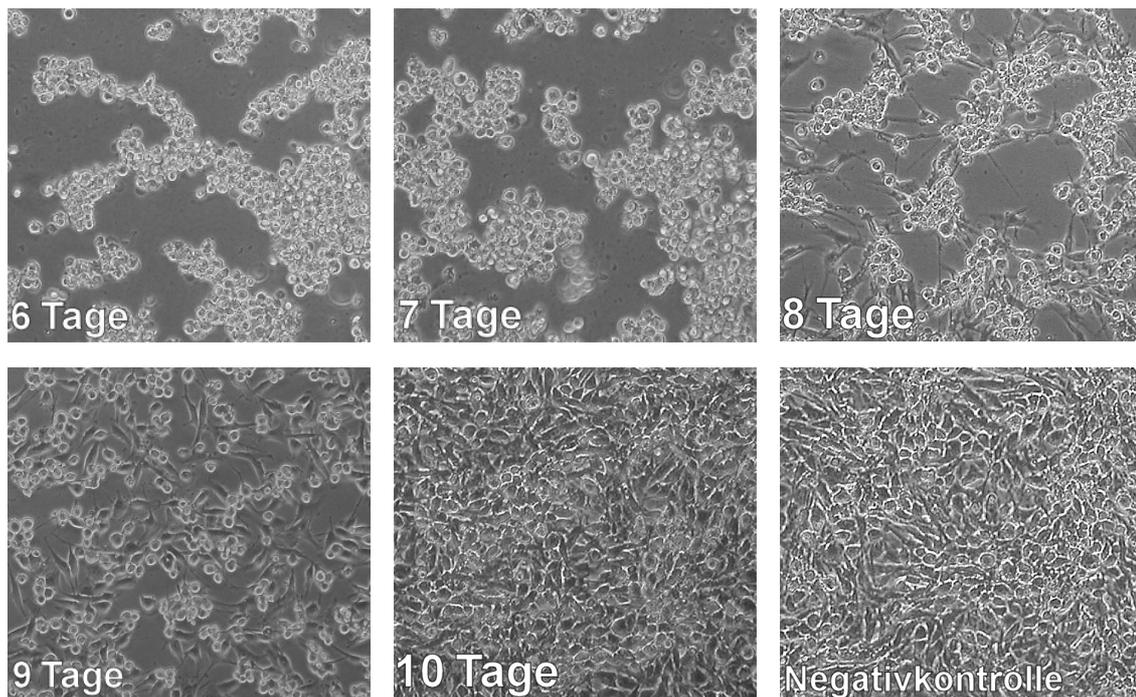


Abbildung 24: CrFK-Monolayer nach 48 Stunden Inkubation mit FCV-Flohkot. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitraum, in dem der Kot nach Ausscheidung bei 4°C gelagert wurde. Negativkontrolle: Uninfizierter Flohkot.

Eine weitere Inkubation für 48 Stunden der CrFK-Zellen mit dem 10 Tage alten Flohkot brachte keine Veränderung des Monolayers, ebenso waren mit Hilfe einer Subkultivierung keine infektiösen Viren nachweisbar.

Die Ergebnisse belegen, daß das FCV im Flohkot bei einer Herabsetzung der Umgebungstemperatur auf 4°C einen Tag länger infektiös bleibt, als das bei Raumtemperatur der Fall gewesen ist.

3.6 Nachweis einer *in vitro* Übertragung des FCV und FeLV durch den Katzenfloh

Um eine Übertragung der Viren *in vitro* nachzuweisen, wurden 50 Flöhe für 24 Stunden mit FCV bzw. FeLV-Rinderblut gefüttert. Danach wurden die Flöhe in einen neuen Flohcontainer überführt und für weitere 24 Stunden mit uninfiziertem Rinderblut gefüttert. Die jeweilige Blutquelle wurde anschließend mit Hilfe einer nested-PCR auf das Vorhandensein von Viren getestet, um auch Kleinstmengen nachweisen zu können. Abbildung 25 soll den Versuchsablauf verdeutlichen.

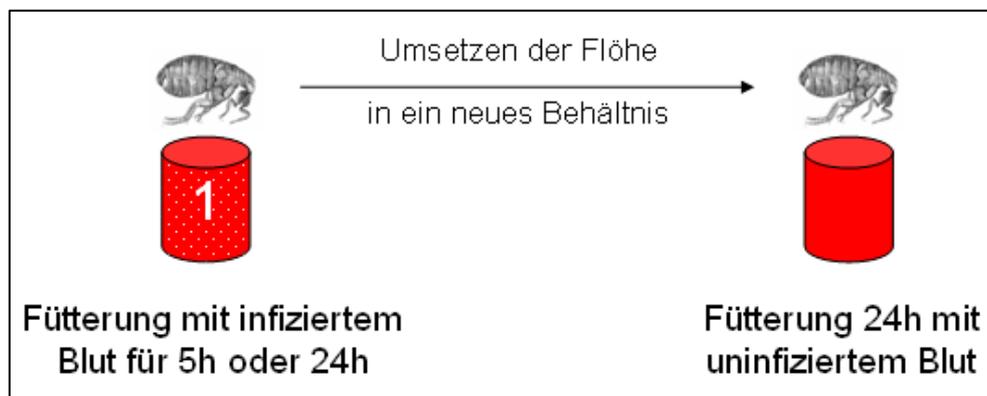


Abbildung 25: Schematische Übersicht des Versuchsablaufs zum Nachweis einer Virusübertragung durch den Katzenfloh. Die Flöhe werden für 24 Stunden mit infiziertem Rinderblut gefüttert, in ein neues Behältnis überführt und für weitere 24 Stunden mit uninfiziertem Rinderblut gefüttert. Danach wurde das Rinderblut mit Hilfe einer nested-PCR auf das Vorhandensein von Viren getestet.

Für den qualitativen Nachweis des FCV oder FeLV wurde dabei wie unter 2.10 beschrieben eine nested-PCR mit den jeweiligen Primerpaaren (Sense-FeLV1/Rev-FeLV1 und Sense-FeLV2/Rev-FeLV2 für den Nachweis des FeLV bzw. FCVSen201/FCVRev201 und FCVSen83/FCVRev83 für den Nachweis des FCV) verwendet. Mit dem FeLV wurden 9 Übertragungsversuche durchgeführt, mit dem FCV 12.

Die erste PCR-Reaktion der jeweiligen nested-PCR zeigte lediglich bei der jeweiligen Positivkontrolle eine sichtbare Bande. Die eingesetzten bzw. übertragenen Mengen waren anscheinend zu gering, um in einer einzigen PCR-Reaktion nach EtBr-Färbung die DNA im Agarosegel sichtbar zu machen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der jeweils zweiten PCR-Reaktion der nested-PCR beim Nachweis der Viren gezeigt. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis des qualitativen Nachweises des FeLV innerhalb einer Reihe von 9 Übertragungsversuchen, Abbildung 27 das Ergebnis der mit dem FCV durchgeführten 12 Übertragungsversuche.

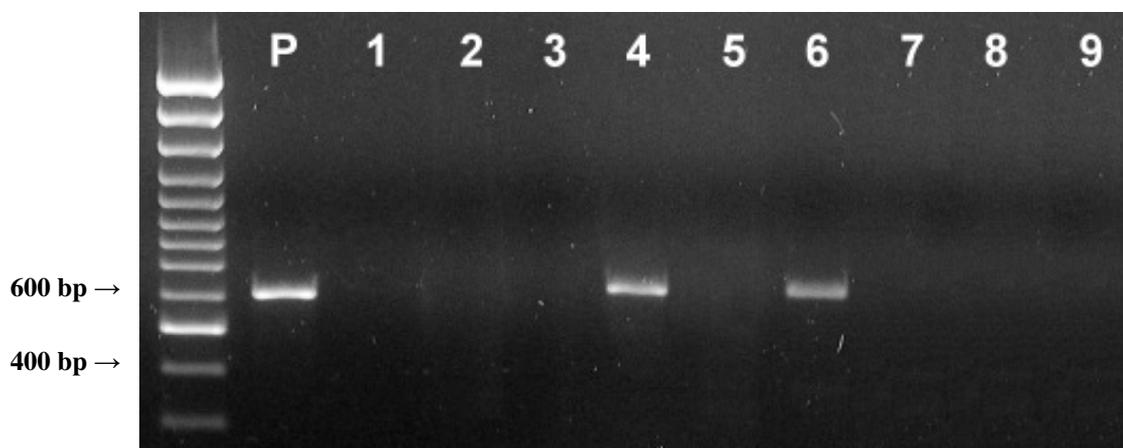


Abbildung 26: Nachweis einer Übertragung des FeLV durch den Katzenfloh *in vitro* innerhalb einer Reihe von 9 Übertragungsversuchen (1-9). Das Bild zeigt das Ergebnis der zweiten PCR-Reaktion der nested-PCR mit dem Primepaar Sense-FeLV2/Rev-FeLV2, das eine 601 bp Sequenz im FeLV-Genom flankiert.

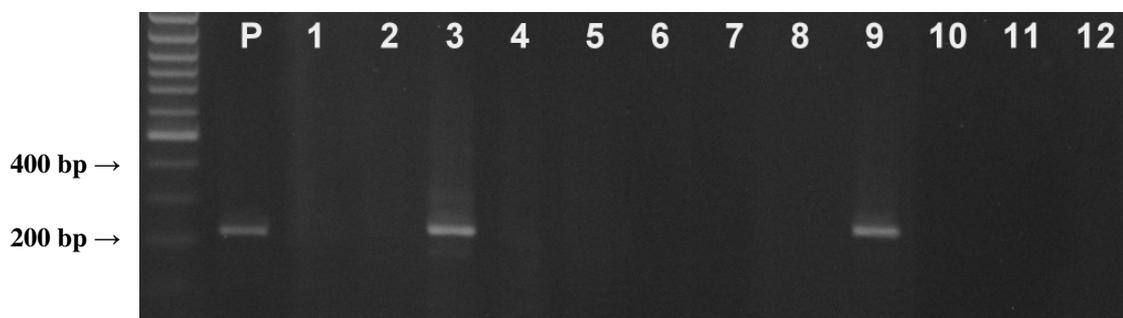


Abbildung 27: Nachweis einer Übertragung des FCV durch den Katzenfloh *in vitro* innerhalb einer Reihe von 12 Übertragungsversuchen (1-12). Das Bild zeigt das Ergebnis der zweiten PCR-Reaktion der nested-PCR mit dem Primepaar FCVSen209/FCVRev209, das eine 209 bp Sequenz im FCV-Genom flankiert.

In der zweiten PCR-Reaktion der nested PCR sind Fragmente von 601 bp (FeLV) bzw. 209 bp (FCV) amplifiziert worden. In 2 von 9 Versuchen (FeLV) und in 2 von 12 Versuchen wurde somit Virus von einer infizierten Blutquelle zu einer uninfizierten durch den Floh bzw. den Flohstich übertragen worden bzw. konnte eine Übertragung nachgewiesen werden.

3.7 *In vivo* Infektiositätstests mit dem FCV

Die unter 3.5 anhand des artifiziellen Testsystems gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß das FCV und das FeLV durch den Katzenfloh *in vitro* übertragen werden können. Die Versuche lassen letztlich jedoch nur bedingt eine Aussage darüber zu, ob dieser Sachverhalt auch in der freien Natur zutrifft. Daher wurde die Übertragung des FCV durch einen Flohstich oder den Flohkot innerhalb eines *in vivo* Testsystems durchgeführt. Das FCV eignet sich für diese Testreihe erheblich besser als das FeLV, weil es eine bessere Stabilität besitzt. Das FeLV verliert innerhalb von wenigen Minuten im Freien seine Infektiosität, ist aber generell sehr anfällig gegen Wärme und Austrocknung. Aufgrund dieser „Sensibilität“ der Viren bestand die Gefahr, daß die Infektiositätstests mit einem erheblichen oder gar hundertprozentigem Anteil inaktivierter Viren durchgeführt worden wäre. Das Virus wäre also in einigen Fällen nicht im Floh, sondern vielleicht bereits vorher inaktiviert worden, was die Ergebnisse verfälscht hätte. Daher wurden alle Infektiositätstest mit dem weitaus stabileren FCV durchgeführt.

Für die *in vivo* Übertragungsversuche wurden 4 Monate alte Katzenwelpen verwendet, die unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) aufgewachsen sind. Dementsprechend tragen sie keine FCV-oder andere gegen Viren gerichtete Antikörper im Blut, die das Versuchsergebnis verfälschen könnten. Die Katzen wurden bei Bayer CropScience (HealthCare-Division Animal Health, Monheim) unter S3-Bedingungen gehalten. Abbildung 28 gibt einen schematischen Überblick der verwendeten Räumlichkeiten und Stallungen der Versuchsgruppe 1 (Übertragung durch Flohkot) bzw. Gruppe 2 (Übertragung durch den Floh).

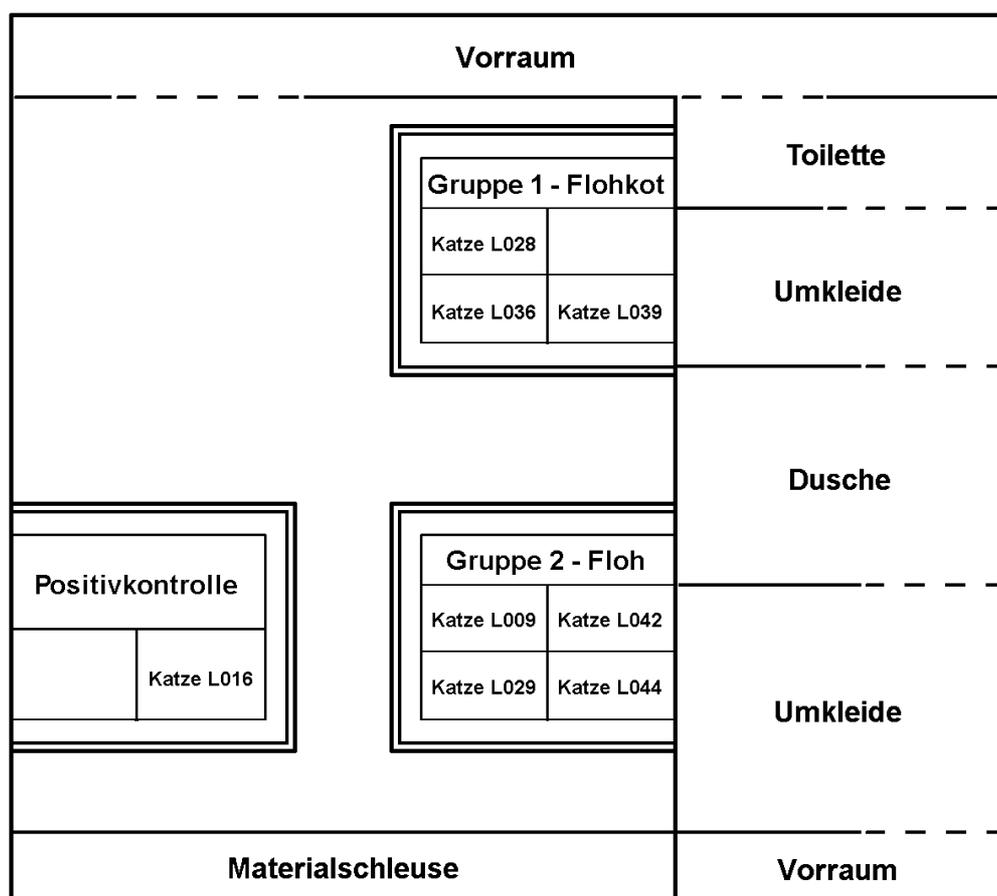


Abbildung 28: Aufstellungsplan der Katzenwelpen und Übersicht der Versuchsräumlichkeiten innerhalb der *in vivo* Versuchsreihe. Schraffierte Linien symbolisieren eine Tür, Doppellinien eine Plastikwand.

Das Betreten der Versuchsräume bzw. Stallungen fand nur unter Tragen von Schutzkleidung (Einmalanzüge, Haube, Handschuhe, Mundschutz und Stiefel) statt, die zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Infektion mit Flöhen, Flohkot oder Positivkontrolle) gewechselt werden mußte, um eine Kreuzkontamination oder Übertragung von Virus bzw. Flöhen zu vermeiden. Die Studiengruppen wurden durch Plastikwände voneinander getrennt. Die einzelnen Katzen wurden in speziellen Versuchskäfigen gehalten. Abbildung 29 zeigt die Käfige zur Haltung der Katzenwelpen.



Abbildung 29: Käfige zur Haltung der Katzenwelpen. Die Käfige standen für jeweils 1 Versuchsgruppe (Übertragung durch Kot oder Floh) in einer 2 x 2 Formation (2 Käfige nebeneinander, darüber 2 weitere Käfige). Die Käfige zu den jeweils anderen Gruppen waren durch eine Plastikwand getrennt.

Die Versuchskatzen wurden dabei auf einem Drahtgitter gehalten. Bei dem Infektionsversuch mit Flöhen sollte dies sicherstellen, daß anfallender Flohkot durch das Gitter nach unten fällt, so daß eine Infektion durch Flohkot möglichst ausgeschlossen werden kann und etwaige Infektionen allein auf den Flohstich zurückzuführen sind.

3.7.1 Nachweis einer *in vivo* Übertragung des FCV durch den Katzenfloh

Um die *in vivo* Übertragung des FCV durch den Katzenfloh zu beweisen, wurden in die Ställe der Katzen L029, L042 und L044 jeweils 50 FCV-infizierte Flöhe entlassen. Tabelle 10 fasst die wichtigsten Daten zusammen.

Katze	Infektion durch	Applikation	FCV-Titer in 10 Flöhen
L009	50 Flöhe	Verteilen im Nackenfell	~ 10 ⁴ Viren
L029	50 Flöhe	Verteilen im Nackenfell	~ 10 ⁴ Viren
L042	45 Flöhe	Verteilen im Nackenfell	~ 10 ⁴ Viren
L044	50 Flöhe	Verteilen im Nackenfell	~ 10 ⁴ Viren

Tabelle 10: Übersicht der Infektionsart und Anzahl bei der *in vivo* Infektion mit FCV von Katzenwelpen durch Flöhe.

Eine Untersuchung der Katzen bzw. eine Probennahme erfolgte an den Tagen 0 (*prae infectionem*) 2, 4, 7, 9, 12, 14, 16, 19 und 21 (*post infectionem*). Die Untersuchung wurde jeweils in der Reihenfolge Gruppe 1 (Kot), Gruppe 2 (Flöhe) und Positivkontrolle durchgeführt.

An diesen Tagen wurde jeweils bei allen 4 Katzen Rachentupfer entnommen. Der Nachweis von FCV aus den Rachentupfern erfolgte anhand einer Virusisolierung.

An den Tagen 0 (*prae infectionem*) 7, 14, 21 und 28 wurden bei den Katzen Serumproben entnommen. Die Probenentnahme von 1ml Blut erfolgte an der rechten bzw. linken Vena cephalica antebrachii oder Vena femoralis in spezielle Röhrchen, die der Serumgewinnung dienen (Becton Dickinson, Heidelberg). Die Blutproben wurden über Nacht bei 8°C gelagert und dann bei 4000 rpm für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert, in Eppendorfcups überführt und bis zur Auswertung am Ende der Testreihe nach 21 Tagen bei -20°C gelagert.

Die FCV-spezifischen Antikörper wurden in einem Neutralisationstest mit FCV-KS20 als Testvirus und CrFK-Zellen in 96-Lochplatten bestimmt. Die Seren wurden in \log_5 -Schritten verdünnt, mit 100 GKID₅₀ Virus inkubiert und auf die empfänglichen Zellen verbracht. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Meßergebnisse zu den Serumproben und die Positivkontrolle zum Vergleich.

Auswertung Serumproben Neutralisationstest					
	Studientag	0	7	14	21
Positiv- kontrolle	L016	<1:2	1:8	1:256	1:1024
	L009	<1:2	1:20	1:80	1:160
Gruppe 2 Floh	L029 (2x)	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
	L042 (2x)	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
	L044 (2x)	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2

Tabelle 11: Auswertung der Serumproben, die an den Tagen 0 (prae infectionem), 7, 14 und 21 post infectionem genommen wurden. Der Nachweis von FCV-Antikörpern erfolgte anhand eines Neutralisationstests mit FCV-KS20 als Testvirus und CrFK-Zellen. Die Werte geben die Verdünnungen der Serumproben der Katzenwelpen an, bei der mit FCV-KS20 (bei 100 GKID₅₀) und CrFK-Zellen eine Neutralisation der Viren erfolgte. 2x=ein Wiederholungsversuch mit den selben Tieren führte zum gleichen Ergebnis.

Tabelle 11 ist zu entnehmen, daß sowohl die Katze der Positivkontrolle (L016), als auch Katze L009 FCV-Antikörper gebildet haben.

Bei den übrigen 3 Katzen war keine Antikörperproduktion nachweisbar, so daß der Versuch mit diesen Tieren wiederholt wurde. Dabei waren die Ergebnisse identisch, so daß insgesamt bei einem von acht Versuchen die direkte Übertragung des Virus durch den Floh nachgewiesen werden konnte.

Um das FCV in Rachentupfern nachzuweisen und damit eine erfolgreiche Virusreproduktion zu belegen, wurden die Tupfer aufgetaut und in geschlossenen Röhrrchen mit Ultraschall behandelt. Danach wurde das Medium dekantiert. Nach Sterilfiltration durch einen 20 µm Filter wurden CrFK-Zellen (5×10^6 Zellen in einer 25cm²-Flasche) mit 0,5ml des Tupfermediums inokuliert und auf cytopathische Effekte hin beobachtet. Tabelle 12 fasst die Ergebnisse zusammen.

Auswertung Rachentupfer Virusisolierung											
	Studientag	0	2	4	7	9	12	14	16	19	21
Positiv- kontrolle	L016	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L009	-	+	+	+	-	/	-	+	+	-
Gruppe 2 Floh	L029 (2x)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L042 (2x)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L044 (2x)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 12: Auswertung der Serumproben, die an den Tagen 0 (prae infectionem) und 2 bis 21 post infectionem genommen wurden. Ein Pluszeichen zeigt einen positiven Test auf FCV mit Hilfe einer CrFK-Zellkultur (cytopathischer Effekt) an, ein Minuszeichen ein Ausbleiben eines solchen Effekts. 2x=ein Wiederholungsversuch mit denselben Tieren führte zum gleichen Ergebnis. Der Rachentupfer von Tag 12 und Katze L009 ging verloren und konnte daher nicht ausgewertet werden (Schrägstrich).

Bei der Positivkontrolle konnten, wie zu erwarten, aus allen Rachentupfern infektiöse Viren isoliert werden. Bei den mit FCV-Flöhen infizierten Katzen konnte in einem von vier Fällen die Produktion infektiöser Viren nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um die Katze (L009), die bereits positiv auf FCV-Antikörper getestet worden war. Bei den übrigen 3 Katzen war keine Virusproduktion nachweisbar, so daß der Versuch mit diesen Tieren wiederholt wurde. Dabei waren die Ergebnisse identisch, so daß insgesamt bei einem von acht Versuchen die Übertragung des Virus durch den Floh mit einhergehender Virusvermehrung in der Katze nachgewiesen werden konnte.

3.7.2 Nachweis einer *in vivo* Übertragung des FCV durch den Kot des Katzenflohs

Um zu überprüfen, ob FCV-infizierter Flohkot auch *in vivo* zu einer tatsächlichen Infektion bei einer Katze führen kann, wurde eine Gruppe von 3 SPF-Katzen (Gruppe 1) laut Aufstellungsplan gehalten. 1000 Flöhe wurden für 24h mit FCV-infiziertem Blut gefüttert. Der angefallene Flohkot wurde abgesammelt und auf Trockeneis an die Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig versandt und dort bis zu Versuchsbeginn bei -80°C gelagert. Kurz vor Versuchsbeginn wurde der Kot in PBS gelöst, wobei der Virustiter der resultierenden Suspension auf 10^6 GKID₅₀/ml eingestellt wurde. Diese Suspension wurde dann für die Infektionsversuche verwendet.

Die Katzen L028, L036 und L039 wurden oral und nasal mit 1 ml dieser FCV-Flohkot-Suspension infiziert (0,5 ml oral und je 0,25 ml nasal pro Nasenloch). Bei einer dieser Katzen (L039) wurde die Prozedur nach einer Stunde wiederholt. Katze L016 diente als Positivkontrolle und wurde mit 1ml Zellkulturüberstand einer mit dem FCV infizierten CrFK-Zellkultur gleicher Dosis infiziert. Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die Art und Anzahl der durchgeführten Infektionen bei den jeweiligen Katzen.

Katze	Infektion durch	Applikation	Dosis
L016	Zellkulturüberstand (Positivkontrolle)	1 x oral 0,5ml 2 x nasal 0,25ml	10^6 GKID ₅₀ /ml
L028	Flohkot-PBS Suspension	1 x oral 0,5ml 2 x nasal 0,25ml	10^6 GKID ₅₀ /ml
L036	Flohkot-PBS Suspension	1 x oral 0,5ml 2 x nasal 0,25ml	10^6 GKID ₅₀ /ml
L039	Flohkot-PBS Suspension	1 x oral 0,5ml 2 x nasal 0,25ml wiederholt nach 1h	10^6 GKID ₅₀ /ml

Tabelle 13: Übersicht der Infektionsart und Anzahl bei der *in vivo* Infektion mit FCV von Katzenwelpen durch Flohkot.

An den Tagen 0 (*prae infectionem*) 7, 14, 21 und 28 (*post infectionem*) wurden bei den Katzen Serumproben entnommen. Probenentnahme, Präparation und Auswertung erfolgte wie bereits unter 3.6.1 beschrieben.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Meßergebnisse zu den Serumproben.

Auswertung Serumproben Neutralisationstest					
	Studientag	0	7	14	21
Positiv- kontrolle	Katze L016	<1:2	1:8	1:256	1:1024
	Katze L028	<1:2	<1:2	1:64	1:256
Gruppe 1 Flohkot	Katze L036	<1:2	<1:2	1:32	1:128
	Katze L039	<1:2	<1:2	1:128	1:256

Tabelle 14: Auswertung der Serumproben, die an den Tagen 0 (*prae infectionem*), 7, 14 und 21 *post infectionem* genommen wurden. Der Nachweis von FCV-Antikörpern erfolgte anhand eines Neutralisationstests mit FCV-KS20 als Testvirus und CrFK-Zellen. Die Werte geben die Verdünnungen der Serumproben der Katzenwelpen an, bei der mit FCV-KS20 (bei 100 GKID₅₀) und CrFK-Zellen eine Neutralisation der Viren erfolgte.

Wie sich zeigt, konnte bei allen mit Kot infizierten Katzen eine Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Die zweimalige Infektion von Versuchskatze L039 bewirkte einen höheren Antikörpertiter am Versuchstag 14, der aber nach 21 Tagen vergleichbar mit dem eines einmalig infizierten Tieres war (Katze L028).

An den Tagen 2, 4, 7, 9, 12, 14, 16, 19 und 21 *post infectionem* wurde jeweils bei allen 7 Katzen Rachentupfer entnommen. Die Bearbeitung und Auswertung der Proben erfolgte wie bereits unter 3.7.1 beschrieben. Tabelle 15 zeigt fasst die Ergebnisse der Virusisolierung zusammen.

Auswertung Rachentupfer Virusisolierung											
	Studientag	0	2	4	7	9	12	14	16	19	21
Positiv- kontrolle	L016	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gruppe 1 Flohkot	L028	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L036	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L039	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 15: Ergebnisse der Virusisolierung aus den Rachentupfern der mit FCV-Flohkot Suspension infizierten Katzenwelpen. Ein Pluszeichen steht für eine erfolgreiche Virusisolierung mit CrFK-Zellen aus dem Rachentupfer (sichtbarer, cytopathischer Effekt), ein Minuszeichen für eine nicht erfolgreiche Virusisolierung (kein sichtbarer cytopathischer Effekt).

Bei der Positivkontrolle konnten, wie zu erwarten war, aus allen Rachentupfern infektiöse Viren isoliert werden. Ebenso konnte bei allen mit Kot infizierten Katzen die Produktion infektiöser Viren nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse aus 3.5.1 und 3.5.2 zeigen, daß eine FCV-Infektion *in vivo* sowohl durch den Katzenfloh selbst als auch durch dessen Kot ausgelöst werden kann. Dabei war die Infektion mit Flohkot in 100% der Fälle erfolgreich, wo hingegen der Flohstich selbst in nur einem von 8 Fällen zu einer Infektion geführt hat. Dies mag an der relativ niedrigeren Viruslast der Flöhe im Vergleich zum Kot oder in einer nur geringen Menge an durch den Floh übertragenen Viren liegen.

4. Diskussion

4.1 Der Katzenfloh als viraler Vektor *in vitro* und *in vivo*

Die Stabilität bzw. Verweildauer von Viren im Floh ist von großer Bedeutung für das Vektorpotential. Je länger Viren im Floh nachweisbar sind, desto höher ist das Ansteckungsrisiko für die in Reichweite des Flohs befindlichen potentiellen Wirtstiere. Innerhalb dieser Arbeit wurde der Verlauf des Virustiters im Floh nach Aufnahme von FeL- oder FC-Viren bei einer Blutmahlzeit untersucht. Die anhand der Quantifizierung mittels Realtime-PCR gewonnenen Daten zeigen, daß die Nachweisbarkeitsgrenze stark temperaturabhängig ist. Die Viren sind bei Raumtemperatur für ca. 30 Stunden im Falle des FeLV und für 46 Stunden im Falle des FCV im Floh nachweisbar, wobei jedoch das Maximum von 46 Stunden beim FCV lediglich bei einer Flohpopulation erreicht wurde, und auch dort nach 30 Stunden nur noch geringe Mengen von 4 % der ursprünglich aufgenommenen Viren gefunden werden konnten (Abbildung 11 und 14).

Eine Anmerkung muß dabei zu den Standardabweichungen der Messungen gemacht werden. Die abgesammelten Flöhe können unterschiedlich viel Blut aufnehmen. Ebenso lassen sich die Flöhe bei einer Blutmahlzeit leicht stören, so daß einige Flöhe länger gesaugt und damit mehr, andere etwas weniger Blut zu sich genommen haben. Diese Unterschiede in der Aufnahme von Blut führen zu größeren Schwankungen bei der Titerbestimmung, was sich in den Standardabweichungen widerspiegelt.

Allgemein kann gesagt werden, daß ein Zeitfenster von ungefähr anderthalb Tagen existiert, während dessen die Viren im Floh bei Raumtemperatur nachweisbar sind. Eine drastische Veränderung dieses Zeitrahmens läßt sich jedoch beobachten, wenn die Umgebungstemperatur herabgesetzt wird. Flöhe sind in der Lage, auch Temperaturen weit unter ihren normalen Lebensbedingungen zu überstehen.

So ließen sich die in dieser Arbeit verwendeten Flöhe nüchtern (die Adulten hatten keine einzige Blutmahlzeit nach dem Schlüpfen zu sich genommen) für 3 Wochen bei 4°C in einer Kühlkammer halten, ohne das die Mortalität der Tiere im Vergleich zu einer einwöchigen Haltung beeinträchtigt worden wäre. Generell ist die Lebenserwartung von Katzenflöhen an die Umweltbedingungen gekoppelt. So können ungefütterte Adulte je nach Luftfeuchte und Temperatur zwischen 1 Tag (35°C / 2% Luftfeuchte) und 40 Tagen (16°C / 100% Luftfeuchte) überleben (Silverman et al. 1981). Diese Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer dürfte eng mit einem herabgesetzten Metabolismus zusammenhängen, was sich zumindest nach Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit vermuten läßt.

Senkt man nämlich die Umgebungstemperatur auf 4°C herab, so steigt die Nachweisbarkeitsgrenze der Viren im Floh auf weit über 1 Woche. Nach dieser Zeit sind selbst Mengen von über 50% der bei der Blutmahlzeit aufgenommenen Viren im Floh nachweisbar. Dies mag einerseits an einer verringerten Verstoffwechslung, andererseits an der verminderten Ausscheidung von Kot liegen. Bei Raumtemperatur wird von den Flöhen sehr viel mehr Kot ausgeschieden, als bei 4°C (Abbildung 10). Die Herabsetzung der Umgebungstemperatur erzeugt also eine Art „stabil infizierten“ Floh, der für potentielle Wirtstiere eine ungleich größere Gefahr darstellt. Dies verlängerte Lebensdauer eines Katzenfloh bei niedrigen Temperaturen dient dem Überleben adulter Flöhe in kurzen Phasen abseits eines Wirtstieres (Silverman et al. 1981).

Gerade dieser Sachverhalt aber läßt einen mit Viren infizierten Floh zu einem erheblichen Gesundheitsrisiko werden. Ein Floh, der nach einer virusinfizierten Blutmahlzeit für kurze Zeit keinen Zugang zu einem Wirt hat, „verharrt“ bei niedrigeren Temperaturen (also abseits der Körperwärme des Wirtes), bis sich ein neuer Wirt findet. In der gleichen Zeit jedoch ist die Abnahme des Virustiters ebenso verlangsamt, so daß die Viren unter diesen Umständen über einen verlängerten Zeitraum im Floh verweilen können.

Nachdem der Floh einen neuen Wirt gefunden hat, kann er dann die immer noch in großer Zahl vorhandenen Viren bei der nächsten Blutmahlzeit durch den Stich übertragen. Bei einem direkten Wirtswechsel ist die dann verkürzte Verweildauer der Viren im Floh für eine Übertragung nicht von Bedeutung, da sie mit knapp anderthalb Tagen ausreichend lang genug ist: beide Geschlechter des Flohs beginnen mit der Blutaufnahme innerhalb der ersten Stunde nach Aufsuchen des Wirtes (Cadiergues et al. 2001), so daß innerhalb dieser Zeit genug Viren im Floh vorhanden sind, die übertragen werden können. Die Verweildauer der Viren im Floh ist also je nach Umgebungstemperatur variabel und paßt sich so an, daß der Floh nach Aufnahme von Viren bei einer Blutmahlzeit auch bei wechselnden Umweltbedingungen immer in der Lage ist, diese auf ein Wirtstier zu übertragen. Dabei müssen die Viren keineswegs zwingend durch den Stichkanal injiziert bzw. übertragen werden. Ein Zerbeißen der Flöhe würde ebenso ausreichen, um die Viren freizusetzen und das Wirtstier zu infizieren.

Tatsächlich werden viele Flöhe vom befallenen Wirt oral aufgenommen, so daß sogar das Putzverhalten des Wirtes großen Einfluß auf die Lebensdauer eines adulten Flohs hat (Dryden 1988; Dryden 1989; Wade und Georgi 1988). So können zwischen 4 % und 17 % der Flöhe vom Wirt allein durch Putzen oral aufgenommen und der Flohbefall so vermindert werden (Hinkle et al. 1998). Dass bei diesem Vorgang auch immer wieder Flöhe zerbissen werden und damit im Floh befindliche Viren freigesetzt werden können, zeigt sich am Beispiel des auch als Kürbiskernbandwurm bezeichneten, weitverbreiteten Cestoden *Dipylidium caninum*: das Zerbeißen infizierter Flöhe durch das Wirtstier zur Freisetzung infektiöser Cysticercoide ist Bedingung für eine erfolgreiche Infektion (Hinaidy 1991). Ein mit Viren infizierter Floh ist daher als großes Infektionsrisiko anzusehen, welches im Flohstich oder durch Zerbeißen durch den Wirt begründet liegt.

Ein weiterer bemerkenswerter Sachverhalt wird deutlich, wenn man die Abnahmegeschwindigkeiten des Virustiters im Floh betrachtet. Man hätte davon ausgehen können, daß der Virustiter im Floh über die Zeit konstant abnimmt. Die Abnahmegeschwindigkeit der Viren im Floh ist allerdings nicht konstant. Vielmehr nimmt der Titer 3 Stunden nach der Blutmahlzeit mit ca. 9 % pro Stunde beim FeLV bzw. 13 % pro Stunde beim FCV sehr viel schneller ab, als nach 20 Stunden ohne Blutmahlzeit mit ca. 5 % bzw. 6 % pro Stunde (Abbildung 16). Tatsächlich werden durchschnittlich weit mehr als die Hälfte (58 %) der bei einer Blutmahlzeit vom Floh aufgenommenen Viren innerhalb der ersten 10 Stunden mit dem Flohkot wieder ausgeschieden (Abbildung 18). Mit fortschreitender Zeit verlangsamt sich dieser Prozeß deutlich. Wahrscheinlich sollen so nach dem Ausbleiben weiterer Blutmahlzeiten die noch vorhandenen Nährstoffe im Floh effizienter genutzt werden. Auf diese Weise kann sich der Floh kurzzeitiger Nahrungsknappheiten anpassen. Bei 4°C Umgebungstemperatur hingegen stellt sich die Geschwindigkeit der Titerabnahme bei anfänglichen Werten von 5-6 % pro Stunde nach ca. 20 Stunden auf unter 1 % pro Stunde ein, was das Infektionsrisiko durch einen infizierten Floh bei niedrigen Umgebungstemperaturen deutlich erhöht.

Worauf der Unterschied in den Titerabnahmen zwischen FeLV und FCV im Floh bei Raumtemperatur beruht, ist nicht bekannt. Vielleicht spielen die unterschiedlich hohen Ausgangstitere für das FeLV und FCV eine Rolle, oder die unterschiedlichen Mengen an aufgenommenem Blut.

Eine längere Verweildauer bzw. Nachweisbarkeit der Viren im Floh erhöht zwar das generelle Infektionsrisiko, sagt letztlich aber nichts über die Gefahr einer aktiven Übertragung aus. Mit aktiv ist gemeint, daß im Floh befindliche Viren direkt durch den Stich in den Wirt injiziert werden. Eine solche aktive Übertragung ist im Falle des Pestbakteriums *Yersinia pestis* beschrieben, wobei dieser Vorgang an eine Vermehrung der Pathogene im Floh gebunden ist. Die Bakterien vermehren sich nach einer Infektion massenhaft im Vormagen (sog. Prostomium) des Flohs. Ist eine bestimmte Menge an Bakterien erreicht, verstopft dieser Teil des Magens.

Bei einer anschließenden Blutmahlzeit erbricht der Floh aufgrund des bereits gefüllten Prostomiums und überträgt dadurch die Bakterien in die Stichwunde (Bacot und Martin 1914; Kupferschmidt 1993). Im Falle des Pestbakteriums ist eine Vermehrung der Keime somit eine notwendige Voraussetzung für die Übertragung von Wirt zu Wirt. Ob sich im Prostomium generell Blut vorangegangener Mahlzeiten des Flohs befindet, welches bei einem Stich übertragen werden kann, ist bisher nicht bekannt. Die Übertragung von Viruspartikeln *in vitro* durch den Floh jedoch ist möglich (Abbildung 26 und 27). Mit FeLV oder FCV Infizierte Flöhe, die an einer uninfizierten Blutquelle saugen, übertragen in einigen Fällen die Viren.

Im Falle des FeLV ist eine mögliche *in vivo* Übertragung bereits diskutiert worden (Harrus et al. 2002; Vobis et al. 2003a, b). Ebenso wird teilweise davon ausgegangen, daß Flöhe ebenfalls als Überträger des Feline Immunodefizienzvirus (FIV) in Frage kommen (Harrus et al. 2002).

Eine Übertragung von Viren durch den Floh innerhalb der Versuche in dieser Arbeit war jedoch keineswegs in allen Fällen nachweisbar. Vielmehr konnte beim FeLV in 2 von 9, beim FCV in 2 von 12 Versuchen die Übertragung erfolgreich nachgewiesen werden. Der dabei übertragene Virustiter ist unbekannt. Gleiche Experimente mit Viren sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden, jedoch wurden Übertragungsversuche mit dem Katzenfloh und *Herpesvirus sylvilagus* durchgeführt (Spieker und Yuill 1977). Eine mögliche Übertragung wurde dabei jedoch lediglich anhand des Auftretens klinischer Symptome bei den Versuchstieren (Waldkaninchen) als erfolgreich angesehen. Es stellten sich keine klinischen Symptome bei den Wirtstieren nach Befall mit infizierten Flöhen ein. Die Autoren erklären sich dies unter anderem mit dem sehr niedrigen Virustiter in den Flöhen, der teils unter der infektiösen Dosis lag, und kommen gleichzeitig zu dem Schluß, daß der Floh keine bedeutende Rolle bei der Übertragung des Virus spielt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden FCV und FeLV zusammen mit einer Wahrscheinlichkeit von ungefähr 1:5 bzw. in 19% der Fälle *in vitro* übertragen. Es ist durchaus möglich, daß auch in einigen der anderen Versuche Viren übertragen wurden, was aufgrund der Verluste bei der RNA-Präparation oder unvollständiger reversen Transkription jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Die *in vitro* Übertragungsversuche mit dem FeLV und dem FCV legen den Schluß nahe, daß *in vivo* in einigen Fällen zwar Virusmaterial übertragen, dabei aber nicht die nötige infektiöse Dosis eines Pathogens erreicht werden wird. Eine endgültige und abgesicherte Aussage dazu kann allerdings anhand der hier durchgeführten Versuche nicht getroffen werden. Die Übertragungsversuche mit dem FeLV und FCV zeigen jedoch sehr deutlich, daß der Katzenfloh grundsätzlich als Vektor für Viren geeignet ist und Viruspartikel durch den Stich bei der Blutmahlzeit übertragen kann.

Diese *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse zeigen sehr deutlich das Potential des Katzenflohs als viraler Vektor. Es wäre jedoch nicht von klinischer Bedeutung, wenn der Katzenfloh zwar ein Virus überträgt, dieses aber nicht mehr infektiös ist. Daher muß zwingend untersucht werden, ob die Viren nach dem Saugvorgang noch infektiös sind, und wenn ja, wie lange sie im Floh infektiös bleiben. Die dazu nötigen Infektiositätstests wurden mit Hilfe von CrFK-Zellen durchgeführt. Diese Katzennierenzelllinie wächst als Monolayer und zeigt anhand eines cytopathischen Effekts (Abrundung der Zellen mit einhergehender Zerstörung des Zellrasens) infektiöses FCV an. Auf diese Weise konnte recht zuverlässig bestimmt werden, wie lange das FCV im Floh infektiös bleibt.

Da das FeLV wie alle Retroviren in der freien Umgebung gerade gegenüber Wärme und Austrocknung anfällig ist, und seine Infektiosität innerhalb kurzer Zeit verliert, wurden diese Versuche nur mit dem FCV durchgeführt. So konnte sichergestellt werden, daß die Infektiosität der Viren nicht bereits vor Versuchsbeginn vermindert war und ein viel längeres Zeitfenster für die Versuchsdurchführung zur Verfügung stand.

Die im Artificial Dog mit FCV-Blut gefütterten Flöhe sind Raumtemperatur bis zu 8 Tage infektiös (Abbildung 19 und 20). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der FCV-Titerbestimmung, innerhalb der nach ca. 40 Stunden bei Raumtemperatur keine Viren mehr im Floh nachgewiesen werden konnten. Dabei muß beachtet werden, daß die Flöhe vor der Bestimmung der Virustiters gewaschen worden sind, also von jedweden am Körper anhaftenden Kot- oder Virusresten gesäubert wurden. Innerhalb der Infektiositätsversuche ging es jedoch darum, ein möglichst realitätsnahes Bild der Infektionsgefahr zu untersuchen, weswegen die Flöhe nicht gewaschen wurden. Dieser Umstand erklärt die verlängerte Infektiosität der Tiere als Ganzes im Vergleich zum Verlauf des Virustiters im Floh.

Bei der Infektiosität der FCV infizierten Flöhe zeigt sich keine Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur. Sowohl die bei Raumtemperatur als auch die bei 4°C gehaltenen Flöhe sind bis zu 8 Tage infektiös. Diese *in vitro* getestete Infektiosität beruhend auf äußeren Virusresten oder Kotspuren am Floh sollte sich ohne Einschränkung auch auf *in vivo* Modelle übertragen lassen. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion z.B. einer Katze ist aufgrund dieses Sachverhalts sogar größer, als wenn die Viren lediglich im Floh vorhanden wären und erst durch Zerbeißen freigesetzt werden müssen. So reicht theoretisch allein das Ablecken der Flöhe, um möglicherweise Viren im Rachenraum einer Katze freizusetzen. Der Kontakt der Viren mit der Mundschleimhaut der Katze entspricht dem natürlichen Infektionsweg des FCV.

Der Katzenfloh ist also auch ein passiver, rein mechanischer Überträger von Viren. Sicherlich bewirken die im Vergleich zur natürlichen Lebensweise geringen Platzverhältnisse in den Flohcontainern einen engeren Kontakt zu den klebrigen Kot- und Blutresten. Aber auch unter natürlichen Bedingungen kommt der Floh immer wieder in Kontakt zu dem von ihm produzierten Kot und Bluttröpfchen, die sich im Fell des Wirts ansammeln und meist bereits mit bloßem Auge zu erkennen sind.

Die Flöhe „bekleben“ sich auf diese Weise selbst mit Kot, so daß eine generelle Verunreinigung des Flohkörpers mit bei der Blutmahlzeit aufgenommenen Viren ständig gegeben ist (Abbildung 30).



Abbildung 30: Kontamination des Flohkörpers mit Blut und Kot (und den darin möglicherweise enthaltenen Viren) bei der Blutmahlzeit auf einer Katze (Hahn 2000).

Je nach Viruslast des Blutes sind dann sicher auch Kleinstmengen ausreichend, um nach einem Wirtswechsel den neuen Wirt durch orale Aufnahme eines Flohs zu infizieren. Die generelle Gefahr, die so vom Floh als mechanischer Vektor durch das verschwenderische Saugen von Blut und Produzieren von Kot ausgeht, ist offensichtlich. Dadurch sind die Flöhe insgesamt sehr viel länger infektiös, als es anhand des Virustiters im Floh selbst zu erwarten wäre.

Es zeigt sich also, daß auch dem Floh anhaftende, mit Viren verseuchte Verunreinigungen über Tage an seinem Körper infektiös bleiben können.

Diese Erkenntnisse lassen nur bedingt Aussagen zu der klinischen Relevanz zu. In einem weiteren Versuchsteil sollte daher überprüft werden, ob der Katzenfloh auch *in vivo* Viren übertragen und im Wirtstier eine meßbare Reaktion wie Antikörperproduktion oder eine Virämie auslösen kann. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 8 Übertragungsversuche durchgeführt, bei denen SPF-Katzenwelpen mit FCV-infizierten Flöhen in Kontakt gebracht und so ein Flohbefall ausgelöst wurde. Untersucht wurden innerhalb eines Zeitraums von 21 Tagen eine mögliche Antikörperbildung, also die erfolgreiche Übertragung und Freisetzung des Virus in das Wirtstier und Virusproduktion. Letztere sollte nicht nur die bloße Übertragung von Viren, sondern zusätzlich eine erfolgreiche Infektion mit Virusvermehrung belegen.

Die Übertragung des FCV durch den Katzenfloh war in einem (Katze L009) von acht Fällen nachweisbar (Tabelle 11). Bereits nach 1 Woche lag der Antikörpertiter bei dieser Katze bei 1:20 und stieg bis zu Tag 21 auf 1:160 an. Der Titer lag dann ab Tag 14 zwar deutlich unter der Positivkontrolle (Katze L016), jedoch wurde Katze L009 auch nur mit einem Bruchteil der Virusmenge im Vergleich zu Positivkontrolle infiziert. Wie hoch die Infektionsdosis (also die auf die Katze übertragene Virusmenge) war, kann jedoch nicht beantwortet werden.

Die üblicherweise nach einer FCV-Infektion erreichten Antikörpertiter liegen an Tag 7 post infectionem zwischen 1:4 und 1:64 und steigen dann bei allen Katzen an, bis sie Werte an Tag 34 zwischen 1:16 und 1:190 erreichen (Kahn und Gillespie 1971). Anderen Untersuchungen zufolge konnte innerhalb von 10 bis 17 Tagen Antikörpertiter von 1:40 festgestellt werden, der in den nächsten Wochen auf Werte von 1:160 bis 1:1280 anstieg (Flagstad 1973). Damit liegt der in dieser Arbeit durch den Flohstich erreichte Antikörpertiter mit Werten von 1:20 nach 7 Tagen und 1:160 nach Tag 21 durchaus im zu erwartenden Rahmen.

Die Flöhe, mit denen die Katze infiziert wurde, enthielten 10^4 Viren pro 10 Flöhe. Bei einem Befall mit 50 Flöhen waren zumindest kurzzeitig 5×10^4 Viren innerhalb der Flöhe als potentielle Infektionsdosis vorhanden. Darüber aber, wieviele dieser Viren dann aber mit dem Kot ausgeschieden wurden und durch das Drahtgitter fielen, verstoffwechselt oder letztlich durch den Flohstich übertragen wurden, kann keine Aussage getroffen werden. Auf Grundlage der *in vitro* Versuche kann aber mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß es sich nur um einen Bruchteil davon gehandelt haben wird.

Es mag innerhalb dieses Versuches beanstandet werden, daß nicht die Flöhe selbst bei Katze L009 das FCV in die Stichwunde übertragen haben, sondern die Katze beim Putzen über den Flohkot oral infiziert wurde. Sicherlich wäre auch diese Möglichkeit durchaus denkbar. Das Drahtgitter unter dem Käfig der Katze sorgt zwar dafür, daß abfallender Flohkot überwiegend aus dem Käfig entfernt wird, kann dies jedoch nicht für der Katze anhaftende, klebrige Flohkotreste gewährleisten. Beim Putzen könnte sich Katze L009 also oral mit FC-Viren infiziert haben, die noch nachträglich (also nach Fütterung der Flöhe mit FCV-Blut) ausgeschieden wurden, und in Form von Kotresten im Fell verteilt waren. So wäre also keineswegs eine Übertragung durch den Flohstich nachgewiesen worden, sondern lediglich erneut eine Infektionsmöglichkeit mit Flohkot.

Jedoch haben sich neben Katze L009 auch alle anderen Katzen der Versuchsreihe selbst geputzt. Da, wie unter 3.7.2 zu sehen, die orale Infektion mit Flohkot äußerst effektiv bzw. zu 100 % erfolgreich ist, wäre dann aber bei einer nicht durch den Stich verursachten Übertragung innerhalb der Versuche unter 3.7.1 zu erwarten gewesen, daß sich mehr als nur 1 Katze ebenfalls am Flohkot durch Putzen infiziert hätte. Es ist sicherlich nicht auszuschließen, daß sich Katze L009 oral infiziert hat.

Dies hätte aber unter Berücksichtigung der dargestellten Effektivität dieses Übertragungswegs bei mehreren Katzen zu einer Infektion führen müssen und ist auch in Anbetracht der bereits demonstrierten *in vitro* Übertragung des FCV durch den Flohstich eher nicht als wahrscheinlich anzusehen. Letzte Zweifel darüber können jedoch anhand der in dieser Arbeit gesammelten Daten nicht ausgeräumt werden.

Zu klären wäre ebenfalls die Frage, ob die Übertragung durch den Stich (sofern eine orale ausgeschlossen werden kann) aktiv durch eine Injektion von kontaminiertem Wirtsblut in die Stichwunde oder passiv durch mit FCV kontaminierte Mundwerkzeuge erfolgt ist. Eine mögliche Übertragung von Viren durch kontaminierte Mundwerkzeuge ist bereits beschrieben worden, so unter anderem für 4 verschiedene *Anopheles*-Arten, *Stomoxys calcitrans* und *Haematobia irritans* als Vektor des bovinen Leukosevirus (Buxton et al. 1982; Buxton et al. 1985). Das Equine Infektiöse Anämie Virus (EIAV) kann 1 Stunde auf den Mundwerkzeugen von *Aedes* nachgewiesen werden. Bei Übertragungsversuchen mit dem Lumpy-skin-disease Virus (LSDV) konnte mit *Aedes* hingegen keine mechanische Übertragung festgestellt werden (Chihota et al. 2003).

Die Übertragung von Viren durch Insekten hängt somit generell vom Virus bzw. dessen Stabilität wie auch vom Vektor selbst ab. Generell können sich aber zahlreiche blutsaugenden Insekten auf einem virämischen Wirt die Mundwerkzeuge oder auch äußerlich den Körper mit Viren kontaminieren und so zu einer mechanischen Verbreitung von Viren führen (Carn 1996).

Die *in vivo* Versuchsreihe dieser Arbeit bestätigt die Ergebnisse der *in vitro* Versuche. Der Katzenfloh hat innerhalb beider Versuchsreihen das FCV übertragen können. Dabei ist infektiöses FCV übertragen worden, da sich das Virus in der Katze L009 vermehrt hat (Tabelle 12). Auch 19 Tage *post infectionem* konnten infektiöse Viren aus dem Mund- und Rachenraum isoliert werden.

Daß die Rachentupfer nicht an allen Tagen positiv auf infektiöses FCV getestet werden konnten, liegt höchstwahrscheinlich daran, daß infizierte Katzen das FCV nicht immer kontinuierlich ausscheiden (Gillespie und Scott 1973). Es kann zwischen Dauer-, Periodisch- und Nichtausscheidern differenziert werden (Coyne et al. 2006). Möglicherweise gehörte Katze L009 zu den periodisch ausscheidenden Katzen.

Generall zeigt sich jedoch, daß das FCV bei der Übertragung durch den Floh seine Infektiosität nicht verloren hat und eine Virämie auslösen konnte. Ebenso bestätigen sich die Ergebnisse der *in vitro* Versuche, da eine Übertragung nicht in allen Fällen nachgewiesen werden konnte. Leider konnten die Versuche aufgrund des hohen Aufwandes und hoher Kosten nicht zahlreicher durchgeführt werden. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß ähnlich den *in vitro* Versuchen bei einer höheren Anzahl an Übertragungsversuchen auch weitere Katzen erfolgreich infiziert worden wären. Dabei ist zusätzlich zu bedenken, daß die Übertragung geringster Mengen an Viren in 19% der Fälle bei den *in vitro* Versuchen mittels einer hochsensitiven PCR nachgewiesen wurde. Daß eine Antikörper produzierende oder Infektion auslösende Übertragung von Viren *in vivo* bei Katzenwelpen diesen Wert unterschreiten würde, wäre daher nicht unbedingt verwunderlich.

Der Versuch zur *in vivo* Übertragung des FCV durch den Flohstich zeigt aber auch, daß in 7 Fällen keine Übertragung nachgewiesen werden konnte. Dies könnte an einer zu geringen Dosis liegen, die durch die Flöhe beim Saugvorgang in die Stichwunde abgegeben wurde. Ebenso könnte es an der Tatsache liegen, daß überhaupt keine Viren übertragen wurden. Ob nur einer oder auch beide Sachverhalte innerhalb der gesamten Versuchsreihe zutreffen, kann nicht bestimmt werden. Aufschluß darüber könnte eine Erhöhung des Virustiters in den Flöhen oder der Nachweis des FCV im Blut der Katzen anhand einer PCR geben, was jedoch innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. Möglicherweise wäre dann eine größere Übertragungsquote festzustellen.

4.2 Der Kot virusinfizierter Katzenflöhe als Infektionsquelle *in vitro* und *in vivo*

Die Larven der Flöhe ernähren sich überwiegend vom Kot der Adulten. Dies setzt voraus, daß zum einen jederzeit genügend Kot für die Larven vorhanden ist, und daß zum anderen dieser Kot genügend Nährstoffe enthält. Die Entwicklung der Flohlarve zum adulten Floh ist somit nur dann gewährleistet, wenn die Adulten sehr viel mehr Blut aufnehmen, als sie für ihren eigenen Stoffwechsel benötigen und es zusätzlich kaum verstoffwechseln. Dies bietet jedoch ebenso günstige Voraussetzungen dafür, daß ein bei der Blutmahlzeit aufgenommenes Virus unbeschadet die Passage durch den Verdauungstrakt des Flohs übersteht, und im ausgeschiedenen Kot infektiös ist. Durch die „verschwenderische“ Aufnahme von Blut produzieren Flöhe große Mengen an Kot (Abbildung 31).

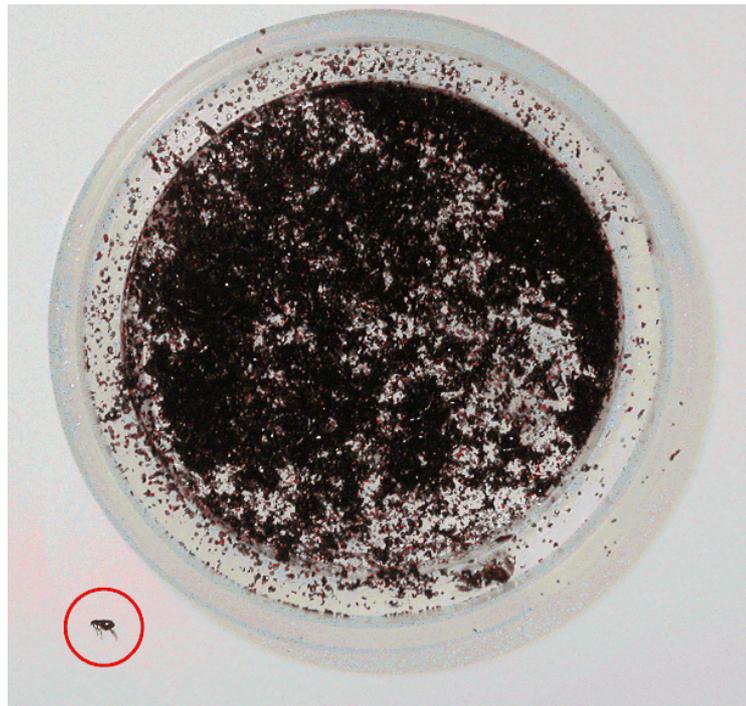


Abbildung 31: Flohkot einer Population von 50 Flöhen nach 24stündiger Blutmahlzeit innerhalb des „Artificial Dog“. Vor dem Flohcontainer liegt zum Größenvergleich ein einzelner Floh (roter Kreis).

In der Literatur ist beschrieben, daß ein Flohweibchen ungefähr $13,6 \mu\text{l}$ Blut ($\pm 2,7 \mu\text{l}$) pro Tag konsumiert, was dem 15fachen des Körpergewichts entspricht (Dryden und Gaafar 1991). Bei dem unter 3.4 berechneten, durchschnittlichen „Fassungsvermögen“ eines Flohs von $0,68 \mu\text{l}$ Blut, entspräche dies dem 20fachen Volumen.

Insgesamt können 72 Weibchen ungefähr 1 ml Blut innerhalb von 24 Stunden aufnehmen (Dryden 1993). Bei jungen Kätzchen oder Hunden kann ein Massenbefall somit zu einer Anämie führen (Dryden und Gaafar 1991). Diese Daten belegen eindrucksvoll, daß Flöhe enorme Mengen an Blut konsumieren, von dem sie lediglich einen Bruchteil für den eigenen Stoffwechsel benötigen. Der Großteil an Blut wird sozusagen lediglich durch den Floh befördert, ohne dabei verstoffwechselt zu werden. Bereits 10 Minuten, nachdem ein Floh mit der Blutmahlzeit begonnen hat, werden Teile des aufgesogenen Blutes in Form spiralförmiger Kotstränge oder Blutropfen wieder ausgeschieden (Akin 1984). Bereits mit bloßem Auge ist zu erkennen, daß es sich dabei überwiegend um unverdautes Blut handelt (Abbildung 32).



Abbildung 32: Kot- bzw. Blutropfen am After des Katzenfloh kurz nach Beginn der Blutmahlzeit. (Krämer und Menke 2002)

Betrachtet man das Verhältnis von aufgenommenen und ausgeschiedenen Viren, so lassen sich nach 30 Stunden im Durchschnitt 82 % der bei einer Blutmahlzeit durch den Floh aufgenommenen Viren im Flohkot wiederfinden (Abbildung 18). Lediglich 18 % der Viren sind zerstört bzw. verstoffwechselt worden.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieses Verhältnis auch für andere Partikel und Stoffe im Flohkot gültig ist. Vergleicht man nämlich vom Floh aufgenommenes Wirtsblut mit dem ausgeschiedenen Flohkot hinsichtlich der Proteinzusammensetzung, so ergibt sich lediglich eine geringe Abweichung, was auf eine sehr begrenzte Verstoffwechslung von Blut durch den Floh schließen läßt (Silverman und Appel 1994). Diese Ergebnisse konnten somit innerhalb dieser Arbeit anhand von Viren bestätigt werden. Viren und andere Pathogene sollten also größtenteils unbeschadet durch den Flohkot in der näheren Umgebung verteilt werden.

Im Flohkot sind FeLV und FCV nach 14 Tagen bei Raumtemperatur noch zu über 50% des Ausgangstiters nachweisbar, bei 4°C über 65 % für das FeLV und 75 % für das FCV (Abbildung 12 und 15). Dies liegt an den im Vergleich zum Floh niedrigen Abbauraten der Viren im Flohkot. Wenn man die Abnahmegeschwindigkeiten des Virustiters im Flohkot betrachtet, so ergeben sich konstantere Werte im Vergleich zur Abnahmegeschwindigkeit im Floh. Bei 4°C sind Titerabnahmen von ungefähr 2-3 % pro Tag zu beobachten, die sich über einen Zeitraum von 14 Tagen ungefähr konstant halten (Abbildung 17). Bei Raumtemperatur werden die meisten Viren innerhalb der ersten 8 Tage mit 5-8 % pro Tag abgebaut, was sich dann auf unter 4 % pro Tag reduziert.

Die Viren bleiben also im Flohkot sehr lange nachweisbar. Somit wird die Umgebung einer Flohpopulation über einen ebenso langen Zeitraum mit den gleichen Pathogenen kontaminiert, die sich auch im Blutkreislauf der entsprechenden Wirte befinden.

Für den Erhalt der Infektiosität eines Virus dürfen spezielle Hüllproteine, mit denen an die Zielzelle gebunden wird, bei der Passage durch den Floh nicht zerstört werden. Ob diese Epitope nach Aufnahme und Ausscheidung durch den Floh intakt bleiben, wurde anhand des Kots FCV-infizierter Flöhe untersucht.

Dazu wurden wie unter 3.5.2 beschrieben, 2000 Flöhe mit FCV-infiziertem Blut gefüttert und der angefallene Kot nach 24 Stunden abgesammelt. Eine Hälfte des Kots wurde anschließend bei Raumtemperatur, die andere bei 4°C gelagert. Das FCV ist nach Ausscheidung im bei Raumtemperatur gelagerten Flohkot 8 Tage lang infektiös und damit ebenso lange wie an den FCV-infizierten Flöhen selbst (Abbildung 23). Bei einer Herabsetzung der Raumtemperatur auf 4°C wird dieser Zeitraum um einen Tag verlängert, so daß der Flohkot dann für ganze 9 Tage infektiös bleibt. Rechnet man die 24 Stunden Fütterungszeit hinzu, ergeben sich Werte von 9-10 Tagen Infektiosität für das FCV im Flohkot. Diese Werte entsprechen damit dem in der Literatur angegebenen generellen Zeitraum, nach dem das FCV im Freien bis zu 10 Tage infektiös bleiben kann (Povey und Johnson 1970). Eine Verkürzung dieser Zeitspanne im Flohkot findet also nicht statt, das FCV bewahrt also im Flohkot seine Infektiosität ebenso lange, wie unter natürlichen Bedingungen.

Die Ergebnisse belegen die enorme Infektionsgefahr, die vom Flohkot ausgeht. Die Passage durch den Floh und die Ausscheidung mit dem Flohkot hat keinen Einfluß auf die Infektiosität des FCV. So kann es im Flohkot den Zeitraum über infektiös bleiben, der seiner natürlichen Stabilität entspricht. Da Flohkot selbst je nach Luftfeuchte eine leicht bis stark klebrige Konsistenz hat, kann er besonders effizient an anderen Tieren anhaften und von ihnen wiederum passiv verschleppt werden bzw. durch Ablecken oder Putzen auf oralem Weg zu einer Infektion führen.

Dabei sind die von den Flöhen produzierten Kotstücke von unterschiedlichster Größe. Die von Flöhen ausgeschiedenen Kotklumpen sind einerseits klein genug, um im Fell und auf der Haut des Wirts als „feiner Staub“ zu verbleiben, andererseits aber groß genug, um gelegentlich aus dem Fell heraus zu Boden zu fallen und als „klebrige Infektionsquelle“ zu wirken (Abbildung 33).



Abbildung 33: Die unterschiedlichen Größen 6 verschiedener Kotausscheidungen einer Flohpopulation von 20 Tieren nach Entfernen der Blutquelle. Im Vordergrund ist zum Größenvergleich ein Katzenfloh zu sehen.

Unter Berücksichtigung extrem stabiler Viren, wie z.B. Parvoviren, die über Jahre infektiös bleiben können, würde durch Flohkot die gesamte Umgebung eines Wirtstieres über einen langen Zeitraum kontaminiert, obwohl der eigentliche Flohbefall längst behandelt und beseitigt wurde.

Auf diese Weise könnte der Flohkot sogar eine weitaus bessere Verbreitungsmöglichkeit für Viren darstellen, als es durch Flüssigkeiten wie Blut oder Speichel der Fall wäre.

Ähnliches wurde auch bereits in anderen Studien diskutiert. So konnte gezeigt werden, daß selbst Rickettsien länger im Flohkot vital bleiben, als sie dies im Hühner-Dottersack tun (Rickard 1951). Der Erreger *Rickettsia typhi* (Auslöser des murinen Typhus) war in dieser Studie im Flohkot zu 100 % nach 48 Stunden, und zu immerhin 20 % nach 72 Stunden bei Raumtemperatur infektiös.

Ebenso ist vom Rickettsium *Bartonella henselae* bekannt, daß es im Flohkot mehr als drei Tage überleben kann und so möglicherweise neben dem bekannten Übertragungsweg durch Einkratzen auch der Kot als Infektionsquelle für den Menschen gefährlich ist (Finkelstein et al. 2002). *Rickettsia prowazekii* (Auslöser des Fleckfiebers) überlebt 1,5 Jahre im Flohkot, sofern der Kot in einer KCl-Lösung aufbewahrt wird, um eine Austrocknung zu verhindern. *Rickettsia typhi* bleibt bei gleicher Behandlung 4,5 Jahre infektiös (Rickard 1951). Aus dem Bereich der Viren ergaben Versuche mit dem Friend Leukemia Virus (FLV), daß es in den Fäzes infizierter Flöhe nachgewiesen werden kann, was bei FLV-infizierten *Stomoxys calcitrans* nicht gelang (Rehacek et al. 1973). Auch das FSME-Virus, ein ss(+)RNA-Virus, das die Frühsommer-Meningo-Enzephalitis auslöst und normalerweise durch Zecken übertragen wird, kann für 24 Stunden im Flohkot aktiv bleiben (Smetana 1965).

Letztlich muß aber auch für Viren im Flohkot der Nachweis erbracht werden, ob tatsächlich *in vivo* Infektionen ausgelöst werden. Nach den vorliegenden Erkenntnissen ist dies zwar äußerst wahrscheinlich, jedoch wäre es durchaus denkbar, daß zwar die Epitope der Viren intakt bleiben, aber bestimmte Substanzen im Flohkot hemmende Wirkung auf die Infektion haben und die Bindung der Viren an die Zielzelle vermindern oder unterbinden.

Zur Überprüfung der Infektiosität von FCV-infiziertem Flohkot *in vivo* wurden wie unter 3.7.2 beschrieben, 3 SPF-Katzenwelpen mit einer Flohkot-PBS Suspension oral und nasal infiziert. Bei einer Katze (L039) wurde die Infektion mit derselben Dosis wiederholt. Bei allen 3 Versuchskatzen konnte nach 14 Tagen die Produktion von FCV-Antikörpern nachgewiesen werden (Tabelle 14).

Dabei war der Titer der zweimal infizierten Katze mit 1:128 ungefähr doppelt so hoch, wie bei den einmal infizierten Katzen (1:64 bzw. 1:32). Nach 21 Tagen war der Titer von Katze L039 ähnlich dem der einmal infizierten. Die zweimalige Infektion führte also lediglich zu einem schnelleren Anstieg, letztlich aber nicht zu einem generell höheren Antikörpertiter. Der schnellere Anstieg des Antikörpertiters kann aber auch durch individuelle und versuchsunabhängige Unterschiede bei der Reaktion des Immunsystems der jeweiligen Katze zustande kommen. Im Vergleich zur Positivkontrolle, die mit gleicher Dosis infiziert wurde, ließen die mit der Kotsuspension infizierten Katzen jedoch einen späteren Anstieg (nach 14 statt nach 7 Tagen) und generell niedrigeren Titer nach 21 Tagen erkennen. Ob dies eine Folge von Stoffen im Flohkot ist, die möglicherweise die Infektion beeinflussen, kann nicht beantwortet werden. Wahrscheinlicher scheint eine unvollständige Lösung des Flohkots und damit ein niedrigerer Virustiter der resultierenden Kotsuspension als ursprünglich berechnet.

Neben der bloßen Aufnahme von Viren in den Blutkreislauf der Katze wurde jedoch ebenso eine Virämie bei allen Katzen nachgewiesen. Aus allen Rachentupfern konnten infektiöse Viren isoliert werden (Tabelle 15). Das FCV hat also seine infektiösen Eigenschaften bei der Passage durch den Floh und Ausscheidung mit dem Kot behalten, konnte die Katzen infizieren und sich entsprechend vermehren. Flohkot stellt eine kaum verstoffwechselte Form von Wirtsblut dar und enthält keine Stoffwechselprodukte, die Viren oder Bakterien in ihrer Pathogenität negativ beeinflussen. So sind Pathogene im Flohkot als eine gefährliche Infektionsquelle für Mensch und Tier zu betrachten.

4.3 Die Versuche mit dem Katzenfloh im Hinblick auf Flöhe im Allgemeinen

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Katzenfloh als Studienobjekt ausgewählt, da er weltweit zu den häufigsten Ektoparasiten gehört (Rust und Dryden 1997) und dabei 70 % aller Flohinfestationen bei Hund, Katze und Mensch ausmacht (Dryden 1993). In Deutschland zählt er zu den auf Hunden und Katzen am meisten verbreitetste Flohart, gefolgt von Hundefloh, Igel floh und Menschenfloh (Liebisch und Liebisch 1999; Visser et al. 2001; Beck et al. 2006). Ebenso erwähnenswert ist seine äußerst geringe Wirtsspezifität im Vergleich zu anderen Floharten. In Nordamerika z.B. ist der Katzenfloh auf Kojoten, Füchsen, Rindern, Pferden, Schafen, Frettchen, Ziegen, Stinktieren, Waschbären, Beutelratten, Kaninchen und sogar Geflügel zu finden (Dryden 1995). Insgesamt sind so für den Katzenfloh bisher 50 verschiedene Wirtsspezies beschrieben worden.

Lange Zeit wurde dabei angenommen, daß die Übertragung bestimmter Pathogene auch an bestimmte Floharten gebunden ist. Mittlerweile hat sich aber gezeigt, daß die Aussagen über als Vektor geeignete Floharten auch auf viele andere Floharten übertragbar sind. Ursprünglich wurde z.B. angenommen, daß lediglich der Rattenfloh Überträger des Bakteriums *Rickettsia typhi* und damit des murinen Typhus ist. Inzwischen konnte jedoch nachgewiesen werden, daß neben dem Rattenfloh auch der in dieser Arbeit behandelte Katzenfloh *C. felis* diese Rickettsienart überträgt (Azad 1990; Dryden und Broce 2002). Gleiches gilt für das Pestbakterium, welches auch durch den Menschenfloh *Pulex irritans* und den Katzenfloh übertragen werden kann.

Auch konnte gezeigt werden, daß sich Pathogene, von denen man annahm, daß sie auf andere Arthropodenarten als Vektor beschränkt sind, auch durch Flöhe übertragen lassen. Als ein solches Beispiel sei das durch *Rickettsia conorii* verursachte Zeckenbissfieber genannt, daß eben nicht nur durch Zecken, sondern gelegentlich auch vom Floh übertragen werden kann (Bernabeu-Wittel und Segura-Porta 2005).

Es kann daher angenommen werden, daß die Ergebnisse dieser Arbeit zum Vektorpotential des Katzenflohs durchaus auf andere Floharten übertragbar sind und dass damit die „Beschränkung“ innerhalb dieser Arbeit auf den Katzenfloh an Bedeutung verliert.

4.4 Ausblick und Bedeutung

Das in dieser Arbeit demonstrierte Potential des Katzenflohs, pathogene Erreger in der Umgebung durch Flohkot zu verteilen oder direkt durch den Stich zu übertragen, ist nicht nur in Bezug auf Haus- und Wildtiere relevant. Wie bereits ausgeführt, ist der Katzenfloh nicht wirtsspezifisch, sondern auf zahlreichen Tierarten zu finden. Nicht selten befällt er auch den Menschen (Scott et al. 2001). Der Befall eines Haustiers mit Flöhen führt daher auch für den Menschen zum Kontakt mit den Parasiten und ihren Fäzes. Dabei ermöglichen Flohstich oder Flohkot, daß Viren im Blut eines Haus- oder Nutztiers in die Blutbahn des Menschen gelangen. Er ist somit eine Art „universaler Vektor“, der Pathogene innerhalb und zwischen zahlreichen Wirtstierpopulationen übertragen kann.

Erwähnenswert ist dabei die Fähigkeit einiger Viren zur genetischen Rekombination, die es den Erregern möglich macht, die Speziesbarrieren zu durchbrechen und damit für eine andere als die ursprüngliche Spezies pathogen zu werden. Obwohl die benötigten molekulargenetischen Veränderungen im Genom eines Virus insgesamt betrachtet sehr selten vorkommen, besteht zumindest die theoretische Gefahr der Entstehung neuer, auch für den Menschen gefährlicher Erreger, die aus Rekombinationsereignissen hervorgehen. Als Beispiel solcher Zoonosen sei das Human Immundeficiency Virus (HIV) genannt, von dem heute als gesichert gilt, dass es als Zoonose durch die Übertragung des Simian Immundeficiency Virus (SIV) von nichtmenschlichen Primaten in die menschliche Population eingeführt wurde (Hahn et al. 2000).

Insgesamt betrachtet ist der Katzenfloh als viraler Vektor bisher zu Unrecht weitgehend unbeachtet geblieben. Da die Funktion als mechanischer Vektor innerhalb dieser Arbeit eindrucksvoll belegt, die Übertragung durch den Flohstich (bzw. Regurgitation) aber nicht vollends geklärt werden konnte, sollten weitere Untersuchungen insbesondere diesen Sachverhalt näher untersuchen.

Zusätzlich wäre interessant, ob die lange Verweildauer des FeLV oder anderer Retroviren im Floh bei z.B. 4°C zu einer Integration von retroviralen Sequenzen ins Flohgenom führen, oder gar einen dauerhaft infizierten Floh erzeugen kann. Erste Versuche in dieser Richtung wurden bereits durchgeführt, und konnten die Existenz *gypsy*-ähnlicher Sequenzen im Flohgenom nachweisen (Dahl 2002).

5. Zusammenfassung

Flöhe sind als blutsaugende Ektoparasiten Überträger zahlreicher Pathogene. Die Möglichkeit zur Übertragung von Viren ist von der Stabilität bzw. Infektiosität des Virus im Floh abhängig. Da bisher keine detaillierten Daten zu einem solchen Sachverhalt vorliegen, wurde innerhalb dieser Arbeit das Potential des Katzenfloh *Ctenocephalides felis* als viraler Vektor *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dazu wurden die Flöhe mit Hilfe eines künstlichen Fütterungssystems mit dem feline Leukosevirus (FeLV) oder dem feline Calicivirus (FCV) infiziert. Der Virustiter in Floh oder Flohkot wurde quantitativ mittels Realtime-PCR bestimmt. Der qualitative Nachweis erfolgte durch eine hochsensitive nested-PCR. Beide Virustypen waren nach Entfernen der Blut- bzw. Nahrungsquelle für 30 Stunden im Floh bei Raumtemperatur nachweisbar. Eine Reduktion des Stoffwechsels der Flöhe durch Herabsetzen der Umgebungstemperatur auf 4°C verlängerte diesen Zeitraum auf über 7 Tage. Eine Übertragung beider Viren durch den Flohstich *in vitro* von einer infizierten auf eine uninfizierte Blutquelle wurde in 4 von 21 Versuchen nachgewiesen. Innerhalb einer *in vivo* Versuchsreihe mit Katzenwelpen war die Übertragung des FCV durch den Floh in einem von acht Fällen anhand von Antikörperproduktion und Virämie in der Empfängerkatze nachweisbar. Besonders aber der von Katzenflöhen massenhaft ausgeschiedene Kot erweist sich als sehr effiziente Infektionsquelle. Mehr als 80 % der bei einer Blutmahlzeit aufgenommenen Viren werden vom Floh mit dem Kot wieder ausgeschieden. Die Passage des FCV durch den Verdauungstrakt und die Ausscheidung mit dem Kot hat dabei keinen wesentlichen Einfluß auf die Infektiosität des Virus. Im Flohkot bleibt das FCV 8 bis 9 Tage lang infektiös. FCV-infizierte Flöhe sind aufgrund der an ihnen haftenden Kotspuren ebenso für mindestens 8 Tage infektiös. *In vivo* Versuche mit Katzenwelpen bestätigen die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse. Bei 4 Katzen und damit in 100 % der durchgeführten Versuche wurde durch oronasale Applikation von Kot FCV-infizierter Flöhe eine Infektion mit anschließender Virämie ausgelöst. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß der Katzenfloh ein effizienter Vektor ist, der infektiöse Viren durch den Flohstich, aber auch über ausgeschiedenen Kot oder durch am Flohkörper anhaftende Kotspuren übertragen kann. Ein Flohbefall von Mensch und Tier stellt damit auch eine erhebliche Infektionsgefahr dar.

6. Abstract

Fleas as blood sucking parasites are important vectors for various pathogens. The possibility of virus transmission depends on the viruses stability and infectiousness in the flea. Because no detailed data on such a case exist, the vector potential of the cat flea *Ctenocephalides felis* was investigated in this study *in vitro* and *in vivo*. For this purpose, fleas were infected via an artificial feeding system with the feline leukemia virus (FeLV) or the feline calicivirus (FCV). The virus titer in the flea or the flea faeces was measured by quantitative realtime PCR. Qualitative detection of the virus was done by a high sensitive nested PCR. After removal of the blood source, both viruses were detectable in the fleas for up to 30 hours at room temperature. A reduction of the metabolism of the fleas by decreasing the environmental temperature to 4°C extended this time-frame up to 7 days. Both viruses were transmitted by the fleabite *in vitro* from an infected blood source to an uninfected in 4 of 21 experiments. In *in vivo* experiments with kittens, the transmission of the FCV by the fleabite was demonstrated in 1 of 8 cases by antibody production and viremia in the receiving cat. However, especially the large quantities of excreted faeces by the cat fleas is a very efficient origin of infection. More than 80 % of the viruses that are ingested within a blood meal are excreted with the faeces. The passage of the FCV through the digestive tract and the excretion within the faeces has no significant effect on the infectiousness of the virus. The FCV remains infective in the faeces for 8 to 9 days. FCV infected fleas are also infective at least 8 days due to faeces that stick at the fleas body. *In vivo* experiments confirmed the *in vitro* results. 4 cats (100 % of the experiments) were infected through oronasal application of faeces from FCV-infected fleas following subsequent viremia. The results of this study shows, that the cat flea is an efficient vector for the transmission of infective viruses through the fleabite and through excreted faeces or traces of faeces stuck at the fleas body. Flea infestation of man and animal is therefore a considerable risk for infection.

7. Abkürzungen

A	Adenin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>
CrFK	Crandall-Reese feline kidney
C _t	Threshold cycle
d	days, Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco modified eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid 5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin 5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötale Kälberserum
FCV	Felines Calicivirus
FeLV	Felines Leukosevirus
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
G	Guanin
GKID	Gesamtkulturinfektiöse Dosis
h	Stunde
IE	Internationale Einheiten
kb	Kilobasenpaare
LTR	Long Terminal Repeats
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolarität
mM	Millimolarität

mt	mitochondrial
M	Molarität
NEA	Nicht essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
PBS	Posphat/NaCl Puffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Poly A	Polyadenylsäure
qPCR	Quantifizierende PCR
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SPF	Pathogen-frei (specific pathogen free)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
T _m	Schmelztemperatur (melting temperature)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan
U	Uracil / Einheit
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

8. Literatur

- Aiello SE, Mays A. *The Merck Veterinary Manual* (8th edition) 1998; 1775-1779.
- Akin DE. Relationship between Feeding and Reproduction in the Cat Flea *Ctenocephalides felis*. *MS Thesis* 1984; University of Florida, Gainesville, USA125.
- Azad AF. Epidemiology of murine typhus. *Annu Rev Entomol* 1990; 35:553-569.
- Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:179-186.
- Bacot AW, Martin CJ. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. *J Hyg* 13 (*Plague suppl.III*) 1914; 423-439.
- Baker KP, O'Flanagan J. Hypersensitivity of dog skin to fleas--a clinical report. *J Small Anim Pract* 1975; 16:317-327.
- Baker N. The touch-and-go relationship of a dog and its fleas. *Vet Med* 80 (Suppl) 1985; 6-7
- Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Biotechnology* 1992; 24:3-5.
- Beck W, Boch K, Mackensen H, Wiegand B, Pfister K. Qualitative and quantitative observations on the flea population dynamics of dogs and cats in several areas of Germany. *Vet Parasitol* 2006; 137:130-136.
- Benveniste RE, Sherr CJ, Todaro GJ. Evolution of type C viral genes: origin of feline leukemia virus. *Science* 1975; 190:886-888.
- Benveniste RE, Todaro GJ. Segregation of RD-114 AND FeL-V-related sequences in crosses between domestic cat and leopard cat. *Nature* 1975; 257:506-508.
- Bernabeu-Wittel M, Segura-Porta F. [Rickettsioses]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23: 163-172.
- Blagburn BL, Vaughan JL, Lindsay DS, Tebbitt GL. Efficacy dosage titration of lufenuron against developmental stages of fleas (*Ctenocephalides felis felis*) in cats. *Am J Vet Res* 1994; 55:98-101.
- Borror DJ, DeLong DW, Triplehorn CA. Order Siphonaptera. *An Introduction to the Study of Insects*, 5. edn. 1981: 620-628.

- Burki F. Picornaviruses of cats. *Arch Gesamte Virusforsch* 1965; 15:690-696.
- Bush MP, Devi BG, Soe LH, Perbal B, Baluda MA, Roy-Burman P. Characterization of the expression of cellular retrovirus genes and oncogenes in feline cells. *Hematol Oncol* 1983; 61-75
- Buxton BA, Schultz RD, Collins WE. Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by mosquitoes. *Am J Vet Res* 1982; 43:1458-1459.
- Buxton BA, Hinkle NC, Schultz RD. Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *Am J Vet Res* 1985; 46:123-126.
- Cadiergues MC, Santamarta D, Mallet X, Franc M. First blood meal of *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) on dogs: time to initiation of feeding and duration. *J Parasitol* 2001; 87:214-215.
- Carn VM. The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. *Br Vet J* 1996; 152:377-393.
- Chihota CM, Rennie LF, Kitching RP, Mellor PS. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Med Vet Entomol* 2003; 17:294-300.
- Clarke IN, Lambden PR. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 2):291-301.
- Coyne KP, Dawson S, Radford AD, Cripps PJ, Porter CJ, McCracken CM. Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats. *Vet Microbiol* 2006; 118:12-25.
- Crandell RA, Madin SH. Experimental studies on a new feline virus. *Am. J. Vet. Res.* 21 1960; 551 - 556
- Dahl A. Nachweis gypsy-ähnlicher Sequenzen im Genom des Katzenflohs, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché 1835). Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf 2002.
- Deoras PJ, Prasad RS. Feeding mechanism of Indian fleas *X. cheopis* (Roths) and *X. astia* (Roths). *Indian J Med Res* 1967; 55:1041-1050.
- Donahue PR, Hoover EA, Beltz GA, Riedel N, Hirsch VM, Overbaugh J *et al.* Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. *J Virol* 1988; 62:722-731.

- Dryden MW. Evaluation of certain parameters in the bionomics of *Ctenocephalides felis felis* (Bouché 1835). *MS Thesis* 1988; Purdue University, West Lafayette.
- Dryden MW. Host association, on-host longevity and egg production of *Ctenocephalides felis felis*. *Vet Parasitol* 1989; 34:117-122.
- Dryden MW, Gaafar SM. Blood consumption by the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 1991; 28:394-400.
- Dryden MW, Reid B. Investigations of cat flea pupation, cocoon formation and the impact of pupae on a flea control program. *Proc Int Symp Ectoparas Pets* 1993; 27-29
- Dryden MW. Biology of Fleas of Dogs and Cats. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 15(4) 1993; 569-579.
- Dryden MW, Rust MK. The cat flea: biology, ecology and control. *Vet Parasitol* 1994; 52:1-19.
- Dryden MW, Smith V. Cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) cocoon formation and development of naked flea pupae. *J Med Entomol* 1994; 31:272-277.
- Dryden MW. Urban Wildlife as Reservoirs of Cat Fleas, *Ctenocephalides felis*. *Proc. AAVP Ann. Conf. Pittsburgh* 1995; 35-39.
- Dryden MW, Reid BL. Insecticide susceptibility of cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) pupae. *J Econ Entomol* 1996; 89:421-427.
- Dryden MW, Broce AB. Integrated Flea Control for the 21st Century. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 24(Suppl. 1) 2002; 36-39.
- Elbel RE. Comparative studies on the larvae of certain species of fleas (Siphonaptera). *J Parasitol* 1951; 37:119-128.
- Engelthaler DM, Hinnebusch BJ, Rittner CM, Gage KL. Quantitative competitive PCR as a technique for exploring flea-Yersinia pestis dynamics. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:552-560.
- Essex M, Cotter SM, Carpenter JL, Hardy WD, Jr., Hess P, Jarrett W *et al.* Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. II. Antibody titers in healthy cats from household and laboratory colony environments. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54:631-635.
- Fastier LB. A new feline virus isolated in tissue culture. *Am J Vet Res* 1957; 18:382-389.

- Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, Wedincamp J, Jr., Foil LD. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 2002; 39:915-919.
- Flagstad A. Experimental picornavirus infection in cats. *Acta Vet Scand* 1973; 14:501-510.
- Gaskell RM, Wardley RC. Feline viral respiratory disease: a review with particular reference to its epizootiology and control. *J Small Anim Pract* 1978; 19:1-16.
- Genchi C. Arthropoda as zoonoses and their implications. *Vet Parasitol* 1992; 44:21-33.
- Georgi JR. *Parasitology for veterinarians*, 5th edn. 1990; 200-203
- Gillespie JH, Scott FW. Feline viral infections. *Adv Vet Sci Comp Med* 1973; 17:163-200.
- Hahn J. Use Integrated Approach To Control Fleas. *Yard & Garden Line News* 2000; Vol. 2 (17). University of Minnesota Extension Service.
- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000; 287:607-614.
- Halliwell RE, Preston JF, Nesbitt JG. Aspects of the immunopathogenesis of flea allergy dermatitis in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1987; 17:483-494.
- Hardy WD, Jr., Hess PW, MacEwen EG, McClelland AJ, Zuckerman EE, Essex M *et al.* Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res* 1976; 36:582-588.
- Hardy WD Jr. The virology, immunology and epidemiology of the feline leukemia virus. *Feline leukemia virus*. The Netherlands: Elsevier, 1980: 33-79.
- Hardy WD Jr. The feline leukemia virus. *J Am Anim Assoc* 1981; 17:951-80.
- Hardy WD, Jr., Zuckerman EE. Development of the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199:1327-1335.
- Harrus S, Klement E, Aroch I, Stein T, Bark H, Lavy E *et al.* Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. *Vet Rec* 2002; 151:82-85.

- Herbert TP, Brierley I, Brown TD. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 5):1033-1040.
- Helps C, Harbour D. Detection of nucleotide polymorphisms in feline calicivirus isolates by reverse transcription PCR and a fluorescence resonance energy transfer probe. *J Virol Methods* 2003; 109:261-3.
- Hinaidy HK. [The biology of *Dipylidium caninum*. Part 2]. *Zentralbl Veterinarmed B* 1991; 38:329-336.
- Hink WF, Drought DC, Barnett S. Effect of an experimental systemic compound, CGA-184699, on life stages of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 1991; 28:424-427.
- Hinkle NC, Koehler PG, Patterson RS. Host grooming efficiency for regulation of cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) populations. *J Med Entomol* 1998; 35:266-269.
- Hofmann-Lehmann R, Huder JB, Gruber S, Boretti F, Sigrist B, Lutz H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J Gen Virol* 2001; 82:1589-96.
- Hoover EA, Kahn DE. Lesions produced by feline picornaviruses of different virulence in pathogen-free cats. *Vet Pathol* 1973; 10:307-322.
- Hoover EA, Rojko JL, Olsen RG. Host-virus interactions in progressive versus regressive feline leukemia virus infection in cats. *Viruses in Naturally Occuring Cancer*. Cold Spring Laboratory Press 1980; 635
- Hoover EA, Mullins JI. Feline leukemia virus infection and diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199:1287-1297.
- Jarrett WF, Crawford EM, Martin WB, Davie F. A virus-like particle associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 1964; 202:567-569.
- Jellison WL, Locker B, Bacon R. A synopsis of North American fleas, North of Mexico and notice of a supplementary index. *J Parasitol* 1953; 39:610-618.
- Joseph SA. Studies on the bionomics of *Ctenocephalides felis orientis* (Jordan 1925). *Cheiron* 1981; 10:275-280
- Kahn DE, Gillespie JH. Feline viruses: pathogenesis of picornavirus infection in the cat. *Am J Vet Res* 1971; 32:521-531.

- Karandikar KR, Munshi DM. Life history and bionomics of the cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché). *J Bombay Nat His Soc* 1950; 49:169-177
- Karpas A, Routledge JK. Feline herpes virus: isolations and experimental studies. *Zentralbl Veterinarmed B* 1968; 15:599-606.
- Keep KM. Flea allergy dermatitis. *New South Wales Vet Proc* 1983; 19:24-27
- Knowles JO, Dawson S, Gaskell RM, Gaskell CJ, Harvey CE. Neutralisation patterns among recent British and North American feline calicivirus isolates from different clinical origins. *Vet Rec* 1990; 127:125-127.
- Krämer F, Mencke N, 2001. Flea Biology and Control: The Biology of the Cat Flea. Control and Prevention with Imidacloprid in Small Animals. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kupferschmidt H. [Epidemiology of the plague. Changes in the concept in research of infection chains since the discovery of the plague pathogen in 1894]. *Gesnerus Suppl* 1993; 43:1-222.
- Lewis, R.E., 1993. Fleas (Siphonaptera). In: Medical Insects and Arachnids. Lane, R.P., Crosskey, R.W. (Eds.), London, Chapman & Hall 529-575.
- Liebisch A, Liebisch G. Flohbefall. *Handlexikon der Tierärztlichen Praxis*. Stuttgart 1999; 271-271j.
- Lutz H, Jarrett O. Detection of feline leukemia virus infection in saliva. *J Clin Microbiol* 1987; 25:827-831.
- Lutz H. Feline retroviruses: a brief review. *Vet Microbiol* 1990; 23:131-146.
- Lyons H. Notes on the cat flea (*Ctenocephalides felis* (Bouché)). *Psyche* 1915; 22:124-132
- Marx MB. Parasites, pets, and people. *Prim Care* 1991; 18:153-165.
- Mead-Briggs AR, Vaughan JA. The differential transmissibility of Myxoma virus strains of differing virulence grades by the rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale). *J Hyg* 1975; 75:237-247.
- Menier K, Beaucournu JC. Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* Stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. *J Med Entomol* 1998; 35:883-890.
- Metzger ME, Rust MK. Effect of temperature on cat flea (Siphonaptera:Pulicidae) development and overwintering. *J Med Entomol* 1997; 34:173-178.

- Minnaar WN, Krecek RC. Helminths in dogs belonging to people in a resource-limited urban community in Gauteng, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 2001; 68:111-117.
- Miyazawa T, Jarrett O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Arch Virol* 1997; 142:323-332.
- Miyazawa T. Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Front Biosci* 2002; 7:d504-d518.
- Muller GH, Kirk RW, Scott DW. Parasitic hypersensitivity: Flea allergy dermatitis. *Small animal dermatology*, 3rd edit. 1983; 432-440
- Neil JC, Onions DE. Feline leukaemia viruses: molecular biology and pathogenesis. *Anticancer Res* 1985; 5:49-63.
- Neill JD. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Virus Res* 1990; 17:145-160.
- Niman HL, Akhavi M, Gardner MB, Stephenson JR, Roy-Burman P. Differential expression of two distinct endogenous retrovirus genomes in developing tissues of the domestic cat. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64:587-594.
- Okabe H, Twiddy E, Gilden RV, Hatanaka M, Hoover EA, Olsen RG. FeLV-related sequences in DNA from a FeLV-free cat colony. *Virology* 1976; 69:798-801.
- Osbrink WLA, Rust MK. Fecundity and longevity of the adult cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 1984; 21:727-731
- Osbrink WLA, Rust MK. Cat flea (Siphonaptera: Pulicidae): Factors influencing hostfinding behaviour in the laboratory. *Ann Entomol Soc Am* 1985; 78:29-34
- Overbaugh J, Riedel N, Hoover EA, Mullins JI. Transduction of endogenous envelope genes by feline leukaemia virus in vitro. *Nature* 1988; 332:731-734.
- Pacitti AM, Jarrett O. Duration of the latent state in feline leukaemia virus infections. *Vet Rec* 1985; 117:472-474.
- Pacitti AM. Latent feline leukemia virus infection: a review. *J Small Animal Pract* 1987; 28: 1153-9.

- Pedersen NC, Laliberte L, Ekman S. A transient febrile limping syndrome of kittens caused by two different strains of calicivirus. *Feline Practice* 1983; 13:26-35
- Povey RC, Johnson RH. Observations on the epidemiology and control of viral respiratory disease in cats. *J Small Anim Pract* 1970; 11:485-494.
- Povey RC, Johnson RH. A survey of feline viral rhinotracheitis and feline picornavirus infection in Britain. *J Small Anim Pract* 1971; 12:233-247.
- Povey RC, Hale CJ. Experimental infections with feline caliciviruses (picornaviruses) in specific-pathogen-free kittens. *J Comp Pathol* 1974; 84:245-256.
- Prydie J. Viral diseases of cats. *Vet. Rec.* 1966; 79: 729 - 738
- Pullen SR, Meola RW. Survival and reproduction of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) fed human blood on an artificial membrane system. *J Med Entomol* 1995; 32:467-470
- Rehacek J, Fischer RG, Luecke DH. Friend leukemia virus (FLV) elimination in feces of flies and fleas. *Acta Virol* 1973; 17:167.
- Rigby MA, Rojko JL, Stewart MA, Kociba GJ, Cheney CM, Rezanka LJ *et al.* Partial dissociation of subgroup C phenotype and in vivo behaviour in feline leukaemia viruses with chimeric envelope genes. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 11):2839-2847.
- Rojko JL, Hoover EA, Mathes LE, Olsen RG, Schaller JP. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *J Natl Cancer Inst* 1979; 63:759-768.
- Rojko JL, Hoover EA, Quackenbush SL, Olsen RG. Reactivation of latent feline leukaemia virus infection. *Nature* 1982; 298:385-388.
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnieder T.
Veterinärmedizinische Parasitologie. 5th Aufl. 2000, Parey Verlag.
- Rothschild M. Recent advances in our knowledge of the order Siphonaptera. *Annu Rev Entomol* 1975; 20:241-259.
- Rust MK, Dryden MW. The biology, ecology, and management of the cat flea. *Annu Rev Entomol* 1997; 42:451-473.
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2nd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

- Sarma PS, Log T. Subgroup classification of feline leukemia and sarcoma viruses by viral interference and neutralization tests. *Virology* 1973; 54:160-169.
- Sarma PS, Log T, Jain D, Hill PR, Huebner RJ. Differential host range of viruses of feline leukemia-sarcoma complex. *Virology* 1975; 64:438-446.
- Scott DW, Miller WH JR., Griffin CE. *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology* 2001, Philadelphia, 6. Auflage.
- Silverman J, Rust MK, Reiersen DA. Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: *Pulicidae*). *J Med Entomol* 1981; 18:78-83.
- Silverman J, Rust MK. Extended longevity of the pre-emerged adult cat flea (Siphonaptera: *Pulicidae*) and factors stimulating emergence from the pupal cocoon. *Ann Entomol Soc Am* 1985; 78:763-768
- Silverman J, Appel AG. Adult cat flea (Siphonaptera: *Pulicidae*) excretion of host blood proteins in relation to larval nutrition. *J Med Entomol* 1994; 31:265-271.
- Smetana A. On the transmission of tick-borne encephalitis virus by fleas. *Acta Virol* 1965; 9:375-378.
- Spieker JO, Yuill TM. Herpesvirus sylvilagus in cottontail rabbits: attempted laboratory transmission by two insect species. *J Wildl Dis* 1977; 13:90-93.
- Stephenson JR, Khan AS, Sliski AH, Essex M. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: evidence for an immunologically crossreactive feline sarcoma virus-coded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5608-5612.
- Stewart MA, Warnock M, Wheeler A, Wilkie N, Mullins JI, Onions DE *et al.* Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J Virol* 1986; 58:825-834.
- Strenger A. Zur Ernährungsbiologie der Larve von *Ctenocephalides felis felis*. *B. Zool Jahrb Syst Bd* 1973; 100:64-80
- Temin H, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226:1211-3
- Urquhart GM, Armour J, Duncan J, Dunn AM, Jennings FW. Order Siphonaptera. *Veterinary parasitology* 1987; 171-175

Visser M, Rehbein S, Wiedemann C. Species of flea (siphonaptera) infesting pets and hedgehogs in Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001; 48:197-202.

Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, Mencke N. The feline leukemia virus (FeLV) and the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitol Res* 2003a; 90 Suppl 3:S132-S134.

Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, Mencke N. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitol Res* 2003b; 91:467-470.

Wade SE, Georgi JR. Survival and reproduction of artificially fed cat fleas, *Ctenocephalides felis* Bouche (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 1988; 25:186-190.

Wardley RC, Povey RC. The clinical disease and patterns of excretion associated with three different strains of feline caliciviruses. *Res Vet Sci* 1977; 23:7-14.

Williams DL, Issel CJ, Steelman CD, Adams WV, Jr., Benton CV. Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture. *Am J Vet Res* 1981; 42:1469-1473.

Willis AM. Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000; 30:971-986.

Yeruham I, Rosen S, Hadani A. Mortality in calves, lambs and kids caused by severe infestation with the cat flea *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1835) in Israel. *Vet Parasitol* 1989; 30:351-356.

9. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das motivierende Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jochen D´Haese danke ich für die vielen wertvollen und interessanten Anregungen, Gespräche und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Norbert Menke danke ich für die Bereitstellung der S3-Labore und die Beschaffung der SPF-Katzenwelpen für die *in vivo* Versuche.

Für die jederzeit schnelle und unkomplizierte Bereitstellung von Flöhen, Floheiern, Flohlarven und Rinderblut danke ich Herrn Jörg Egger von der Bayer AG.

Für die technische Assistenz und Unterstützung bei Problemen rund um den Laboralltag bedanke ich mich bei Martin Fey.

Für die wertvolle Anleitung beim Aufbau der Zellkulturen bedanke ich mich bei Susanne Walter.

Bei allen Angehörigen der Arbeitsgruppe Prof. Mehlhorn, Prof. D´Haese und Prof. Wunderlich bedanke ich mich für das außerordentlich angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima.

Meinen Eltern danke ich für ihre immer gewährte Hilfe und Unterstützung.

Danke auch an all die Anderen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, aber hier nicht persönlich erwähnt werden.

10. Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht unter:

Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, Mencke N. (2003)
Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). Parasitol.Res. 91:467-70.

Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, Mencke N. (2003)
The feline leukemia virus (FeLV) and the cat flea (*Ctenocephalides felis*). Parasitol.Res. 90 Suppl 3:132-34.

Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, Mencke N. (2005)
Experimental quantification of the feline leukaemia virus in the cat flea (*Ctenocephalides felis*) and its faeces. Parasitol.Res. 97 Suppl 1:102-06.

Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H. (2006)
The Cat Flea *Ctenocephalides felis* as a Vector of Feline Retro- and Caliciviruses. Entomologie heute 18:105-11.

Düsseldorf, den 11.12.2006

Michael Vobis