

Aus der Klinik für Fische und Reptilien
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Dr. Mansour El-Matbouli

Angefertigt am Institut für Infektionsmedizin des Friedrich Loeffler Institutes
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
(Dr. Sven M. Bergmann, Dr. Heike Schütze)

Identifizierung und Differenzierung ausgewählter Iridoviren

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

vorgelegt von
Stefanie Ohlemeyer
aus Minden

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. El-Matbouli
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Sutter

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Widmung

Für meine Eltern, die immer an mich glauben.

Inhaltsverzeichnis

<i>Widmung</i>	<i>i</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VII</i>
1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Einführung (Literaturübersicht)	3
2.1 Taxonomie der Ranaviren	3
2.2 Viruseigenschaften	4
2.2.1 Virusmorphologie	4
2.2.2 Genomorganisation und Replikationszyklus	6
2.2.3 Chemische, physikalische und biologische Eigenschaften	7
2.3 Vorkommen und Verbreitung	8
2.4 Untersuchte Virusisolate	9
2.4.1 Epizootisches Hämatopoetisches Nekrosevirus (EHNV)	9
2.4.2 European Sheatfish Virus (ESV)	9
2.4.3 European Catfish Virus (ECV)	9
2.4.4 Bohle Iridovirus (BIV)	10
2.4.5 Frog Virus 3 (FV3)	10
2.4.6 Pike-Perch Iridovirus (PPIV)	10
2.4.7 Shortfin Eel Virus (SERV)	10
2.4.8 Rana Esculenta Virus Isolat Italy 282/I02 (REV)	11
2.4.9 Guppy Virus 6 und Doctor Fish Virus (GV6 & DFV)	11
2.4.10 Largemouth Bass Virus (LMBV)	11
2.4.11 Rana Tigrina Ranavirus (RTRV)	12
2.5 Diagnostik	13
3 Material	14
3.1 Virusisolate	14
3.2 Zellen	15
3.3 Synthetische Oligonukleotide	15
4 Methoden	18

4.1	Zellkultur	18
4.2	Virusvermehrung	18
4.2.1	Virusidentifizierung	18
4.2.2	Virusvermehrung in der Zellkultur	19
4.2.3	Virusernte	19
4.2.4	Virustitration	19
4.3	Isolierung viraler DNA	20
4.3.1	Isolierung viraler DNA aus Zellkulturüberstand	20
4.3.2	Isolierung viraler DNA aus Organmaterial	20
4.3.3	Isolierung viraler DNA aus Organüberstand	21
4.3.4	Isolierung von Plasmid DNA	22
4.4	Southernblot Analyse	22
4.4.1	Fluorescein d-UTP Markierung von Oligonukleotiden	22
4.4.2	Transfer von DNA auf Nitrocellulose	23
4.4.3	Southernblot Hybridisierung	23
4.4.4	Nachweis spezifischer DNA Fragmente	23
4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
4.6	DNA Agarose-Gelelektrophorese	24
4.7	Elution von DNA aus Agarosegelen	24
4.8	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	25
4.9	Klonierung	25
4.9.1	Dephosphorylierung von DNA	25
4.9.2	Ligation	25
4.9.3	Plasmid-Transformation	26
4.10	DNA-Sequenzierung	26
4.11	Sequenzanalysen	27
4.12	Durchführung von Infektionsversuchen	28
4.12.1	Tierversuchsanzeige	28
4.12.2	Auswahl geeigneter Fische	28
4.12.3	Haltung und Fütterung	28
4.12.4	Infektionsbedingungen	29
4.12.5	Probennahme	29
4.12.6	Aufarbeitung der Fische	29
5	Ergebnisse	30
5.1	Virusvermehrung	30

5.2	Molekularbiologische Ergebnisse	34
5.2.1	Nachweis von Ranavirus-DNA mittels PCR	34
5.3	Sequenzanalyse des MCP-Gens von EHNV, BIV, ECV, ESV, FV3, PPIV, REV, SERV und RTRV	38
5.4	Identifizierung von Ranaviren mit der PCR MCP 2A und die Differenzierung nach Restriktionsendonukleaseverdau	40
5.4.1	Spaltmuster <i>BamH</i> I	42
5.4.2	Spaltmuster <i>Sal</i> I	43
5.4.3	Spaltmuster <i>Hae</i> II	44
5.4.4	Spaltmuster <i>Xho</i> I	45
5.5	Identifizierung des MCP-Gens des DFV und GV6	46
5.5.1	Amplifikation mit herkömmlichen Primern	46
5.5.2	Identifizierung des MCP-Gens des DFV nach Southernblot-Analyse und Shotgun-Klonierung des viralen Genoms	47
5.5.3	Identifizierung des MCP-Gens des GV6 nach Amplifikation mit spezifischen Primern	49
5.6	Identifizierung des MCP-Gens des LMBV	54
5.7	Sequenzanalyse des MCP-Gens der Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV	57
5.8	Phylogenetischer Vergleich der analysierten Ranaviren	58
5.8.1	Sequenzvergleich des MCP-Gens	58
5.8.2	Phylognese des Genus <i>Ranavirus</i>	69
5.9	Nachweis und Differenzierung aller Ranaviren mit der PAN-RANA-MCP PCR	77
5.10	Restriktionsanalyse der PAN-RANA-MCP PCR-Produkte	80
5.10.1	Spaltmuster <i>BamH</i> I	82
5.10.2	Spaltmuster <i>Sal</i> I	83
5.10.3	Spaltmuster <i>Pst</i> I	84
5.10.4	Spaltmuster <i>Afl</i> III	85
5.10.5	PAN-RANA-MCP Sequenzanalyse	86
5.11	Stabilität des MCP-Gens	87
5.12	Ergebnisse der Infektionsversuche	89
5.12.1	DNA-Extraktionskontrollen	89
5.12.2	Infektion von Flussbarschen (<i>Perca fluviatilis</i>) mit Ranaviren	100
5.12.3	Infektion von Welsen (<i>Silurus glanis</i>) mit Ranaviren	104
5.12.4	Zusammenfassung Infektionsversuche	116
5.12.5	Stabilität des MCP-Gens nach Infektion der Welse	117
6	Zusammenfassende Diskussion	118

6.1	Molekularbiologie	118
6.2	Infektionsversuche	120
7	Zusammenfassung	123
8	Summary	125
	Abkürzungsverzeichnis	127
	Literaturverzeichnis	130
	Danksagungen	138
	Anhang 1: Puffer und Reagenzien	a
	Enzyme	d
	Marker	d
	Anhang 2: Material und Laborausrüstung	e
	Kits	e
	Vektoren	e
	Bakterien	e
	Laborgeräte	f
	Verbrauchsmaterialien	g
	Anhang 3: Sequenzdaten Phylogenese	h

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie Iridoviridae (nach Granzow, 2009)	5
Abbildung 2: CCLV Rie88-Zellen nach Infektion mit ESV	31
Abbildung 3: CCLV Rie88-Zellen nach Infektion mit DFV	31
Abbildung 4: CCLV Rie173-Zellen nach Infektion mit ESV	32
Abbildung 5: CCLV Rie173-Zellen nach Infektion mit DFV	32
Abbildung 6: Primerpositionen zur Amplifikation des MCP-Gens	35
Abbildung 7: PCR MCP 1, 2 und 3 (Primer nach Hyatt et al., 2000)	36
Abbildung 8: PCR MCP 1A, 2A und 3A	37
Abbildung 9: PCR MCP 2A	41
Abbildung 10: Spaltmuster PCR-Produkt MCP 2A gespalten mit BamH I	42
Abbildung 11: Spaltmuster PCR-Produkt MCP 2A gespalten mit Sal I	43
Abbildung 12: Spaltmuster PCR Produkt MCP 2A gespalten mit Hae II	44
Abbildung 13: Spaltmuster PCR-Produkt MCP 2A gespalten mit Xho I	45
Abbildung 14: Southernblot-Analyse MCP-Gen des DFV und EHNV mit den HRP-markierten synthetischen Oligonukleotiden DF 2 rev, MCP 6R sowie Rana mcp rev	47
Abbildung 15: Amplifizierung von MCP-Genbereichen des DFV und GV6	49
Abbildung 16: PCR MCP DF (Primer MCP DF 1 for & 2 rev), PCR Produkt 923 bp	50
Abbildung 17: PCR MCP DF (Primer MCP DF 1 for & DF 2 rev)	51
Abbildung 18: PCR MCP DF 2 for & MCP 6R bzw MCP 6A rev DFV und GV6	52
Abbildung 19: PCR Irido MCP AF bzw. MCP 1 & MCP DF 3 rev von GV6 und DFV	53
Abbildung 20: SCIV PCR zur Amplifikation des MCP-Gens des GV6, DFV und LMBV	55
Abbildung 21: Primerposition der Santee-Cooper Ranaviren in Relation zum MCP-Gen	56
Abbildung 22: Sequenzvergleich (engl. multiple alignment) der MCP-Gen-Nukleotidsequenz	68
Abbildung 23: Phylogramm Genus Ranavirus	71
Abbildung 24: Phylogramm Familie Iridoviridae	75
Abbildung 25: PCR PAN-RANA-MCP zum Nachweis aller Ranaviren	78
Abbildung 26: Position der Primer Rana MCP for & rev in Relation zum MCP-Gen	79
Abbildung 27: PCR-Produkt PAN-RANA-MCP nach Spaltung mit BamH I	82
Abbildung 28: PCR-Produkt PAN-RANA-MCP nach Spaltung mit Sal I	83
Abbildung 29: PCR-Produkt PAN-RANA-MCP nach Spaltung mit Pst I	84
Abbildung 30: PCR-Produkt PAN-RANA-MCP nach Spaltung mit Afl III	85
Abbildung 31: PCR MCP 1A, 2A und 3 ESV nach 75 Zellkultur-Passagen	88
Abbildung 32: PCR Barsch Beta-Actin-Gen	90
Abbildung 33: PCR Perch β -Actin 2 und 2i	91
Abbildung 34: Beta-Actin-DNA -Sequenz des Flussbarsches (<i>Perca fluviatilis</i>)	93
Abbildung 35: Wels PCR Beta-Actin-Gen	95
Abbildung 36: Beta-Actin-Gensequenz Wels (<i>Silurus glanis</i>)	97
Abbildung 37: Beispiel PCR MCP 2A Flussbarsch	98
Abbildung 38: Beispiel PCR MCP 2A Wels	99

<i>Abbildung 39: Flussbarsch (Perca fluviatilis) nach Infektionsversuch ohne klinischen Befund</i>	100
<i>Abbildung 40: Kumulative Mortalität Wels (Silurus glanis) nach Infektion mit verschiedenen Ranaviren bei 15 °C Wassertemperatur</i>	105
<i>Abbildung 41: Kumulative Mortalität Wels (Silurus glanis) nach Ranavirusinfektion bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I)</i>	108
<i>Abbildung 42: Wels mit Hämorrhagien nach Infektion mit ESV bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I)</i>	109
<i>Abbildung 43: Kumulative Mortalität Wels (Silurus glanis) nach Infektion mit verschiedenen Ranaviren bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II)</i>	112
<i>Abbildung 44: Wels mit Hämorrhagien nach Infektion mit ESV bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II)</i>	113
<i>Abbildung 45: Kumulative Mortalität und Verluste durch Kannibalismus nach Infektion von Silurus glanis mit verschiedenen Ranaviren bei 25 °C (TV 25/II)</i>	114

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Herkunft und Ursprung untersuchter Ranavirusisolate</i>	14
<i>Tabelle 2: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung von MCP-Genfragmenten (nach Hyatt et al., 2000; Gould et al., 1995)</i>	15
<i>Tabelle 3: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung von Ranavirus MCP-Fragmenten</i>	15
<i>Tabelle 4: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des MCP-Gens von DFV, GV6 und LMBV</i>	16
<i>Tabelle 5: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des MCP-Gens aller analysierten Ranaviren</i>	16
<i>Tabelle 6: Primer für die Sequenzierung von Plasmid DNA pGEM-Teasy</i>	16
<i>Tabelle 7: Primer zur Amplifikation des Beta-Actin-Gens von Barsch (Perca fluviatilis) und Wels (Silurus glanis)</i>	17
<i>Tabelle 8: Intronspezifischer Primer zur Amplifikation des Beta-Actin-Gens des Barsches (Perca fluviatilis)</i>	17
<i>Tabelle 9: Zur Virusidentifizierung verwendete Primer nach Hyatt et al. (2000)</i>	18
<i>Tabelle 10: Virustiter (in TCID₅₀/ ml)</i>	33
<i>Tabelle 11: Identität der Nukleotidsequenz (in %) des MCP-Gens (1392 bp)</i>	39
<i>Tabelle 12: Spaltanalyse PCR MCP 2A</i>	40
<i>Tabelle 13: Homologie (in Prozent) der ermittelten Nukleotidsequenzen des MCP-Gens (1392 bp) der Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV mit anderen Ranaviren</i>	58
<i>Tabelle 14: Spaltanalyse PAN-RANA-MCP PCR</i>	80
<i>Tabelle 15: Sequenzanalyse des PAN-RANA-MCP PCR-Produktes</i>	86
<i>Tabelle 16: Titrationsergebnisse ESV Passagen</i>	87
<i>Tabelle 17: Kumulative Mortalität Flussbarsche (Perca fluviatilis) nach Ranavirus-Infektion bei 25 °C Wassertemperatur</i>	101
<i>Tabelle 18: Kumulative Mortalität Flussbarsche (Perca fluviatilis) nach Ranavirus-Infektion bei 15 °C Wassertemperatur</i>	101
<i>Tabelle 19: Ergebnisse Infektionsversuche Barsch (Perca fluviatilis) 25 °C Wassertemperatur</i>	103
<i>Tabelle 20: Ergebnisse Infektionsversuche Barsch (Perca fluviatilis) 15 °C Wassertemperatur</i>	103
<i>Tabelle 21: Kumulative Mortalität Welse (Silurus glanis) nach Ranavirusinfektion bei 15 °C Wassertemperatur</i>	106
<i>Tabelle 22: Ergebnisse Infektionsversuche Wels (Silurus glanis) 15 °C Wassertemperatur</i>	107
<i>Tabelle 23: Kumulative Mortalität Welse (Silurus glanis) bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I)</i>	109
<i>Tabelle 24: Ergebnisse Infektionsversuche Wels (Silurus glanis) 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I)</i>	110
<i>Tabelle 25: Kumulative Mortalität Welse (Silurus glanis) bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II)</i>	113
<i>Tabelle 26: Ergebnisse Infektionsversuche Wels (Silurus glanis) 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II)</i>	115

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Ranaviren sind weltweit verbreitete Erreger der Familie *Iridoviridae*. Eine Vielzahl von Amphibien, Fischen und Reptilien wurde bereits als empfängliche Wirtsspezies identifiziert (Essbauer & Ahne, 2001). Viren wie das Epizootische Hämatopoetische Nekrosevirus (EHNV) oder das European Sheatfish Virus (ESV) sind für das Auftreten von Massenmortalitäten innerhalb ihrer Wirtsspezies verantwortlich. Somit sind diese in der Aquakultur von besonderer ökonomischer Bedeutung (Langdon et al., 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Ahne, 1989). Ökologisch spielen Ranaviren wie das Bohle Iridovirus (BIV) oder das Frog Virus 3 (FV3) eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem weltweit zu verzeichnenden Rückgang vieler Amphibienpopulationen (Cunningham et al., 1996; Ahne & Essbauer, 2000; Chinchir 2002).

Trotz ihrer ökonomischen und ökologischen Bedeutsamkeit ist ihnen jedoch in Europa bislang verhältnismäßig wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden. Es ist nahezu unbekannt, wie bedrohlich Ranaviren für europäische Fisch- und Amphibienarten sein können.

Schwer einschätzbar ist auch das Risiko der Einschleppung von Ranaviren nach Europa, wie z.B. des EHNV, und die daraus entstehende Bedrohung der europäischen Fisch- und Amphibienspezies. Wissenschaftler aus Finnland, Dänemark, der Tschechischen Republik, Großbritannien, Italien und Deutschland arbeiteten von 2006 bis 2009 am EU-Projekt RANA ("Risk Assessment of New and Emerging Systemic Iridoviral Diseases for European Fish and Aquatic Ecosystems", Projekt-Nr. SSPE-CT-2005-006459). Ziel der internationalen Zusammenarbeit war es, einen Überblick über das von Ranaviren ausgehende Risiko für europäische Fisch- und Amphibienarten zu erhalten.

Um diese Fragen beantworten zu können, muss zunächst eine nähere Charakterisierung der Viren bezüglich des Verwandtschaftsgrades und des Wirtsspektrums erfolgen. Die Durchführung von Infektionsversuchen mit verschiedenen Fisch- und Amphibienspezies zur Einschätzung der Virulenz der Erreger stellt den umfangreichsten Aufgabenbereich des Projektes RANA dar. Die notwendige Grundlage zur Durchführung der Infektionsversuche ist eine eindeutige Identifizierung der einzelnen Ranavirusisolate. Hierzu sind molekularbiologische Untersuchungen unerlässlich.

Thema dieser Dissertation sind daher die molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung ausgewählter Ranaviren sowie die Durchführung und Auswertung von Infektionsversuchen mit den Fischarten Wels (*Silurus glanis*) und Flussbarsch (*Perca fluviatilis*).

Aus dem Wels als Wirtsspezies wurde bereits 1989 das Ranavirus ESV isoliert. Die Empfänglichkeit des Welses für andere Ranavirusisolate ist jedoch unbekannt (Ahne et al., 1989). Experimentell reproduzierbar war die Infektion von Welsbrut mit ESV mit einer kumulativen Mortalität von 100 % innerhalb von acht Tagen bei einer Wassertemperatur von 25 °C (Ogawa et al., 1990).

Flussbarsche sind in Australien als Hauptwirt für EHNV bedeutend (Langdon et al., 1986; Langdon & Humphrey, 1987). Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch europäische Flussbarsche für EHNV empfänglich sind.

In Infektionsversuchen wurde bereits gezeigt, dass der europäische Hecht (*Esox lucius*) für EHNV und ESV sowie zwei weitere Ranavirusisolate (Pike-Perch Iridovirus PPIV und Shortfin Eel Ranavirus SERV) empfänglich ist (Bang Jensen et al., 2009). Infektionsversuche mit Barschen (*Perca fluviatilis*) bestätigten die Empfänglichkeit dieser Spezies für das EHNV (Whittington & Reddacliff, 1995).

Im Rahmen der molekularbiologischen Charakterisierung der Ranaviren stellt das Hauptstrukturprotein (MCP, engl. major capsid protein)-Gen das Mittel der Wahl dar. Es ist das bislang am häufigsten untersuchte Gen der Iridoviren. Durch seine Stabilität ist es zur genetischen Differenzierung und Charakterisierung der verschiedenen Ranaviren geeignet. Das Gen hat sich bereits in vergleichenden Sequenzanalysen bewährt (Hyatt et al., 2000; Mao et al., 1997; Tidona et al., 1998; Marsh et al., 2001).

Die vorliegende Dissertation verfolgt zwei Ziele. Zunächst soll eine eindeutige Identifizierung und eine sichere Charakterisierung der untersuchten Ranaviren mittels PCR- und Sequenzanalysen des MCP-Gens erfolgen. Analysiert werden folgende Erreger: EHNV, ESV, FV3, BIV, das European Catfish Virus (ECV), das Pike-Perch Iridovirus (PPIV), das Shortfin Eel Ranavirus (SERV), das Rana Esculenta Virus Isolat Italy 282/ I02 (REV), das Rana Tigrina Ranavirus (RTRV), das Guppy Virus 6 (GV6), das Doctor Fish Virus (DFV) und das Largemouth Bass Virus (LMBV).

Die auf diese Weise charakterisierten Erreger sollen des Weiteren in Infektionsversuchen auf die Virulenz für Flussbarsche und Welse bei verschiedenen Wassertemperaturen getestet werden.

2 Einführung (Literaturübersicht)

2.1 Taxonomie der Ranaviren

Ranaviren werden dem Genus *Ranavirus* der Familie *Iridoviridae* zugeordnet (Fauquet et al., 2005 im 8. Taxonomiebericht ICTV). Weitere Genera dieser Familie sind *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus* und *Megalocytivirus*. Vertreter der Genera *Iridovirus* und *Chloriridovirus* infizieren Invertebraten, wobei das Wirtsspektrum Arthropoden und Insekten umfasst. In den Genera *Lymphocystivirus* und *Megalocytivirus* sind fischpathogene Iridoviren zusammengefasst. Erreger des Genus *Ranavirus* infizieren neben Fischen auch Amphibien und Reptilien. Die Virulenz einzelner Ranaviren ist dabei nicht unbedingt auf eine einzelne Wirtsspezies beschränkt. So konnte mit dem Amphibienvirus BIV experimentell auch der Glasbarsch (*Lates calcarifer*) infiziert werden (Moody & Owens 1994). Ranaviren verursachen systemische Infektionen mit fokalen hämorrhagischen Nekrosen in inneren Organen wie Leber, Milz, Nieren und Darm (Reddacliff & Whittington, 1996). Die Infektion kann vielfach aber auch subklinisch verlaufen (Chinchar et al., 2005).

Als Referenzvirus für den Genus *Ranavirus* gilt das FV3. Es fand erstmals 1965 schriftliche Erwähnung (Granoff et al., 1965). Da die Bezeichnung vom lateinischen Wort *rana* für Frosch abgeleitet wurde, ist das FV3 an der Namensgebung des Genus maßgeblich beteiligt.

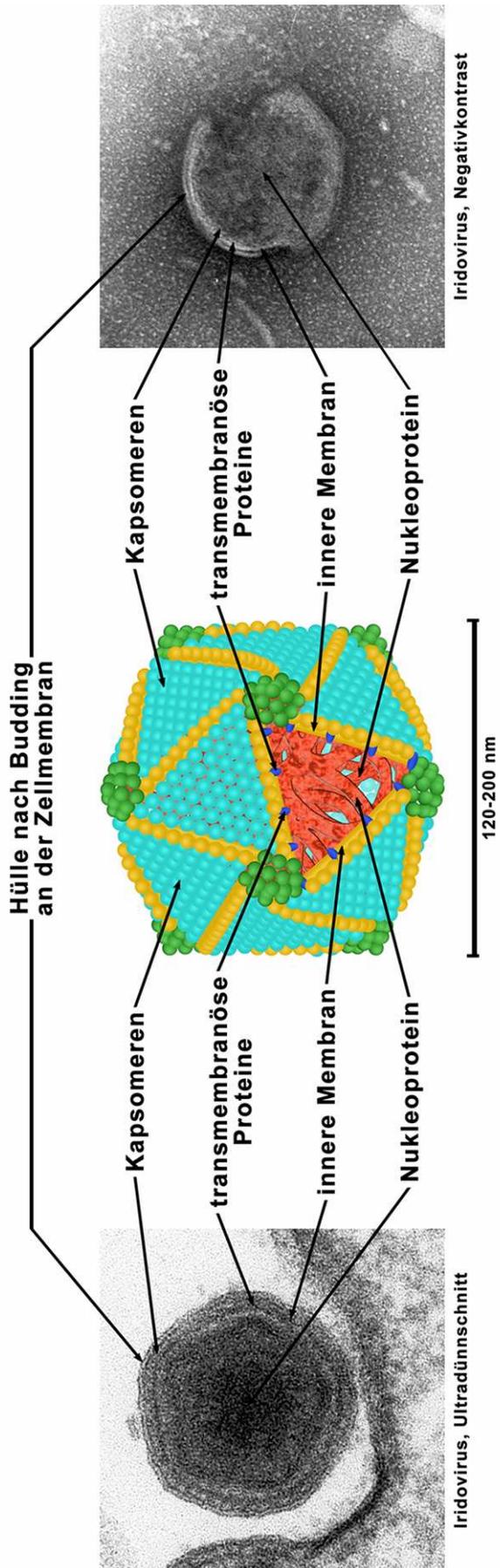
Innerhalb des Genus *Ranavirus* werden sechs Virusgruppen unterschieden, welche jeweils mehrere Virusisolate beinhalten. Unterschieden wird zwischen Ambystoma Tigrinum Virus (ATV), BIV, EHNV, ECV, FV3 und der Gruppe der Santee-Cooper Iridoviren. Dem Genus *Ranavirus* vorerst taxonomisch zugeordnet sind die Virusisolate Rana Esculenta Iridovirus (REIR), Singapore Grouper Iridovirus (SGIV) und das Testudo Iridovirus. Als Merkmale zur Unterscheidung der sechs Virusgruppen innerhalb des Genus werden Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) Profile, Proteinprofile, DNA-Sequenzanalysen und Wirtsspezifitäten herangezogen. Da bislang keine konkreten Unterscheidungskriterien verfügbar sind, gilt eine Virusgruppe als eigenständig, wenn sie sich im RFLP Profil, wie auch im Wirtsspektrum und in der Aminosäuresequenz deutlich von einer anderen Gruppe unterscheidet. Die genetische Unterscheidung der Iridoviren erfolgt hauptsächlich auf Basis der MCP-Gensequenz. Beträgt die Homologie der Nukleotidsequenz des MCP-Gens mindestens 95 %, so handelt es sich um Isolate derselben Virusgruppe (Chinchar et al., 2005).

2.2 Viruseigenschaften

2.2.1 Virusmorphologie

Iridoviren sind isometrisch aufgebaute Viruspartikel, welche speziesabhängig auch umhüllt sein können. Unbehüllte Virionen haben einen Durchmesser von ca. 150 nm, behüllte Virionen von 160 - 200 nm. Die Virionen besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Gesamtlänge von 150 - 170 kbp, das von einem aus Kapsomeren isometrisch aufgebauten Nukleokapsid umgeben ist. Eine innere Lipidmembran enthält Transmembranproteine wie das MCP. Etwa 40 % des Gesamtproteingehaltes der Virionen repräsentiert das ca. 49 kDa große MCP (Hyatt et al., 2000; Chinchar et al., 2005). Untersuchungen von FV3 Virionen ermöglichten die Identifizierung von 30 verschiedenen Strukturproteinen. Das Genom des Tiger Frog Virus (TFV) und Ambystoma Tigrinum Virus (ATV) kodiert jedoch für mehr als 100 mögliche offene Leserahmen (engl. open reading frame, ORF). Während sich die biochemische Zusammensetzung der inneren Lipidmembran von derjenigen der Wirtszelle unterscheidet und es sich hier vermutlich um eine de-novo entstandene Membran handelt, entstammt die bei einigen Virusspezies durch Sprossen (engl. budding) gebildete äußere Hülle der Wirtszellplasmamembran (Hyatt et al., 2000; Chinchar et al., 2005).

Iridoviridae



Friedrich-Loeffler-Institut Insel-Riems
Elektronenmikroskopie: Dr. H. Granzow
Grafikdesign: M. Jörn

Abbildung 1: Morphologie *Iridoviridae* (nach Granzow, 2009)

2.2.2 Genomorganisation und Replikationszyklus

Das doppelsträngige DNA-Genom von 105 kbp Länge und einem G+C Gehalt von 54 % ist charakterisiert durch zirkuläre Permutation und eine terminale Redundanz von 5 bis 50 %. Die DNA-Methylierung erfolgt im Zytoplasma und dient dem Schutz der DNA vor Endonukleasen (Chinchar et al., 2005).

Der Replikationszyklus der Iridoviren ist bislang nur durch Untersuchungen des FV3 näher charakterisiert worden. Behüllte Virionen dringen in die Wirtszelle über eine rezeptorvermittelte Endocytose ein. Nach Untersuchungen von Chinchar (2002) sollen unbehüllte Virionen die Zellmembran direkt penetrieren können. Die virale DNA dringt in den Wirtszellkern ein, wo eine erste Stufe der DNA-Synthese stattfindet. Im Zytoplasma der Wirtszelle findet eine zweite Stufe der DNA-Synthese statt. Die DNA wird dort methyliert und zu Konkatameren formiert. Im Anschluss daran erfolgt die Synthese der viralen Proteine. Die konkatamerische virale DNA wird mit weiteren Viruskomponenten zu Virionen verpackt. Dieses geschieht in morphologisch deutlich erkennbaren Bereichen des Zytoplasmas (Virusfabriken, engl. Virus Assembly Sites). Die infektiösen Virionen können sowohl parakristallin in diesen Arealen akkumulieren als auch durch Sprossen an der Zellmembran (engl. Budding) die Wirtszelle verlassen. Die Mehrheit der Virionen verbleibt jedoch zellgebunden (Murti et al., 1985, Chinchar et al., 2005).

Der Genomvergleich verschiedener Ranavirusgruppen zeigt, dass keine Kolinearität der Genome vorhanden ist. Das heißt, es gibt grundlegende Unterschiede im Genomaufbau der unterschiedlichen Ranaviren (Chinchar et al., 2005; Tsai et al., 2005). Das vollständige Genom des FV3 (GenBank AY548484, Tan et al., 2004), des ATV (GenBank AY150217, Jancovich et al., 2003) und des SGIV (GenBank AY521625, Song et al., 2004) ist in der internationalen Sequenzdatenbank (GenBank) verfügbar.

2.2.3 Chemische, physikalische und biologische Eigenschaften

Iridoviren kommen nur bei poikilothermen Wirten vor, die in feuchter oder aquatischer Umwelt habitieren. Bei einer Wassertemperatur von 4 °C bleiben die Virionen über lange Zeiträume infektiös. Es wurde jedoch gezeigt, dass Virionen des BIV auch bei Temperaturen von 42 °C bis zu sechs Wochen stabil bleiben können. Ab einer Umgebungstemperatur von 50 °C geht die Infektiosität jedoch verloren. Zur Inaktivierung von Virionen können Ether, Chloroform, Natriumdeoxychlorat oder Phospholipase A verwendet werden. Bei einem pH-Wert von 2.0 - 3.0 geht die Infektiosität ebenfalls verloren (Chinchar et al., 2005).

Die Schwebedichte unbehüllter Virionen in Cäsiumchlorid beträgt 1,32 g/cm³, die behüllter Virionen 1,28 g/cm³. Unbehüllte Virionen sind ebenfalls infektiös. Es wird jedoch angenommen, dass die Behüllung eine Erhöhung der spezifischen Infektiosität bewirkt (Chinchar et al., 2005).

Eine Virusübertragung ist über die Futtermittelaufnahme, durch parenterale Injektion oder durch Exposition in virusbelastetem Milieu möglich. Das durch eine Ranavirusinfektion ausgelöste Krankheitsbild führt im akuten Fall zur systemischen Erkrankung mit fokalen hämorrhagischen Veränderungen in inneren Organen wie Leber, Milz, Niere oder Darm (Ahne et al., 1990; Ogawa et al., 1990; Langdon et al., 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Reddacliff & Whittington, 1996). Jedoch sind auch subklinische Infektionen möglich (LMBV, Plumb et al., 1999). Die Ausprägung des Krankheitsbildes ist somit abhängig von Faktoren wie Wirtsspezies, Alter und Konstitution der Wirtstiere als auch von Umweltbedingungen wie der Umgebungstemperatur (Chinchar et al., 2005).

Für das BIV wurde gezeigt, dass eine Übertragung des Virus auch speziesübergreifend möglich ist. Das BIV wurde experimentell auf Barramundi (*Lates calcarifer*) übertragen und führte zur Erkrankung der Fische mit 100 % Mortalität (Moody & Owens, 1994). Mao et al. (1999) stellten die Hypothese auf, dass es sich bei Amphibien um Erregerreservoir für Fischranaviren handeln könnte und umgekehrt.

Die Vermehrung der Ranaviren erfolgt in verschiedenen permanent wachsenden Fischzelllinien. Vorzuziehen ist laut OIE eine Vermehrung in Bluegill Fry 2 - Zellen (Wolf & Mann, 1980) bei 22 °C. Infolge der Virusinfektion treten Veränderungen in der Zellmorphologie auf, die als zytopathischer Effekt (engl. cytopathogenic effect, CPE) bezeichnet werden. Die totale Zellzerstörung führt zur Ausbildung sogenannter Plaques. Eine schnelle Ausbreitung des CPE führt zur vollständigen Lysis der Zellen und zur Freisetzung neuer infektiöser Viruspartikel.

2.3 Vorkommen und Verbreitung

Die Geschichte der Ranaviren beginnt mit dem FV3, das 1965 von nordamerikanischen Leopardfröschen (*Rana pipiens*) isoliert wurde und als Referenzvirus des Genus *Ranavirus* gilt (Granoff et al., 1965; Goorha, 1995). Seither wurde eine weltweite Verbreitung der Ranaviren verzeichnet (Ahne & Essbauer, 2000). So wurden Ranaviren bereits in Nordamerika, Australien, Europa und in Asien nachgewiesen. Dabei waren nicht nur verschiedene Amphibienarten von Ranavirusinfektionen betroffen, sondern auch viele Fischarten und sogar Reptilien (Hyatt et al., 2002; Marschang et al., 1999; Chen et al., 1999). In diesem Zusammenhang steht besonders das EHNV im Fokus der Fischvirologie, welches 1986 durch Ausbrüche bei australischen Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) und Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit massiven Verlusten große Bedeutung gewann (Langdon et al., 1988). Es wurde im Jahr 2006 als einziges Ranavirus in die Liste der exotischen Tierseuchenerreger der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) aufgenommen und sein Auftreten ist seit November 2008 anzeigepflichtig (Fischseuchenverordnung und Verordnung zur Änderung der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen). Das ESV und das ECV führten in Deutschland bzw. Italien und Frankreich bei Welsen (*Silurus glanis*) und Amerikanischen Katzenwelsen (*Ameiurus melas*) zu massiven Verlusten in Wildpopulationen und in der Aquakultur (Ahne et al., 1997, Bovo et al., 1993; Pozet et al., 1992).

Weiterhin stehen Ranaviren im Verdacht, in der weltweit zu verzeichnenden Deklination der aquatischen und semi-aquatischen Amphibienpopulationen neben anderen Ursachen wie Habitatzerstörung und weiteren Erkrankungen wie der Chytridiomykose (*Batrachochytrium dendrobatidis*) eine entscheidende Rolle zu spielen (Ahne & Essbauer, 2000; Chinchar, 2002). So wurde in Großbritannien ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Ranaviren (FV3) und dem massiven Amphibienrückgang nachgewiesen (Cunningham et al., 1996).

2.4 Untersuchte Virusisolate

2.4.1 Epizootisches Hämatopoetisches Nekrosevirus (EHNV)

Das EHNV wurde 1986 als erstes australisches Fischvirus von Langdon et al. beschrieben. Isoliert wurde es aus juvenilen Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) nach Auftreten von Massensterben im Jahr 1984 in Victoria, Australien. Die untersuchten Fische wiesen fokale nekrotische Veränderungen in Leber, Nieren und Milz auf (Langdon et al., 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Reddacliff & Whittington, 1996). Als weitere empfängliche Fischarten erwiesen sich in Aquakultur gehaltene Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), welche vergleichbare pathologische Symptome, jedoch keine vergleichbaren Mortalitätsraten aufwiesen (Langdon et al., 1988; Langdon, 1989). Die experimentelle Infektion weiterer Fischarten wie des Macquarie Barsches (*Macquaria australasica*) oder des Silberbarsches (*Bidyanus bidyanus*) ist möglich (Langdon, 1989). Seit 2006 ist EHNV auf der Liste für exotische Tierseuchenerreger des OIE zu finden. In Deutschland besteht für die Epizootische Hämorrhagische Nekrose Anzeigepflicht. In Europa ist das Virus jedoch bisher nicht nachgewiesen worden.

2.4.2 European Sheatfish Virus (ESV)

Über das ESV wurde 1989 erstmals berichtet. 1988 führte dieser Erreger in der Welsbrut (*Silurus glanis*) einer niedersächsischen Warmwasseranlage zu einer akuten Epizootie mit einer kumulativen Mortalität von 100 % (Ahne et al., 1989). Das Krankheitsbild zeichnete sich durch Anorexie, Apathie und Ataxie aus. In entsprechenden Infektionsversuchen mit Welsbrut bei einer Wassertemperatur von 25 °C kam es innerhalb von 8 Tagen zur Ausprägung des Krankheitsbildes mit einer kumulativen Mortalität von 100 %. Erkrankte Welse wiesen petechiale Blutungen in der Haut und in den inneren Organen auf. Weiterhin wurde eine generalisierte Nekrose der hämatopoetischen Gewebe von Niere und Milz beobachtet. Viruspartikel wurden in Epithel-, Endothelzellen sowie in den weißen Blutzellen verschiedener Organe nachgewiesen (Ahne et al., 1990; Ogawa et al., 1990). Die enge Verwandtschaft zu anderen Ranaviren wie EHNV, ECV, FV3 und BIV führte zur taxonomischen Eingruppierung in den Genus *Ranavirus* (Ahne et al., 1997, 1998).

2.4.3 European Catfish Virus (ECV)

Das ECV wurde 1990 von Amerikanischen Katzenwelsen (*Ameiurus melas*) isoliert, nachdem es in einem See in Frankreich zu Massenmortalitäten gekommen war. Die Beobachtungen anschließender Infektionsversuche bestätigten eine große Ähnlichkeit zu Infektionen mit ESV und EHNV (Pozet et al., 1992). Später wurde die Virusvariante ECV-24 in Italien aus erkrankten Amerikanischen Katzenwelsen isoliert (Bovo et al., 1993).

2.4.4 Bohle Iridovirus (BIV)

Das BIV ist nach EHNV das zweite australische Iridovirus des Genus *Ranavirus*. Isoliert wurde es zufällig, nachdem einige aus einem Teich in Bohle, Queensland gefangene Grabfrosch-Kaulquappen (*Limnodynastes ornatus*) während bzw. kurz nach der Metamorphose verendeten (Speare & Smith 1992). Für das Amphibienvirus BIV wurde gezeigt, dass es auch für den Barramundi (*Lates calcarifer*), einen australischen Riesenbarsch, virulent ist. In Versuchen mit Barramundi löste die Infektion mit BIV über Inokulation und Infektionsbad eine akute Erkrankung mit 100 % kumulativer Mortalität aus (Moody & Owens, 1994).

2.4.5 Frog Virus 3 (FV3)

Das FV3 ist das Referenzvirus (engl. type strain) des Genus *Ranavirus*. Es wurde als erstes Ranavirus im Jahr 1965 aus einem Nierentumor eines nordamerikanischen Leopardsfrosches isoliert (Granoff et al., 1965). Spätere Untersuchungen konnten die Beteiligung des Erregers an der Entstehung von Nierentumoren nicht bestätigen. Ein kausaler Zusammenhang des FV3 mit einer Erkrankung der Frösche konnte nicht nachgewiesen werden (Granoff, 1969). Das Virus erlangte erst durch das Auftreten scheinbar nah verwandter Erreger bei Fischen und Amphibien erneute Aufmerksamkeit. Das FV3 wurde seither molekularbiologisch eingehend untersucht (Tan et al., 2004). In den USA wurde 2006 das FV3 aus kultivierten amerikanischen Ochsenfröschen (*Rana catesbeiana*) während eines Krankheitsgeschehens mit einer Verlustrate von 50 % isoliert. Als Sekundärerreger wurde in diesem Fall *Aeromonas hydrophila* identifiziert (Miller et al., 2007). Die vollständige Nukleotidsequenz des FV3-Genomes ist seit 2004 veröffentlicht (GenBank AY548484, Tan et al., 2004).

2.4.6 Pike-Perch Iridovirus (PPIV)

Das PPIV wurde im Rahmen von Routineuntersuchungen zufällig aus gesunden jungen Zandern (*Stizostedion lucioperca*) in Finnland isoliert. In Infektionsversuchen mit Regenbogenforellen konnte keine Virulenz für diese in Finnland ökonomisch bedeutende Fischart nachgewiesen werden (Tapiovaa et al., 1998). Der natürliche Wirt dieses Virus konnte bislang nicht identifiziert werden.

2.4.7 Shortfin Eel Virus (SERV)

1999 wurde in Italien das SERV aus importierten Australischen Aalen (Shortfin eel, *Anguilla australis*) isoliert (Bovo et al., 1999). Es erfolgte bislang keine nähere Klassifizierung bzw. Charakterisierung des Virus.

2.4.8 Rana Esculenta Virus Isolat Italy 282/I02 (REV)

Beschrieben wurde das Rana Esculenta Iridovirus (REIR) erstmals 1991, nachdem es in Westeuropa (Kroatien) aus moribunden Teichfröschen isoliert worden war (Fijan et al., 1991). Laut aktueller Virustaxonomie ist dieses Virus vorläufig als unklassifiziertes Virus in den Genus *Ranavirus* aufgenommen worden (Chinchar et al., 2005). Das Isolat REV Italy 282/ I02 (REV) stammt von italienischen Teichfröschen (*Rana esculenta*, Bovo G., pers. Kommunikation).

2.4.9 Guppy Virus 6 und Doctor Fish Virus (GV6 & DFV)

Die als Zierfischviren bezeichneten Isolate der aus Südostasien importierten Süßwasserzierfische Guppy (*Poecilia reticulata*; GV6) und Putzerlippfisch (*Labroides dimidatus*; DFV) wurden 1995 in den USA isoliert (Hedrick & McDowell, 1995). Sie zählen laut Virustaxonomie zur Gruppe der sogenannten Santee-Cooper Ranaviren. Molekularbiologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich hierbei um eng verwandte Virusisolate handelt. Der Vergleich einer 85 Aminosäuren umfassenden N-terminalen MCP-Sequenz mit der entsprechenden Aminosäuresequenz von FV3 ergab eine Homologie von nur 77 % (GenBank U82550, Mao et al., 1997). Im Gegensatz dazu stehen die von Hyatt et al. (2000) veröffentlichten Sequenzdaten (DFV: AF157665; GV6: AF157671). Diese weisen eine deutliche Homologie zu den entsprechenden C-terminalen MCP-Gensequenzen von ESV und ECV auf. Im ELISA (nach den OIE-Empfehlungen) jedoch zeigten DFV und GV6 keine Kreuzreaktivität mit am Kaninchen entwickelten Antiseren gegen EHNV bzw. BIV. Daher bezeichneten die Autoren diese beiden Isolate als den Ranaviren verwandte aber nicht zugehörige Viren (Hyatt et al., 2000).

2.4.10 Largemouth Bass Virus (LMBV)

Laut Virustaxonomie zählt das LMBV wie DFV und GV6 zu den Santee-Cooper Ranaviren. Die Bezeichnung als Santee-Cooper Ranaviren wurde vom vermeintlich ersten nordamerikanischen Fundort abgeleitet, dem Santee-Cooper Reservoir in South Carolina. Hier wurde 1995 von moribunden Forellenbarschen (*Micropterus salmoides*) das LMBV isoliert (Plumb et al., 1996). Später wurde jedoch gezeigt, dass es sich bereits bei einem 1991 von Forellenbarschen des Lake Weir in Florida isolierten Iridovirus um das LMBV handelte. Die Bezeichnung als Santee-Cooper Ranavirus ist seither umstritten (Grizzle et al., 2002). Mit dem LMBV infizierte Forellenbarsche zeigten Gleichgewichtsstörungen, vergrößerte, gerötete Schwimmblasen und schwammen häufig dicht an der Wasseroberfläche (Plumb et al., 1996). Die Virulenz des Virus für Forellenbarsche wurde experimentell bestätigt (Plumb & Zilberg, 1999). Der Erreger wurde auch von klinisch unauffälligen Forellenbarschen isoliert (Plumb et al., 1999). Die molekularbiologische Untersuchung des LMBV zeigte eine enge genetische Verwandtschaft zu den Zierfischviren DFV und GV6 (Mao et al., 1999), welche zu der Einordnung dieser Iridoviren in die Klasse der Santee-Cooper Ranaviren führte.

2.4.11 *Rana Tigrina* Ranavirus (RTRV)

Dieses thailändische RTRV wurde 1998 von asiatischen Ochsenfröschen (*Rana tigrina*) mehrerer Froschfarmen in Zentralthailand isoliert. Die Erkrankung äußerte sich bei adulten Fröschen in Form von Hautulzerationen und systemischer Entzündung mit exuberanter Hämatopoese und einer kumulativen Mortalität zwischen 20 und 50 %. Bei Kaulquappen und Jungfröschen trat die Erkrankung in akuter Form auf. Betroffene Tiere litten unter systemischer Entzündung, und die kumulative Mortalität war mit 50 - 100% höher als bei den adulten Fröschen (Kanchanakhan et al., 1998). Bei dem 2000 in China von verendeten Kaulquappen des asiatischen Ochsenfrosches (*Rana tigrina rugulosa*) isolierten Tiger Frog Virus handelt es sich vermutlich um das gleiche Virus (Weng et al., 2002).

2.5 Diagnostik

Genauere Vorgaben zu diagnostischen Methoden für den Nachweis von EHNV finden sich im Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2006 des OIE (Anon., 2001). Empfohlen werden neben der zeit-
aufwendigen Virusisolation in Zellkultur auch die PCR in Verbindung mit Restriktionsanalysen oder die
Sequenzierung als diagnostische Methode zum Nachweis für das Bestehen einer Ranavirusinfektion.
Hierbei dient vornehmlich das MCP-Gen zur Identifizierung der verschiedenen Ranaviren (Gould et
al., 1995; Hyatt et al., 2000; Marsh et al., 2001). Das MCP-Gen gilt als hochkonserviert und hat eine
Länge von 1392 bp. Partielle oder vollständige MCP-Sequenzen vieler Ranaviren sind bereits in der
GenBank verfügbar. Ältere vergleichende Nukleotidsequenzanalysen des MCP-Gens zeigen, dass die
Sequenzen der analysierten Ranaviren im untersuchten Genabschnitt von 586 bp nur geringe Unter-
schiede aufweisen. Die Sequenzhomologie beträgt in diesem Bereich mindestens 97,5 % (Hyatt et al.,
2000).

Weitere diagnostische Methoden sind die Immunhistochemie, der ELISA und der Immunfluoreszenz-
test. Bisher entwickelte Antiseren gegen EHNV zeigen eine Kreuzreaktivität unter den verschiedenen
Ranaviren. Eine Ausnahme bilden die südostasiatischen Ranaviren (DFV und GV6), welche keine
oder nur eine sehr schwache Kreuzreaktivität mit den getesteten Antiseren zeigen (Hyatt et al., 1991,
2000; Whittington et al., 1994). Somit ermöglicht der Einsatz dieser Antiseren lediglich den Nachweis,
nicht aber die Differenzierung der Ranaviren. Die im Fisch gebildeten Antikörper sind in der Regel
nicht-neutralisierend.

3 Material

3.1 Virusisolate

Tabelle 1: Herkunft und Ursprung untersuchter Ranavirusisolate

Virusisolat	Abk.	Ursprung	Referenz	Zur Verfügung gestellt von
Epizootic haematopoietic necrosis virus	EHNV	Flussbarsch (Redfin perch, <i>Perca fluviatilis</i>); Australien	Langdon et al., 1986	R. Whittington, University of Sydney, Australien
European sheatfish virus	ESV	Europäischer Wels (Sheatfish, <i>Silurus glanis</i>), Germany	Ahne et al., 1989	W. Ahne, Universität München, Deutschland
European catfish virus	ECV	Schwarzer Katzenwels (Black Bullhead, <i>Ameiurus melas</i>), Frankreich	Pozet et al., 1992	G. Bovo, Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Italien
Frog virus 3	FV3	Leopardfrosch (Leopard frog, <i>Rana pipiens</i>), Nordamerika	Granoff et al., 1965	W. Ahne, Universität München, Deutschland
Bohle iridovirus	BIV	Grabfrosch (Burrowing frog, <i>Limnodynastes ornatus</i>), Australien	Speare & Smith, 1992	A. Hyatt, Australian Animal Health Laboratory, Australien
Rana esculenta virus isolate Italy 282/102	REV	Teichfrosch (Edible frog, <i>Rana esculenta</i>), Italien	Bovo G., persönliche Mitteilung	G. Bovo, Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Italien
Pike-perch iridovirus	PPIV	Zander (Pike perch, <i>Stizostedion lucioperca</i>), Finnland	Tapiovaara et al., 1998	H. Tapiovaara, National food and veterinary research Institute, Finnland
Shortfin eel virus	SERV	Australischer Aal, (Shortfin eel, <i>Anguilla australis</i>), Italien	Bovo et al., 1999	G. Bovo, Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Italien
Guppy virus 6	GV6	Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>), Asien	Hedrick & McDowell, 1995	R. Hedrick, University of California, USA
Doctor fish virus	DFV	Putzerlippfisch (Doctor fish, <i>Labroides dimidatus</i>), Asien	Hedrick & McDowell, 1995	R. Hedrick, University of California, USA
Rana tigrina ranavirus	RTRV	Asiatischer Ochsenfrosch (Tiger frog, <i>Rana tigrina</i>), Thailand	Kanchanakhan, 1998	S. Kanchanakhan, Aquatic Animal Health Research Institute, Thailand
Largemouth Bass Virus	LMBV	Forellenbarsch (Largemouth Bass, <i>Micropterus salmoides</i>), USA	Mao et al., 1999; Grizzle et al., 2002	J. Grizzle, Auburn University, USA

3.2 Zellen

Für die Virusvermehrung wurden die permanenten Fischzelllinien CCLV Rie88 und CCLV Rie173 verwendet.

3.3 Synthetische Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex (Berlin-Buch, Deutschland) synthetisiert und für die Amplifikation und Sequenzierung von DNA-Fragmenten verwendet.

Tabelle 2: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung von MCP-Genfragmenten (nach Hyatt et al., 2000; Gould et al., 1995)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')	nt Position (FV3; AY548484)	Orientierung
MCP 1	CAGCGTGTATCTTATAATAAAAAGAAATG	97318-97347	Forward
MCP 2R	GGCTCCGTCCTGGCCTGTG	97860-97842	Reverse
MCP 3	GAGGCCAAGCGCACAGGCTAC	97774-97794	Forward
MCP 4R	TTGGAGCCGACGGAAGGGTG	98303-98284	Reverse
MCP 5	CGCAGTCAAGGCCTTGATGT	98244-98263	Forward
MCP 6R	AAAGACCCGTTTTGCAGCAAAC	98828-98807	Reverse

Tabelle 3: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung von Ranavirus MCP-Fragmenten

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')	nt Position (FV3; AY548484)	Orientierung
MCP2Arev	GAAGAAGAATGGGAGGGGAAGAAC	97908-97885	Reverse
MCP3Afor	CCTCTCATTCAACGACATCAGC	97698-97719	Forward
MCP4Arev	ACCAGCGAGTAGTACTCGACTC	98447-98426	Reverse
MCP5Afor	TTCCACACCGACATGCGGTTCTCA	98218-98241	Forward
MCP6Arev	AAAGACCCGTTTTGCAGCAAACGG	98828-98805	Reverse
Irido MCP AF**	CCTCCAAAGAGAGCGATATGC	97279-97299	Forward
Irido MCP AR**	AAGAATGGGAGGGGAAGA	97904-97897	Reverse

** nach Holopainen et al., 2009

Tabelle 4: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des MCP-Gens von DFV, GV6 und LMBV

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')	nt Position DFV MCP-Gen (1392bp)	Orientierung
DF1for	GATCTCGCCACTTATGACAGC	43-63	Forward
DF1rev	GCTGTCATAAGTGGCGAGATC	63-43	Reverse
DF2rev	GTGTAGTTGGAACCCACAGAC	965-945	Reverse
DF2for	GTCTGTGGGTTCCAACACTACAC	945-965	Forward
DFV 3 for	CTCATGCACAACGTTGTGGAG	325-345	Forward
DFV 3 rev	TCCACAACGTTGTGCATGAG	344-325	Reverse
SCIV for	CTGGATCCAGCAACACACTTC	(-189) - (-169)	Forward
SCIV rev	CATATCGCAGTTTGCGATATGG	(+45) - (+24)	Reverse

Tabelle 5: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des MCP-Gens aller analysierten Ranaviren

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')	nt Position (FV3; AY548484)	Orientierung
Rana MCP for	CCAGTCCACATGGTCAACCC	98.182-98.201	Forward
Rana MCP rev	GATAATGTTGTGGTTGATGGCC	98.697-98.676	Reverse

Tabelle 6: Primer für die Sequenzierung von Plasmid DNA pGEM-Teasy

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')	nt Position (pGEM- T Easy Vektor; Promega)	Orientierung
sq-40for	TAACGCCAGGGTTTTCCAGT	2946-2966	Forward
sq-48rev	GCGGATAACAATTCACACAGG	210-189	Reverse

Tabelle 7: Primer zur Amplifikation des Beta-Actin-Gens von Barsch (*Perca fluviatilis*) und Wels (*Silurus glanis*)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')	nt Position (Perch β -Actin mRNA ; EU664997)	Orientierung
Perch β -Actin 1 for	ATGGAAGATGAAATCGCCGC	1-20	Forward
Perch β -Actin 2 rev	CATGAGGTAGTCTGTGAGGT	570-551	Reverse
Perch β -Actin 2 for	ACCTCACAGACTACCTCATG	551-570	Forward
Perch β -Actin 3 rev	TAGAAGCATTGCGGTGGAC	1127-1108	Reverse

Tabelle 8: Intronspezifischer Primer zur Amplifikation des Beta-Actin-Gens des Barsches (*Perca fluviatilis*)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' - 3')	nt Position β -Actin-Sequenz Barsch (Abb. 34)	Orientierung
Perch β -Actin 2i for	GCCTAACCTGCACTACATACC	1474-1494	Forward

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Die Fischzellen der Linien CCLV Rie173 und CCLV Rie88 wurden in 75 cm² Gewebekulturflaschen bei 26 °C und 2,5 % CO₂ Atmosphäre vermehrt. Als Zellmedium wurde ein aus MEM Glasgow BHK 21 Grundmedium mit Salzbasis nach Earle bestehendes Medium mit einem Serumgehalt von 10 % FKS verwendet (ZB23).

Zur Erhaltung der Zellen wurde einmal wöchentlich eine Trypsinbehandlung mit ATV zur Ablösung der Zellen durchgeführt und die Zellen in einer Verdünnung von 1:6 in Zellkulturmedium weiter passagiert.

4.2 Virusvermehrung

4.2.1 Virusidentifizierung

Vor Einsatz der verschiedenen Virusisolate in den Tierversuchen wurde über MCP-Sequenzanalysen die Identität überprüft und bestätigt, um einen sicheren Nachweis zu gewährleisten. Hierzu wurde jeweils das MCP-Gen der entsprechenden Isolate mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (Tabelle 8). Die auf diese Weise ermittelte MCP-Gensequenz wurde mit bereits veröffentlichten Ranavirussequenzen verglichen.

Tabelle 9: Zur Virusidentifizierung verwendete Primer nach Hyatt et al. (2000)

PCR-Primer	PCR-Bezeichnung	PCR-Produkt (bp)	Sequenz-Primer
MCP 1	MCP 1	543	MCP 1
MCP 2R	MCP 1	543	MCP 2R
MCP 3	MCP 2	530	MCP 3
MCP 4R	MCP 2	530	MCP 4R
MCP 5	MCP 3	585	MCP 5
MCP 6R	MCP 3	585	MCP 6R

4.2.2 Virusvermehrung in der Zellkultur

Die Vermehrung der Ranaviren erfolgte in den Zelllinien CCLV Rie88 und Rie173. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in 75 cm² Gewebekulturflaschen kultiviert. Nach einmaliger Spülung des Zellrasens mit frischem Zellmedium erfolgte die Infektion der Zellen mit dem Virus, welches zuvor in Zellmedium verdünnt wurde. Für die Virusvermehrung wurde eine Infektionsmultiplizität (m.o.i., multiplicity of infection) von 0,1 - 1 gewählt. Anschließend erfolgte die Inkubation der virusinfizierten Zellen bei 20 °C in 2,5 % CO₂ Atmosphäre unter täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle bis zur Beobachtung eines vollständigen CPE.

4.2.3 Virusernte

Die Virusernte erfolgte nach vollständiger Zellyse, etwa drei bis fünf Tage nach Infektion. Zur Weiterverarbeitung wurde der Zellkulturüberstand durch niedertourige Zentrifugation (Tischzentrifuge Pico 21 Heraeus 3500 UpM, 5 min) bei Raumtemperatur (RT) geklärt. Zur Erfassung der jeweils erreichten Virustiter wurde gegebenenfalls eine anschließende Titration in der entsprechenden Zelllinie durchgeführt. Eine dauerhafte Lagerung der Viren erfolgte bei -70 °C.

4.2.4 Virustitration

Zur exakten Bestimmung der jeweils erreichten Konzentration infektiöser Partikel wurde die Virustitration in 96-well Platten (Corning Inc., USA) auf Zellen der Linien CCLV Rie173 bzw. CCLV Rie88 durchgeführt. Die Titration erfolgte in einer dezimalen Verdünnungsreihe der Virussuspension in Zellmedium. Die Anfangskonzentration betrug 10⁰ bzw. 10⁻¹. Die Inkubation der infizierten Zellen erfolgte entsprechend den Bedingungen der Virusvermehrung. Jede Titrationsreihe wurde in parallelen Ansätzen mindestens sechsmal durchgeführt. Die Auswertung des Virustiters wurde nach 10 Tagen vorgenommen und nach Spearman und Kaerber (Spearman, 1908; Kaerber, 1931) errechnet.

4.3 Isolierung viraler DNA

4.3.1 Isolierung viraler DNA aus Zellkulturüberstand

Für die Extraktion viraler DNA aus geklärtem Zellkulturüberstand wurden je nach Ausprägung des CPE 20 µl bei der Virusvermehrung bzw. 200 µl beim Versuch der Virusisolierung in den Tierversuchen verwendet. Zum Einsatz kam hierbei das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Die DNA-Extraktion erfolgte entsprechend den Herstellerangaben im Protokoll zur Gewinnung viraler DNA aus der Zellkultur. Hierzu wurde die entsprechende Menge des Zellkulturüberstandes gegebenenfalls mit PBS Puffer ad 200 µl resuspendiert. Zur Vermeidung im Gefäßdeckel verbliebener Tropfen wurde vor jedem erneuten Öffnen des Gefäßes ein kurzer Zentrifugationsschritt eingehalten, um die Kontaminationsgefahr zu minimieren. Dann erfolgte zunächst die Zugabe von 20 µl Proteinase K (Proteinase K solution 600 mAU / ml, Qiagen), sowie 4 µl RNase A (100 mg / ml, Qiagen). Nach gründlicher Durchmischung mit anschließender Inkubationszeit von 1 min folgte die Zugabe von 200 µl Puffer AL. Zur Homogenisierung und vollständigen Lyse wurde die Suspension 15 s mit Hilfe des Vortexers gemischt und anschließend für 10 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 230 µl 99,8 % Ethanol wurde die DNA präzipitiert. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortexer wurde die gesamte Probe auf die Säule (QIAamp Spin Column) gegeben. Nach Zentrifugation bei 8000 UpM für 1 min (Tischkühlzentrifuge 5417R Eppendorf) wurde der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Tube überführt. Die auf der Säule adsorbierte DNA wurde mit 500 µl Puffer AW1 bei 8000 UpM für 1 min und mit 500 µl Puffer AW2 bei 14.000 UpM für 3 min gewaschen. Zur Entfernung von Alkohorrückständen des Waschpuffers wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei 14.000 UpM für 1 min durchgeführt. Die DNA wurde durch die Zugabe von 60 µl Elutionspuffer AE und einer Inkubationszeit von 5 min bei RT durch einen letzten Zentrifugationsschritt bei 8000 UpM für 1 min von der Säule eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.3.2 Isolierung viraler DNA aus Organmaterial

Zur Gewinnung viraler DNA aus Organen (Herz, Kopfnieren, Leber, Milz, Kiemen) wurden diese mittels steriler chirurgischer Instrumente entnommen und mit Hilfe steriler Scheren fein zerkleinert. Entsprechend den Herstellerangaben wurden 25 mg des homogenisierten Materials unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) weiterverarbeitet. Zur Vermeidung im Gefäßdeckel verbliebener Tropfen wurde vor jedem erneuten Öffnen des Gefäßes ein kurzer Zentrifugationsschritt eingehalten, um die Kontaminationsgefahr zu minimieren. Die Extraktion der viralen DNA erfolgte nach dem DNA Mini Kit Tissue Protokoll. Zunächst erfolgte die Zugabe von 180 µl Puffer ATL sowie 20 µl Proteinase K (Proteinase K solution 600 mAU / ml, Qiagen). Zur gründlichen Durchmischung wurde die Suspension mit Hilfe des Vortexers 15 s gemischt. Es folgte eine Inkubationsphase bei 56 °C bis zur vollständigen Lyse des Organmaterials.

Die Lyse wurde durch regelmäßiges Vortexen der Suspension unterstützt. Enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 4 µl RNase A (100 mg / ml, Qiagen) mit anschließender Inkubation bei RT für 2 min minimiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer AL wurde die Suspension erneut mit Hilfe des Vortexers gründlich durchmischt und anschließend bei 70°C für 10 min inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl 99,8 % Ethanol wurde die DNA präzipitiert. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortexer wurde die gesamte Probe auf die Säule (QIAamp Spin Column) gegeben. Durch Zentrifugation bei 8000 UpM für 1 min (Tischkühlzentrifuge 5417R Eppendorf) wurde die präzipitierte DNA auf der Säule adsorbiert. Nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW1 wurde die DNA durch Zentrifugation bei 8000 UpM für 1 min gewaschen. Es folgte ein zweiter Waschschriff durch Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW2 und anschließender Zentrifugation bei 14.000 UpM für 3 min. Zur Entfernung enthaltener Alkoholreste wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei 14.000 UpM für 1 min durchgeführt. Durch Zugabe von 60 µl Elutionspuffer AE, Inkubation bei RT für 1 min und Zentrifugation der Probe bei 8000 UpM für 1 min wurde die DNA von der Säule eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.3.3 Isolierung viraler DNA aus Organüberstand

Zur Extraktion viraler DNA aus Organüberstand wurden zunächst die entsprechenden Organe (Herz, Kopfnieren, Leber, Milz, Kiemen) steril entnommen und mittels steriler Scheren fein zerkleinert. 300 mg des homogenisierten Organmaterials wurden in 1 ml Zellkulturmedium (ZB23) mit einem effektiven Enrofloxacingehalt von 0.01 % aufgenommen und mittels Vortexer gründlich durchmischt. Es folgte die Inkubation bei 10 °C über Nacht im Intervallschüttler mit 30-sekündigem Schütteln im Intervall von fünf Minuten. Nach Zentrifugation der Probe bei 3500 UpM für 5 min wurden 200 µl des Überstandes für die DNA Extraktion entnommen. Die Extraktion wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (Proteinase K solution 600 mAU / ml, Qiagen) und 4 µl RNase A (100 mg / ml, Qiagen) erfolgte eine gründliche Durchmischung mittels Vortexer mit anschließender Inkubation bei RT für 1 min. Zur Homogenisierung und vollständigen Lyse wurde die Suspension nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer AL für 15 s mit Hilfe des Vortexers gemischt und anschließend für 10 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von 230 µl 99,8 % Ethanol wurde die DNA präzipitiert. Nach gründlicher Durchmischung mittels Vortexer wurde die gesamte Probe auf die Säule (QIAamp Spin Column) gegeben. Nach Zentrifugation bei 8000 UpM für 1 min (Tischkühlzentrifuge 5417R Eppendorf) wurde der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Tube überführt. Die auf der Säule adsorbierte DNA wurde mit 500 µl Puffer AW1 bei 8000 UpM für 1 min und mit 500 µl Puffer AW2 bei 14.000 UpM für 3 min gewaschen. Zur Entfernung etwaiger Alkohorrückstände der Waschpuffer wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei 14.000 UpM für 1 min durchgeführt. Durch die Zugabe von 60 µl Elutionspuffer AE und einer Inkubationszeit von 5 min bei RT und einen letzten Zentrifugationsschritt bei 8000 UpM für 1 min wurde die DNA von der Säule eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.3.4 Isolierung von Plasmid DNA

Nach Transformation der Plasmid DNA wurden jeweils 4 ml LB/ Ampicillin Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1 – 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden 5 min bei 13.000 UpM pelletiert (Tischzentrifuge Pico 21). Die Plasmid DNA wurde aus dem Pellet unter Verwendung der Pufferlösungen (Qiagen Plasmid Buffer Set) isoliert. Dazu wurde das Pellet in 150 µl Resuspensionspuffer (Puffer 1) resuspendiert, sofort mit 150 µl Neutralisationspuffer (Puffer 2) vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde anschließend mit 150 µl Lysispuffer (Puffer 3) versetzt und nach gründlicher Durchmischung 10 -15 min bei RT inkubiert. Aggregierte Bestandteile des Lysates (chromosomale DNA, Proteine und hochmolekulare RNA) wurden für 5 min bei 13.000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde einer Phenol/ Chloroform Extraktion unterzogen. Dazu wurden 400 µl des Überstandes mit dem gleichen Volumen Phenol/ Chloroform (1:1 Gemisch) vermengt. Durch Zentrifugation bei 13.000 UpM für 5 min wurden die Phasen getrennt. 350 µl der oberen wässrigen Phase wurden vorsichtig entnommen und zur Fällung der enthaltenen Plasmid DNA in 1 ml 99,8 % Ethanol überführt. Nach Durchmischung und Inkubation für 5 min bei RT wurde die DNA bei 13.000 UpM für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 150 µl 70 % Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Unter Beobachtung des Pellets wurde der Überstand dekantiert, das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O und RNase A (50 µl/ ml) resuspendiert und bei 37 °C für 30 - 60 min inkubiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

4.4 Southernblot Analyse

Die Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente erfolgte durch Hybridisierung mit einem Oligonukleotid, das am 3' Ende mit Fluorescein-dUTP markiert war. Nach Adsorption eines Anti-Fluorescein-HRP Konjugates (HRP horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) erfolgte der Nachweis der gebundenen Peroxidase durch Chemilumineszenz. Die Hybridisierung wurde in Glasflaschen durchgeführt, die in einem Wärmeschrank mit einer Drehzahl von 6 UpM rotierten. Zur Identifizierung spezifischer DNA Fragmente wurde nach den Protokollen des Herstellers verfahren (Fa. Amersham Life Science, ECL 3' -ologolabelling and detection systems).

4.4.1 Fluorescein d-UTP Markierung von Oligonukleotiden

100 pmol eines Oligonukleotides wurden am 3'-Ende durch die terminale Transferase mit Fluorescein-dUTP nach Vorschrift des Herstellers (Fa. Amersham Life Science, ECL 3'-oligolabeling system) markiert und nach Absättigung der Nitrocellulose an die DNA hybridisiert.

4.4.2 Transfer von DNA auf Nitrocellulose

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA erfolgte eine Inkubation des Agarosegels unter leichtem Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur in 1M Kaliumhydroxid, dreimal für 15 min in 1M Tris-HCl (pH 7,5) und abschließend für 20 min in 6x SSC. Der Transfer der DNA auf die Nitrocellulose erfolgte als Kapillartransfer mit Laufpuffer (6x SSC) über Nacht (Sambrook et al., 1989). Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung (1200 μ J, UV Stratalinker 1800 Stratagene) kovalent an die Nitrocellulose gebunden.

4.4.3 Southernblot Hybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Nitrocellulose in der Hybridisierungslösung (5x SSC, 0.02 % SDS, 0.1 % Hybridisierungskomponente und 0.5 % Liquidblock (Amersham Life Science)) für 60 min bei RT inkubiert. Zur Hybridisierung wurde die HRP-markierte Sonde zum Hybridisierungsmix pipettiert und über Nacht bei 42 °C gleichmäßig bewegt. Unspezifische Bindungen wurden durch mehrfaches Waschen der Filter entfernt: zweimal 5 min RT in 5x SSC, 0.1 % (w/v) SDS, zweimal 15 min 45 °C in 1x SSC, 0.1% (w/v) SDS.

4.4.4 Nachweis spezifischer DNA Fragmente

Die gewaschene Nitrocellulose wurde für eine Minute bei RT in Puffer 1 (0.15 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5) inkubiert und anschließend in den Blockpuffer (5 % Liquid Block (Amersham Life Science) in Puffer 1) überführt. Die Absättigung noch vorhandener Bindungsstellen erfolgte unter leichtem Schütteln für 30 min bei RT. Der Blot wurde anschließend für 1 min bei RT erneut in Puffer 1 gewaschen. Zum Nachweis der spezifischen DNA-Bindungen wurde die Nitrocellulose in die Konjugatlösung (Anti-Fluorescein-Konjugat HRP in Puffer 2: 0.4 M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH7.5) überführt und für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch viermaliges Waschen (je 5 min) der Nitrocellulose in Puffer 2 entfernt. Der Nachweis der gebundenen Peroxidase erfolgte nach einminütiger Inkubation der Membran in der Detektionslösung (ECL, Amersham Life Science). Anschließend wurde der feuchte Blot in Haushaltsfolie eingeschlagen und mit Autoradiographiefilm in einer Röntgenfilmkassette exponiert.

4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des HotStarTaq Master Mix Kits (Qiagen). Das verwendete Protokoll wurde gemäß den Angaben des HotStarTaq PCR Handbuchs etabliert. In einem 25 µl Ansatz waren 12,5 µl HotStarTaq Master Mix, 9,5 µl steriles Wasser und jeweils 0,5 µl der spezifischen Primer (10 pmol/ µl), sowie 2 µl der entsprechenden DNA enthalten.

Die Amplifizierung von Genfragmenten mit einer Größe von weniger als 1000 bp erfolgte im Mastercycler gradient (Eppendorf) nach folgendem Protokoll: nach einem initiativen Aktivierungsschritt bei 95 °C für 15 min folgten 40 Amplifikationszyklen (Denaturierung bei 93 °C für 1 min, Annealing bei 55 °C für 2 min und Extension bei 72 °C für 0,5 min).

Genfragmente mit einer Größe von mehr als 1000 bp (PCR SCIV, PCR Perch β -Actin 3) wurden mit folgendem Cyclerprogramm amplifiziert: nach einem initiativen Aktivierungsschritt bei 95 °C für 15 min folgten 40 Amplifikationszyklen, bestehend aus den Phasen: Denaturierung bei 93 °C für 1 min, Annealing bei 55 °C für 1 min und Extension bei 72 °C für 3 min.

4.6 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Molekülen und Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden 0,7 - 1 % Agarosegele eingesetzt. Die erforderliche Menge Agarose wurde in 1 x TAE Puffer durch Aufkochen gelöst, mit 0,1 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt und auf den Gelträger gegossen. Nach dem Erkalten der Agarose wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (1 x TAE) überschichtet und die DNA aufgetragen. Dazu wurde die DNA mit Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 8 V/ cm Elektrodenabstand (Spannungsgerät PowerPac 300 BioRad, horizontales Gelelektrophoresesystem wide mini sub cell BioRad). Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten DNA-Moleküle unter langwelligem UV-Licht (360 nm) sichtbar gemacht.

4.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (360 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mittels QIAquick Gel Extraktionskit (QIAGEN) nach Herstellerangaben mit 15 µl Elutionspuffer und 15 µl sterilem Wasser eluiert.

4.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Vorschriften des Herstellers. Ausgehend von der zu spaltenden DNA und der Anzahl der vorhandenen Schnittstellen pro DNA-Molekül wurde die erforderliche Enzymmenge abgeleitet. Die zu spaltende DNA wurde mit je 1 Einheit Restriktionsenzym pro vorhandene Schnittstelle in geeignetem Spaltpuffer für 1 – 2 h bei 37 °C inkubiert. Abweichende Inkubationstemperaturen wurden auf besondere Empfehlung des Herstellers bei speziellen Restriktionsendonukleasen angewendet.

4.9 Klonierung

4.9.1 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung der Religation der Vektor DNA und der damit aufwendigen Selektion rekombinanter Vektoren wurde die Vektor DNA nach Restriktionsverdau dephosphoryliert. Zur Abspaltung der 5'-Phosphate wurden 5 µg des gespaltenen Vektors mit 25 µl 10 x CIP Puffer (Roche) und 1,5 µl CIP (20 U/ µl, Roche) in einem Gesamtvolumen von 250 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 1 µl CIP wurde die Reaktion für 30 min bei 56 °C fortgeführt. Durch Zugabe von 10 mM EGTA und 12 min Erhitzen bei 65 °C wurde die Reaktion gestoppt.

Zur Aufreinigung der dephosphorylierten DNA wurde der Ansatz nach Zugabe von 30 µl SDS (10 %) und 1 µl Proteinase K (20 mg/ ml, Qiagen) 30 min bei 56 °C inkubiert. Es folgte eine Phenol/ Chloroform-Extraktion und eine anschließende Ethanolfällung mit 1/10 Volumen 4 M LiCl. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8.5 resuspendiert.

4.9.2 Ligation

Die DNA wurde in 1 x Ligationspuffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 7 mM MgCl₂, 1 mM DTT) mit 1 Einheit T4 DNA Ligase und 10 mM ATP 12 h bei 16 °C inkubiert. Die molaren Verhältnisse von Insert zu Vektor betragen 2:1 für die gerichtete Klonierung überhängender Enden. Ligationen von DNA Fragmenten in den Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) erfolgten den Angaben des Herstellers entsprechend über Nacht bei 8 °C.

4.9.3 Plasmid-Transformation

Der Ligationsansatz wurde in 100 µl kompetente Zellen (*Escherichia coli*, DH10B) gegeben und 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeschock von 5 min bei 37 °C und einer Inkubation von 10 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 200 µl LB-Medium. Der Transformationsansatz wurde 0,5 - 1 h bei 37 °C leicht geschüttelt, anschließend auf einer Ampicillin haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.10 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde das Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Ein Sequenzansatz von 10 µl beinhaltete jeweils 2 µl Big Dye Ready Reaction Mix, 1 µl 5x Sequencing Puffer, 1 µl Primer (3 pmol/ µl) und die zu analysierende DNA (130 ng/ kb).

Die Amplifizierung erfolgte nach einem initialen Aktivierungsschritt von 1 min bei 96 °C in 30 Zyklen mit folgenden Parametern: Denaturierung bei 96 °C für 30 s, Annealing bei 65 °C 15 s, Elongation bei 60 °C für 1,5 min (PCR-Produkte) bzw. 3 min (Plasmid-DNA).

Nach Ablauf der Sequenzreaktion erfolgte die Aufreinigung des Ansatzes über eine Säule (SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns, Sigma-Aldrich) zur Entfernung nicht eingebauter fluoreszierender dNTPs. Nach vorheriger Zentrifugation der Säule für 3 min bei 3100 UpM wurde der gesamte Sequenzansatz mit 10 µl sterilem Wasser vorsichtig vermengt und auf die Säule gegeben. Durch erneute Zentrifugation bei 3100 UpM für 4 min wurde der gereinigte Ansatz in einem sterilen Gefäß aufgefangen, die Säule wurde verworfen.

Zur Denaturierung der Sequenzreaktion wurden 10 µl des gereinigten Ansatzes mit 10 µl Hi Di Formamide (Applied Biosystems) versetzt und anschließend im 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) elektrophoretisch aufgetrennt. Sequenzdaten wurden elektronisch übermittelt.

4.11 Sequenzanalysen

Zur eindeutigen Identifizierung wurden die entsprechenden Genomabschnitte in beiden Orientierungen vollständig sequenziert.

Die Sequenzanalysen wurden mittels Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems), GCG-X-Win32, v.11.1.3. UNIX (Accelrys Inc, San Diego, CA, USA) bearbeitet. Der Vergleich einzelner Sequenzdateien mit Sequenzdaten der internationalen Datenbank (GenBank) erfolgte unter Verwendung des Programmes NCBI BlastN. Analysen zur Homologie und Phylogenie wurden mit den entsprechenden Programmen Bestfit und Paupsearch der Software GCG-X-Win32, v.11.1.3. UNIX (Accelrys Inc.) durchgeführt.

Phylogramme wurden in Form einer Parsimony-Analyse in Paupsearch erstellt. Bei den an jeder Abzweigung angegebenen Zahlen handelt es sich um Bootstrap-Werte. Diese Bootstrap-Werte entsprechen Signifikanzniveaus, die die statistische Verlässlichkeit der jeweiligen Abzweigungen angeben. Es handelt sich dabei nicht um prozentuale Angaben einer Sequenzhomologie. Bootstrap-Werte über 90 stehen für eine hohe Signifikanz der Maximum-Parsimony-Stammbaumrekonstruktion. Die Bootstrap-Analysen wurden mit wenigstens 100 Replikationen durchgeführt.

4.12 Durchführung von Infektionsversuchen

4.12.1 Tierversuchsanzeige

Die Erlaubnis zur Durchführung der Infektionsversuche wurde unter dem Aktenzeichen LALLV M-V/TSD/7221.3-2.1.-023/06 beim Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt M/V dokumentiert.

4.12.2 Auswahl geeigneter Fische

4.12.2.1 Flussbarsch (*Perca fluviatilis*)

Es wurden Flussbarsche (*Perca fluviatilis*) zweier Betriebe in Deutschland und Schweden untersucht. Eine Stichprobe von je 20 Barschen wurde mittels Zellkultur und PCR bzw. RT-PCR auf Viren (Ranaviren, VHSV, IHNV, KHV) getestet. Die Barsche wurden außerdem patho-morphologisch untersucht. Die durchschnittlich 12 cm großen, 30 g schweren und ca. 1 Jahr alten deutschen Barsche einer geschlossenen Warmwasseranlage in Niedersachsen wurden für die Versuche ausgewählt. Diese Fische waren nachweislich frei von den oben genannten Erregern.

4.12.2.2 Europäischer Wels (*Silurus glanis*)

Europäische Welse (*Silurus glanis*) verschiedener deutscher Fischhälterungen wurden mittels Zellkulturanalyse und PCR bzw. RT-PCR auf die Abwesenheit von Viren (Ranaviren, VHSV, IHNV, KHV) und Bakterien (*Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*) untersucht. Die Wahl fiel auf eine virusfreie intensive Welszucht mit Warmwasserhaltung in Niedersachsen. Für die Versuche wurden Welse zwei verschiedener Altersklassen desselben Züchters verwendet. Die älteren Welse hatten eine Körperlänge von durchschnittlich 10 cm und ein durchschnittliches Gewicht von 17 g, während die juvenilen Welse eine Länge von etwa 2 cm und ein Gewicht von ca. 0,5 g aufwiesen.

4.12.3 Haltung und Fütterung

Die Fische wurden in einer Eingewöhnungszeit von etwa 2 Wochen an die neuen Haltungsbedingungen gewöhnt und schrittweise an die vorgeschriebene Versuchstemperatur angepasst. Die tägliche Fütterung erfolgte mit vom Züchter bezogenem handelsüblichen Wels- bzw. Barschfutter.

Während der Versuchsdauer wurden die Fische in 400 l Aquarien im Kreislauf gehalten. Es erfolgte ein täglicher Wasserwechsel von ca. 50 l.

4.12.4 Infektionsbedingungen

Für die Durchführung der Infektionsversuche mit den unterschiedlichen Ranaviren wurden die Fische zuvor in Gruppen unterteilt und in separaten Aquarien bei den entsprechenden Temperaturen (15/ 25 °C) gehältert. Die Gruppen wurden jeweils für eine Stunde mit einer Infektionsdosis von 10^4 TCID₅₀ / ml im Infektionsbad den Erregern ausgesetzt. Pro Versuchsdurchgang wurde eine Versuchsgruppe als Negativkontrolle unter den gleichen Bedingungen gehalten. Die Anzahl der Fische je Versuchsgruppe ist in den Tabellen 17, 18, 21, 23 und 25 dokumentiert.

Die Fische wurden für die Dauer des Versuchs täglich beobachtet, und Auffälligkeiten wie das Auftreten von Krankheitssymptomen und die Anzahl verendeter Individuen wurden dokumentiert. 28 Tage nach der Infektion wurden die Versuche beendet und die verbliebenen Fische im Bad mit Benzocain (10 ml/l) euthanasiert.

4.12.5 Probennahme

Verendete Fische wurden für weitere Untersuchungen bei -20 °C eingefroren. Im Barschversuch bei 25 °C wurden an Tag 6 nach der Infektion je zwei Fische pro Gruppe getötet und für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren.

Die nach Beendigung des Versuches euthanisierten Fische wurden ebenfalls zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert.

4.12.6 Aufarbeitung der Fische

Die verendeten oder euthanisierten Fische wurden patho-morphologisch untersucht und sichtbare Veränderungen dokumentiert. Die weitere Verarbeitung wurde von Größe und Gewicht der zu untersuchenden Fische abhängig gemacht. Von Fischen mit einer Körperlänge von etwa 15 cm wurden die inneren Organe (Herz, Leber, Niere, Milz) einzeln entnommen. Bei mittelgroßen Fischen wurde das gesamte Organkonvolut entnommen, und bei den juvenilen Welsen wurden Kopf und Schwanz entfernt und der gesamte Rumpf weiterverarbeitet. Das entnommene Gewebe wurde mit einer sterilen Schere fein zerkleinert und entsprechende Mengen zur Virusisolierung bzw. DNA-Extraktion abgenommen und der Rest der jeweiligen Probe als Reserve bei -70 °C gelagert.

Verendete Fische wurden einzeln verarbeitet und untersucht. Von Versuchsgruppen, die keine Anzeichen einer Erkrankung zeigten, wurden die Organe von je fünf Fischen zu einer Probe gepoolt. Nicht benötigtes Organmaterial wurde für jeden Fisch einzeln bei -70 °C gelagert, um im Falle positiver PCR- oder Virusisolierungsergebnisse die Proben einzeln weiter aufarbeiten zu können.

5 Ergebnisse

5.1 Virusvermehrung

Alle analysierten Ranaviren können in der Gewebekultur unter Ausbildung eines zytopathogenen Effektes (CPE) vermehrt werden. Für die Vermehrung wurden die Zelllinien CCLV Rie173 bzw. Rie88 verwendet. Nach vollständigem CPE wurde ein Virustiter von mindestens $10^{5.5}$ (GV6) bis maximal $10^{8.25}$ (ESV) TCID₅₀/ ml im Zellkulturüberstand erreicht. In der Regel ließ sich durch Vermehrung der Ranaviren auf Zellen der Linie CCLV Rie88 ein höherer Titer erzielen als nach Anzucht auf Zellen der Linie CCLV Rie173.

Unterschiede wurden in der Zellmorphologie nach Virusinfektion beobachtet. EHNV, ESV, ECV, PPIV, REV, SERV, FV3, BIV und RTRV verursachen bereits einen Tag nach der Infektion fokale Zellveränderungen, die mit fortschreitender Infektion zur Plaquebildung führen. Am 2. bis 3. Tag nach der Infektion wies der Zellrasen eine netzartige Struktur auf. Die vollständige Lyse wurde bei diesen Erregern 3 bis 4 Tage nach der Infektion beobachtet (Abb. 2 und 4).

Bei gleicher Infektionsdosis führten die Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV erst nach 3 bis 4 Tagen nach der Infektion zu einer Ablösung virusinfizierter Zellen. Die vollständige Lyse infizierter Zellen wurde 6 bis 9 Tage nach Infektion beobachtet. Die Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV verursachen in der Zellkultur keine Plaquebildung (Abb. 3 und 5).

Die ermittelten Virustiter nach Vermehrung in der Zellkultur sind in Tabelle 10 dargestellt.

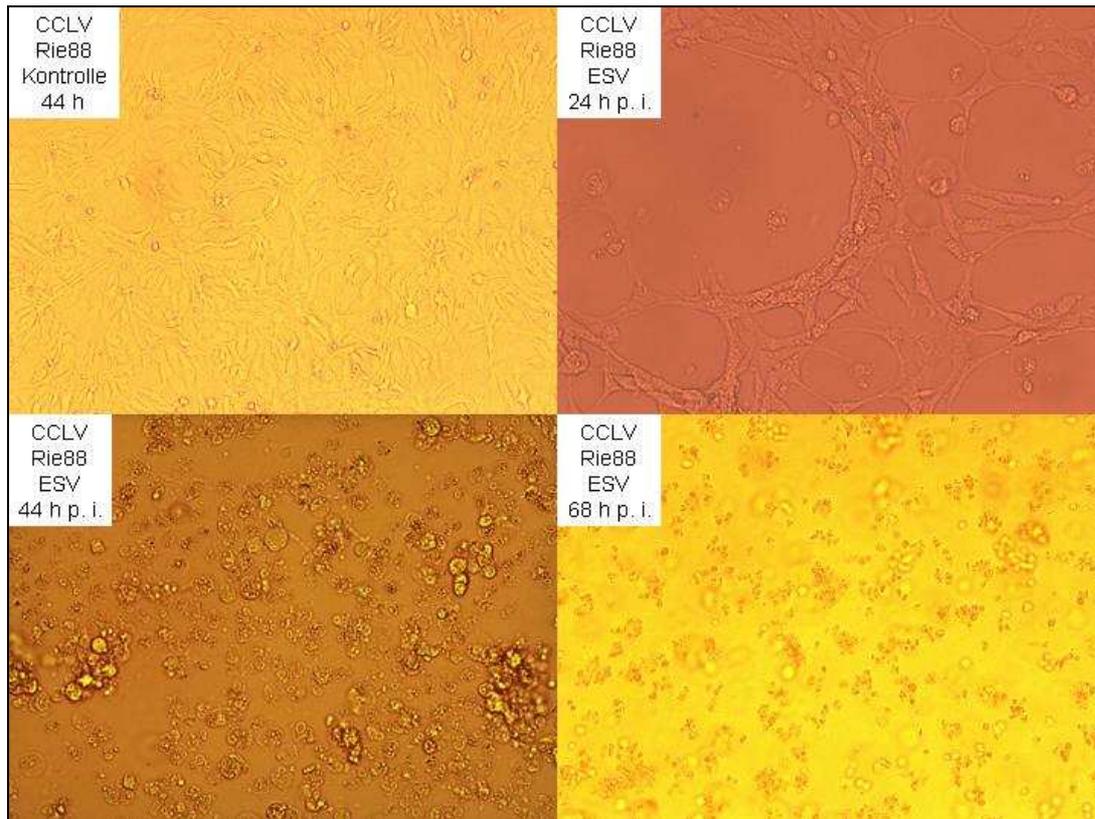


Abbildung 2: CCLV Rie88-Zellen nach Infektion mit ESV

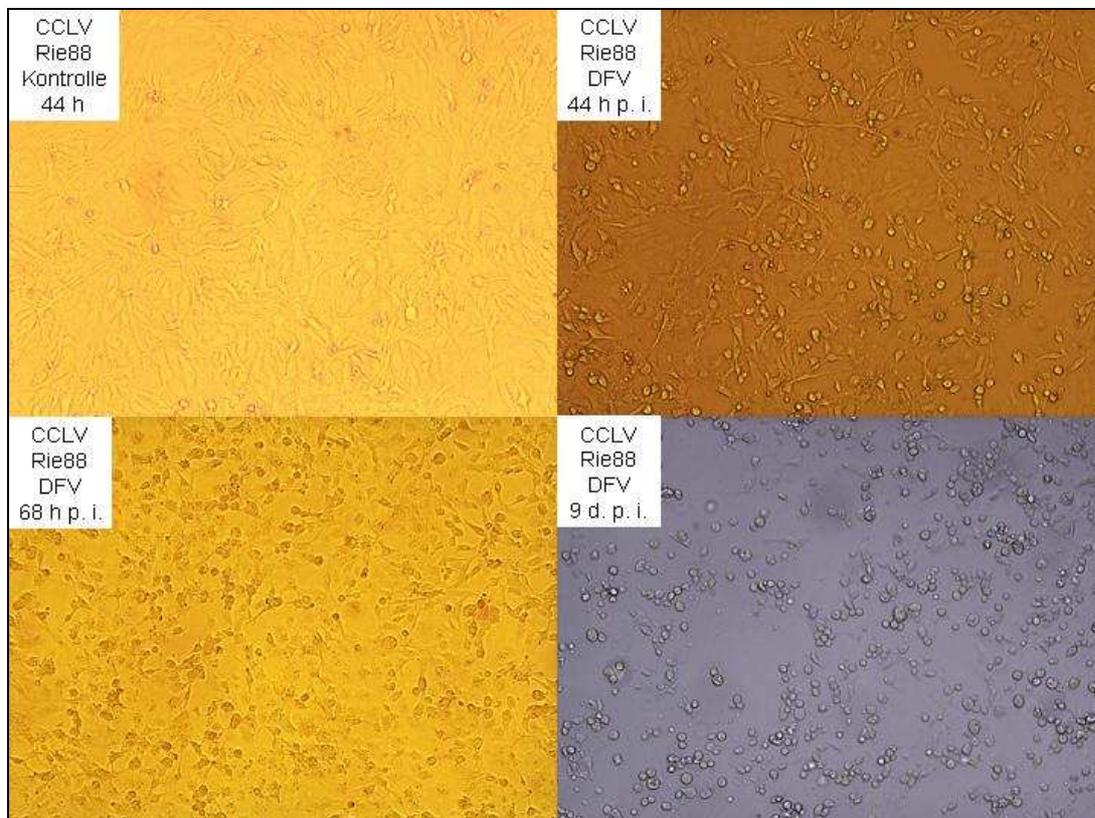


Abbildung 3: CCLV Rie88-Zellen nach Infektion mit DFV

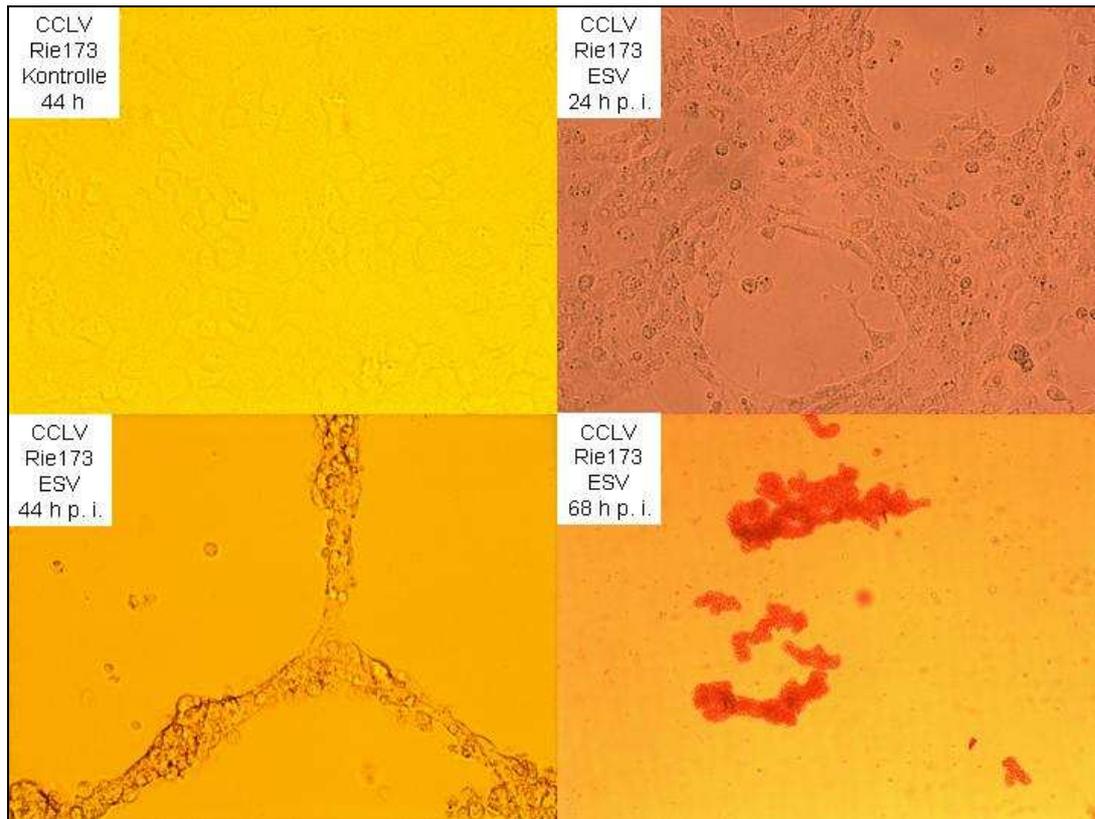


Abbildung 4: CCLV Rie173-Zellen nach Infektion mit ESV

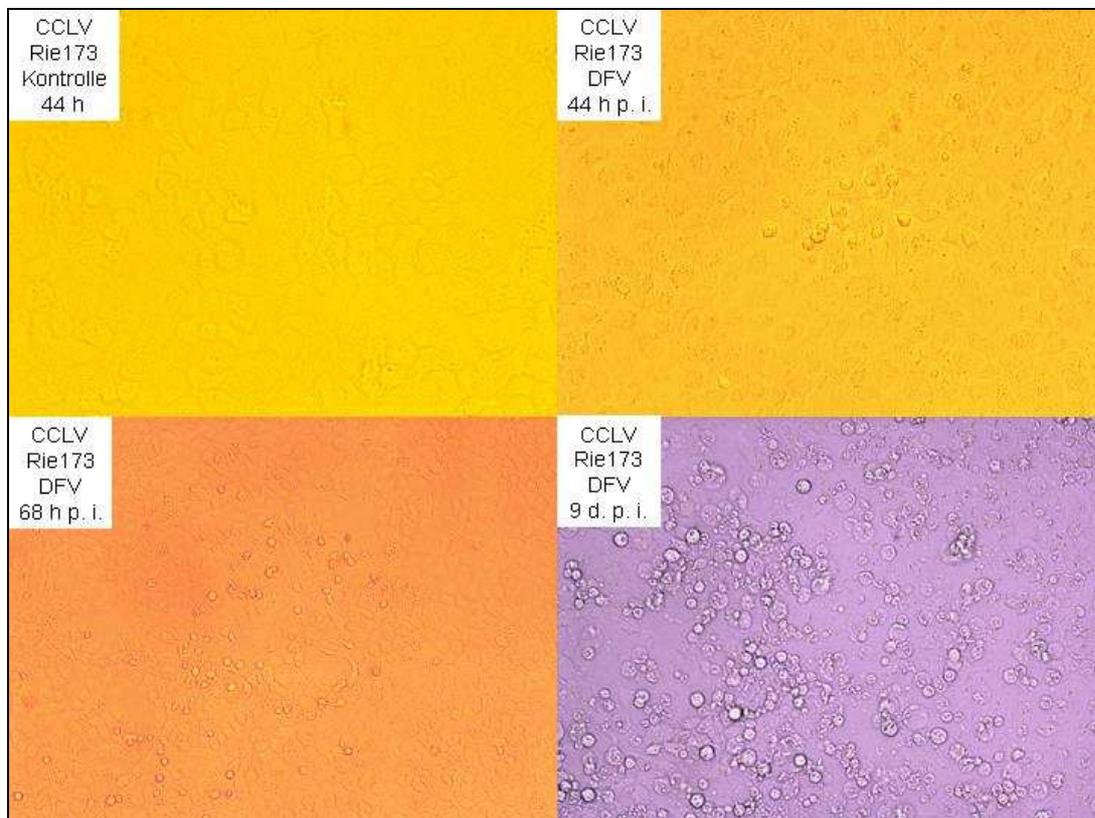


Abbildung 5: CCLV Rie173-Zellen nach Infektion mit DFV

Tabelle 10: Virustiter (in TCID₅₀/ ml)

Virus	Titer in CCLV Rie173-Zellen	Titer in CCLV Rie88-Zellen
EHNV	$10^{7,625}$	$10^{7,875}$
ESV	$10^{8,25}$	$10^{7,5}$
ECV	$10^{6,875}$	10^7
ECV-24	$10^{7,875}$	$10^{7,75}$
SERV	$10^{6,125}$	$10^{7,125}$
FV3	$10^{6,625}$	$10^{6,625}$
PPIV	$10^{6,625}$	$10^{7,5}$
BIV	$10^{7,75}$	10^8
RTRV	$10^{6,625}$	$10^{6,75}$
REV	10^7	$10^{7,5}$
GV6	$10^{5,5}$	$10^{7,375}$
DFV	$10^{6,625}$	$10^{7,875}$

5.2 Molekularbiologische Ergebnisse

5.2.1 Nachweis von Ranavirus-DNA mittels PCR

Um eine eindeutige Auswertung der Infektionsversuche zu gewährleisten, war zunächst die Etablierung einer zuverlässigen Methode zum Nachweis des Ranavirusgenoms aus virusinfiziertem Zellkultur- und Organmaterial erforderlich. Dazu wurde das MCP-Gen aller verwendeten Ranaviren identifiziert und charakterisiert.

Die Anwendung bekannter Primersequenzen (MCP 1, 2R, 3, 4R, 5, 6R, Hyatt et al., 2000) ermöglichte die Amplifikation des MCP-Gens in drei sich überlappenden Fragmenten (Abb. 6). Das Fragment MCP 1 wurde durch Kombination der Primer MCP 1 und 2R amplifiziert, die erwartete Größe des PCR Produktes entsprach 543 bp. Die Amplifikation der MCP Fragmente 2 und 3 durch Kombination der Primer MCP 3 und 4R bzw. 5 und 6R ließ eine Produktgröße von 530 bp (MCP 2) bzw. 585 bp (MCP 3) erwarten. Für die Ranaviren EHNV, ESV, ECV, PPIV, REV, SERV, FV3, BIV und RTRV wurden die entsprechenden PCR-Produkte bestätigt (Abb. 7). Eine Identifizierung dieser Viren als Ranaviren ist durch Anwendung dieser PCR-Methode möglich. Eine Differenzierung der genannten Viren ist nur nach Sequenzierung des MCP-Gens möglich.

Die Amplifizierung der entsprechenden MCP-Fragmente der Santee-Cooper Ranaviren DFV und GV6 mit den genannten Primern ist nicht zuverlässig möglich. Während die Anwendung der Primer MCP 1 & 2R bzw. 5 & 6R zu negativen PCR Ergebnissen führte, konnte durch Kombination der Primer MCP 3 & 4R sporadisch ein schwaches PCR-Produkt von ca. 750 bp erzeugt werden. Entgegen den Erwartungen ist somit eine Identifizierung der Santee-Cooper Ranaviren GV6 und DFV durch Amplifikation des MCP-Gens mit den genannten Primern nach Hyatt et al. (2000) nicht erfolgreich.

Durch die Verwendung neuer Oligonukleotide (MCP 2A rev, 3A for, 4A rev, 5A for und 6A rev) wurde eine größere Überlappung der drei Genfragmente erzielt, wodurch die Sequenzanalyse erleichtert und verbessert wurde (Abb. 6). Für das durch Kombination der Primer MCP 1 (Hyatt et al., 2000) & MCP 2A rev amplifizierte DNA Fragment MCP 1A wurde eine Größe von 591 bp erwartet. Das durch Kombination der Primer MCP 3A for & 4A rev erzeugte PCR Produkt MCP 2A hatte eine erwartete Größe von 750 bp. Für das Gen-Fragment MCP 3A wurde entsprechend der verwendeten Primer MCP 5A for & 6A rev ein PCR-Produkt von 611 bp erwartet. Für die Ranaviren EHNV, ESV, ECV, PPIV, REV, SERV, FV3, BIV und RTRV wurden die Produktgrößen der jeweiligen MCP-Genfragmente bestätigt (Abb. 8). Jedoch war auch mit diesen Primern eine Amplifikation des MCP-Gens der Santee-Cooper Ranaviren nicht möglich.

Als Methode der Wahl zur Amplifikation des MCP-Gens von EHNV, ESV, ECV, PPIV, FV3, BIV, SERV, RTRV und REV erwiesen sich zunächst die Primerkombinationen MCP 1 & MCP 2A rev, MCP 3A for & MCP 4A rev und MCP 5 & MCP 6R als erfolgreich, da in dieser Kombination jeweils ein deutliches PCR Produkt (MCP 1A, MCP 2A und MCP 3) erzielt wurde und die Fragmentüberlappung zufriedenstellend war.

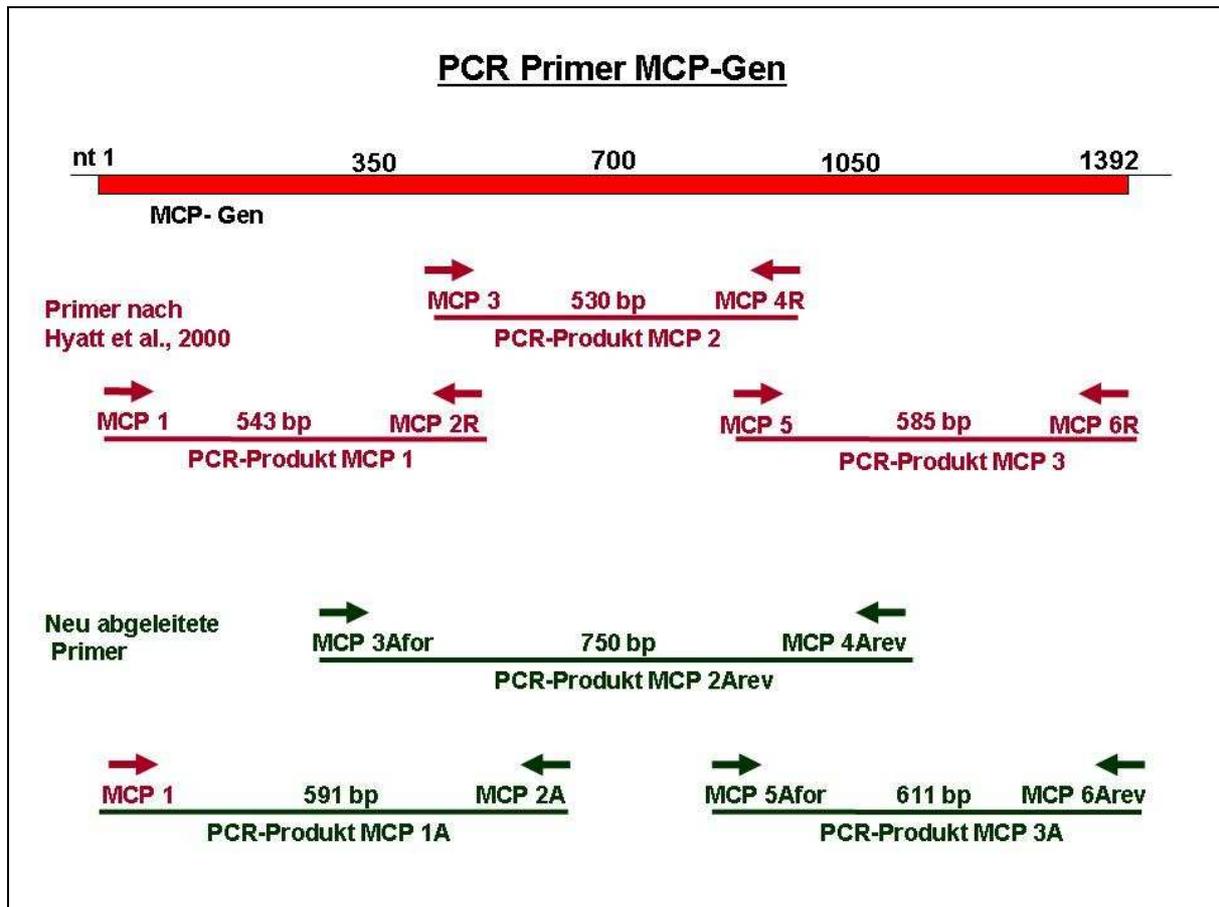


Abbildung 6: Primerpositionen zur Amplifikation des MCP-Gens

Schematische Darstellung des MCP-Gens und entsprechender Primerpositionen zur Amplifikation der abgebildeten MCP-Genabschnitte. Von Hyatt et al. (2000) übernommene Primer und PCR-Produkte sind in roter Schrift dargestellt, neu abgeleitete Primer und deren Produkte in schwarzer Schrift.

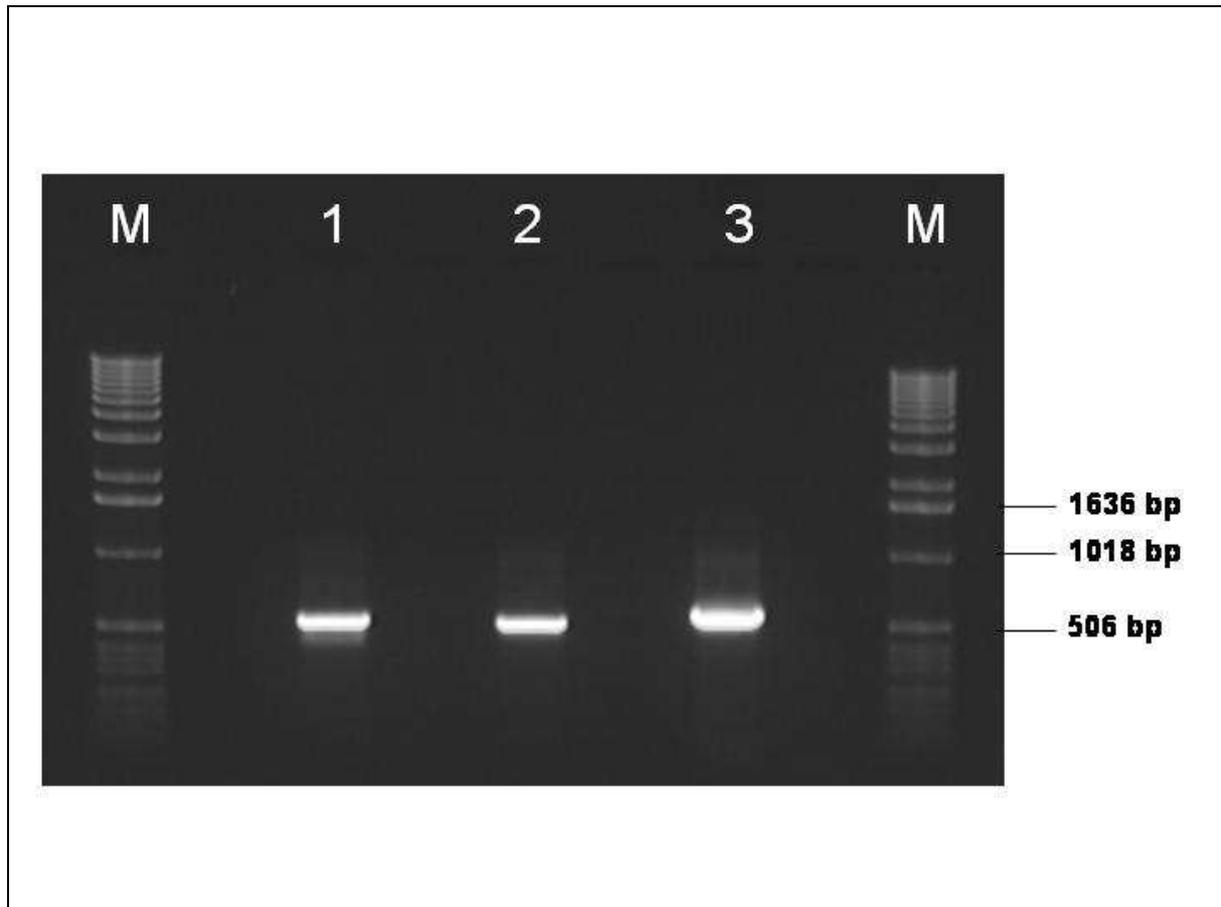


Abbildung 7: PCR MCP 1, 2 und 3 (Primer nach Hyatt et al., 2000)

ESV PCR-Produkte nach Amplifikation mit den Primern MCP 1 & 2R (PCR-Produkt MCP 1, 543 bp, Nr. 1); MCP 3 & 4R (PCR-Produkt MCP 2, 530 bp, Nr. 2) und MCP 5 & 6R (PCR-Produkt MCP 3, 585 bp, Nr. 3).

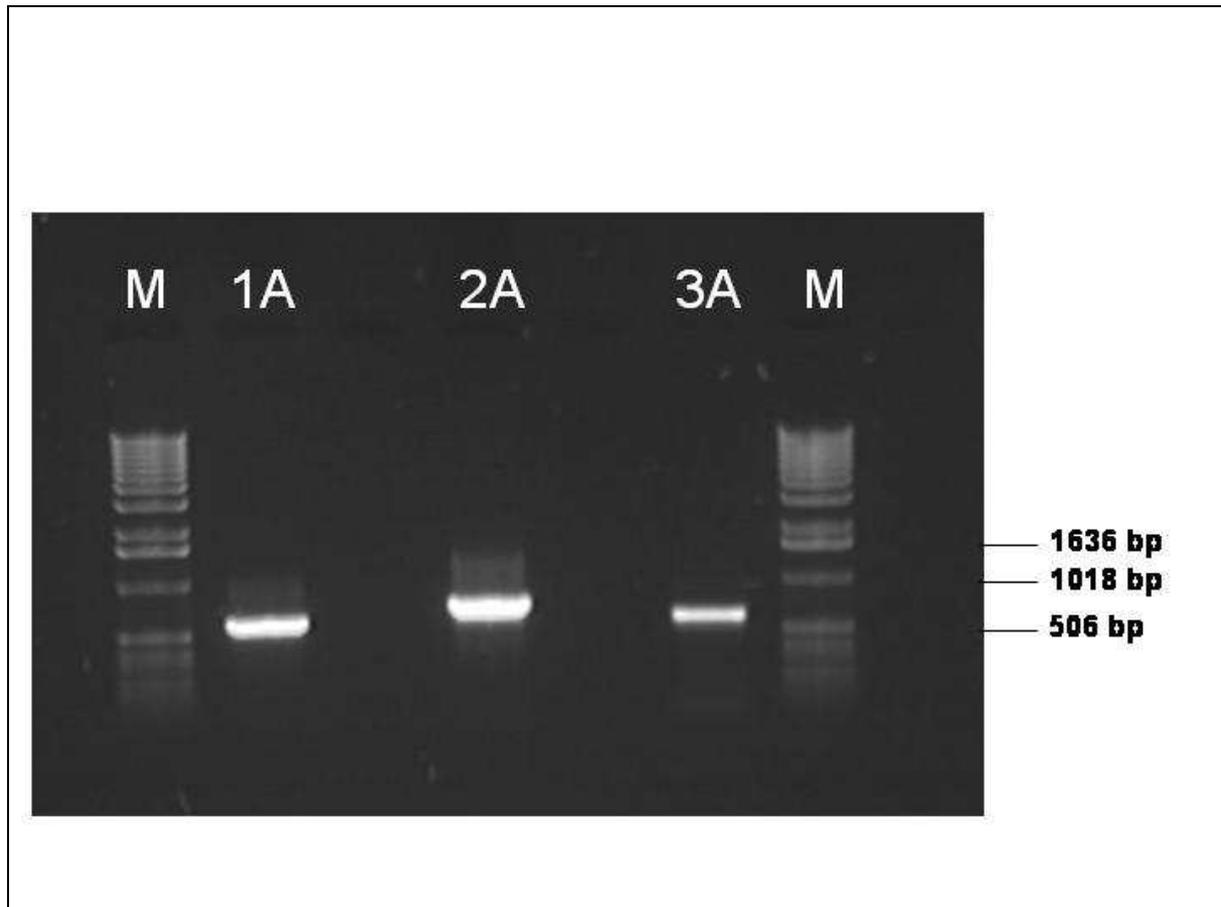


Abbildung 8: PCR MCP 1A, 2A und 3A

ESV PCR-Produkte nach Amplifikation mit den Primern MCP 1 (nach Hyatt et al., 2000) & 2A rev (PCR-Produkt MCP 1A, 591 bp, Nr. 1A); MCP 3A for & 4A rev (PCR-Produkt MCP 2A, 750 bp, Nr. 2A) und MCP 5A for & 6A rev (PCR-Produkt MCP 3A, 611 bp, Nr. 3A).

5.3 Sequenzanalyse des MCP-Gens von EHNV, BIV, ECV, ESV, FV3, PPIV, REV, SERV und RTRV

Die Ranaviren EHNV, BIV, ECV, ESV, FV3, PPIV, REV und RTRV zeigen innerhalb des MCP-Gens eine sehr hohe Homologie. Die kodierende Sequenz weist eine Länge von 1392 bp auf. Die Identität der Nukleotidsequenz beträgt 100 % (ECV x ESV) bis 97,055 % (BIV x ECV/ ESV) . Die Analyse des MCP-Gens bestätigt die sehr enge genetische Verwandtschaft dieser Erreger (Tab.11). Bei den MCP-Gensequenzen von PPIV, REV und SERV handelt es sich um erstmals veröffentlichte und somit neue Sequenzdaten, während entsprechende Sequenzen von EHNV, BIV, FV3 und RTRV bereits in der Datenbank vorhanden sind. Die in der Datenbank publizierten Sequenzabschnitte des MCP-Gens (MCP nt 900-1392) von ESV (GenBank AF157679) und ECV (GenBank AF157659) sind 100 % identisch. Die ermittelten Sequenzen des gesamten MCP-Gens des ECV und ESV bestätigen die 100 % Homologie. Ein Vergleich der identifizierten Nukleotidsequenzen mit den publizierten Daten (Hyatt et al., 2000; AF157679, AF157659) des ESV/ ECV ergab jeweils eine Homologie von 99,4 %, d. h., es ist eine Abweichung in Form von jeweils drei Nukleotidaustauschen zu verzeichnen. Diese Substitutionen führen jedoch nicht zu einer Veränderung der entsprechenden Aminosäure.

Die ermittelten Nukleotidsequenzen von EHNV, FV3 und RTRV stimmen mit den bereits veröffentlichten Sequenzdaten (AY187045, AY548484 und AY033630) jeweils zu 100 % überein. Im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz (AY187046) weist die MCP Nukleotidsequenz des analysierten BIV Isolates an Position 20 einen Nukleotidaustausch von Thymin zu Cytosin auf. Dieser führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Serin.

Die Nukleotidsequenzen kodierend für das MCP-Gen von FV3, BIV, PPIV, REV, SERV, ESV und ECV sind in der internationalen Datenbank unter den Nummern FJ459783, FJ358613, FJ358610, FJ358611, FJ358612, FJ358609 und FJ358608 registriert (Holopainen et al., 2009). Eine Zwischenstellung nimmt das SERV ein, welches eine MCP-Homologie von 94 - 95,7 % im Vergleich zu EHNV, ESV/ ECV, BIV, FV3, PPIV, REV und RTRV aufweist. ESV und ECV sind in ihrer MCP-Gensequenz identisch und somit durch PCR- und nachfolgende Sequenzanalysen des MCP-Gens nicht zu unterscheiden. Alle anderen genannten Ranaviren lassen sich anhand der MCP Nukleotidsequenz eindeutig identifizieren. Für die Analyse des gesamten MCP-Gens ist jedoch die Amplifizierung und Sequenzierung in drei Fragmenten notwendig.

Tabelle 11: Identität der Nukleotidsequenz (in %) des MCP-Gens (1392 bp)

	FV3	EHNV	BIV	ESV	ECV	PPIV	REV	RTRV
EHNV	97.773							
BIV	98.779	97.845						
ESV	97.270	98.922	97.055					
ECV	97.270	98.922	97.055	100				
PPIV	98.276	98.635	98.204	97.989	97.989			
REV	98.348	98.851	98.420	98.204	98.204	99.353		
RTRV	98.563	97.773	98.491	97.126	97.126	98.276	98.348	
SERV	94.109	95.259	93.966	95.690	95.690	94.397	94.540	93.894

Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um Prozentwerte. Es wurde jeweils die 1392 bp umfassende MCP-Gensequenz zweier Viren unter Verwendung des Programmes NCBI blast2sequences miteinander verglichen. Der Homologiewert resultiert aus dem Quotienten übereinstimmender Nukleotide/ Gesamtzahl der Nukleotide (1392 nt).

5.4 Identifizierung von Ranaviren mit der PCR MCP 2A und die Differenzierung nach Restriktionsendonukleaseverdau

Um einen effektiven Nachweis der Ranaviren in den Tierversuchen zu ermöglichen, wurden die Sequenzdaten der einzelnen amplifizierten MCP-Genfragmente verglichen und entsprechende Spaltmuster untersucht. Ziel war die Beschränkung der Analysen auf ein einzelnes MCP-Fragment zur eindeutigen Differenzierung der Ranaviren ohne den Aufwand der Sequenzierung. Hierbei wies das DNA-Fragment MCP 2A einen besonderen Vorteil auf, da durch Spaltung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen eine weitgehende Differenzierung der Ranaviren ermöglicht wird.

Die molekularbiologischen Ergebnisse dienten durch die Etablierung der PCR MCP 2A als Grundlage für die Auswertung der im Rahmen des Projektes durchgeführten Infektionsversuche. Dabei konzentrierten sich die Analysen zunächst auf die Viren EHNV, ESV/ ECV, BIV, FV3, REV, PPIV, RTRV sowie SERV, da sich die Amplifizierung des MCP-Gens dieser Viren als problemlos erwies.

Das PCR-Produkt MCP 2A hat jeweils eine Größe von 750 bp (Abb. 9). Amplifiziert wurden alle analysierten Ranaviren mit Ausnahme der Santee-Cooper Ranaviren GV6, DFV und LMBV. Basierend auf den ermittelten Nukleotidsequenzen ist eine Differenzierung verschiedener Ranaviren nach Restriktionsendonukleaseverdau des MCP 2A PCR-Produktes möglich. In Tabelle 12 sind die Restriktionsendonukleasen (*BamH I*, *Sal I*, *Hae II* und *Xho I*) mit den entsprechenden Spaltprodukten des MCP-Genbereiches von Nukleotid 354 bis 1103 zusammengefasst.

Tabelle 12: Spaltanalyse PCR MCP 2A

Virus	<i>BamH I</i>	<i>Hae II</i>	<i>Sal I</i>	<i>Xho I</i>
EHNV	670+80	24+63+663	635+115	356+394
BIV	670+80	24+63+663	750	750
ESV/ ECV	670+80	24+726	750	356+394
PPIV	670+80	24+63+663	750	356+394
FV3	750	24+63+663	750	750
REV	670+80	24+63+663	750	356+394
RTRV	670+80	24+63+663	750	750
SERV	750	24+63+138+525	668+82	356+394

Aufgeführt sind die Spaltprodukte in Anzahl der Basenpaare, die nach Spaltung des MCP 2A PCR-Produktes mit den abgebildeten Restriktionsendonukleasen entstehen. Farblich unterlegt sind Spaltmuster, die eine eindeutige Identifizierung des jeweiligen Ranavirus erlauben.

Die kalkulierten Spaltprodukte wurden nach Restriktionsendonukleaseverdau der entsprechenden MCP 2A PCR-Produkte und anschließender elektrophoretischer Trennung im Agarosegel bestätigt. Die Restriktionsanalyse des PCR-Produktes MCP 2A durch Kombination der Enzyme *Bam* HI, *Hae* II, *Sal* I und *Xho* I ermöglicht die schnelle und eindeutige Identifizierung der Viren EHNV, ESV/ ECV, FV3 und SERV. Die Viren BIV und RTRV sind aufgrund ihres identischen Spaltmusters nicht zu unterscheiden, jedoch ist eine Abgrenzung von den restlichen Viren möglich. Gleiches gilt für die Erreger PPIV und REV. Zur weiteren Differenzierung muss die Sequenzierung des PCR-Produktes hinzugezogen werden.

In den folgenden Abbildungen sind die Spaltanalysen des MCP 2A PCR-Produktes mit den Restriktionsendonukleasen *Bam* HI, *Hae* II, *Sal* I und *Xho* I dargestellt.

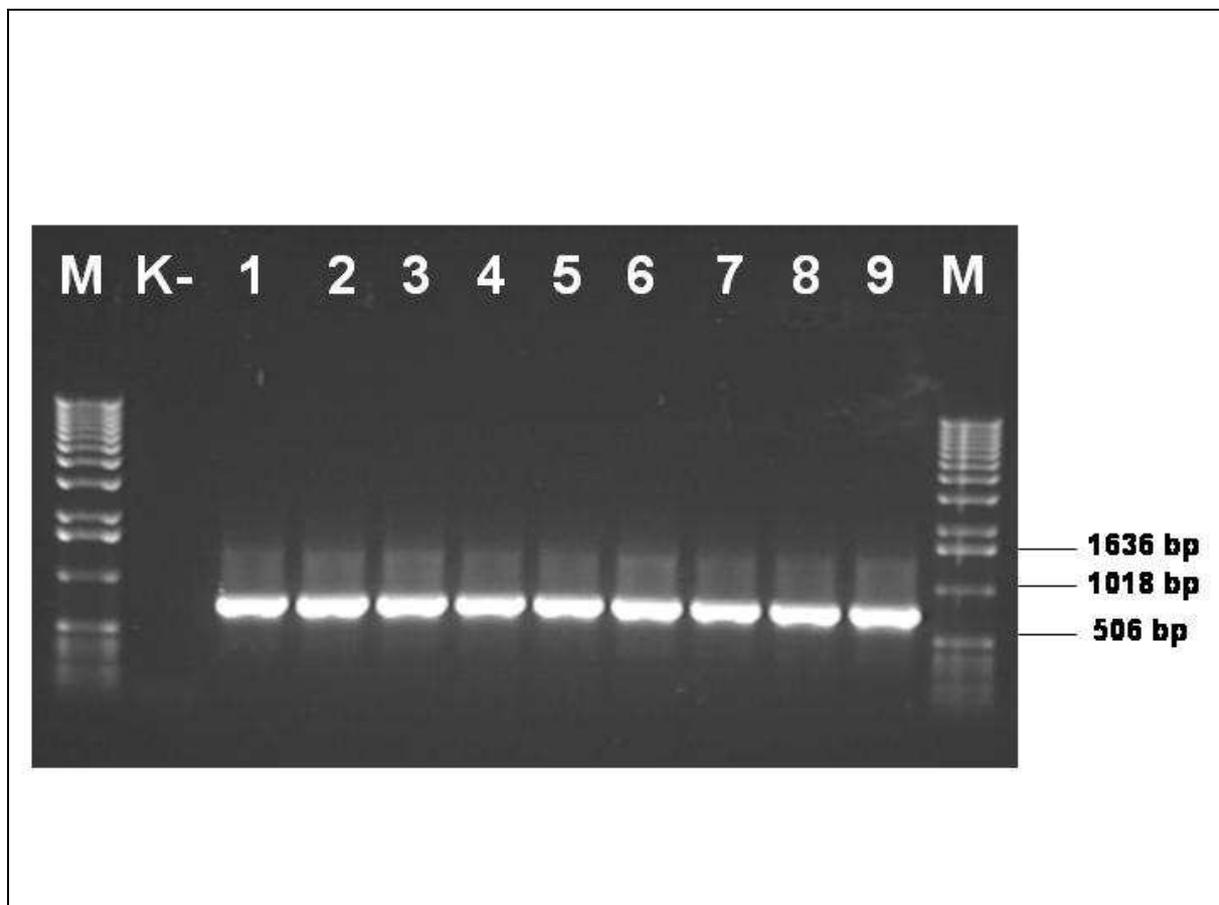


Abbildung 9: PCR MCP 2A

PCR-Produkt MCP 2A (750 bp) des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), PPIV (Nr. 4), FV3 (Nr. 5), REV (Nr. 6), RTRV (Nr. 7), SERV (Nr. 8) und ECV (Nr. 9) nach Amplifikation mit den Primern MCP 3A for & 4a rev. Bei der Negativkontrolle (K-) handelt es sich um eine Wasserkontrolle.

5.4.1 Spaltmuster *BamH* I

Die Spaltung des MCP 2A PCR-Produkts mit *BamH* I ergibt folgendes Spaltmuster: das PCR-Produkt von EHNV, BIV, ESV, ECV, PPIV, REV und RTRV wird in zwei Fragmente gespalten (670/ 80 bp), das von FV3 sowie SERV bleibt ungespalten (Abb. 10).

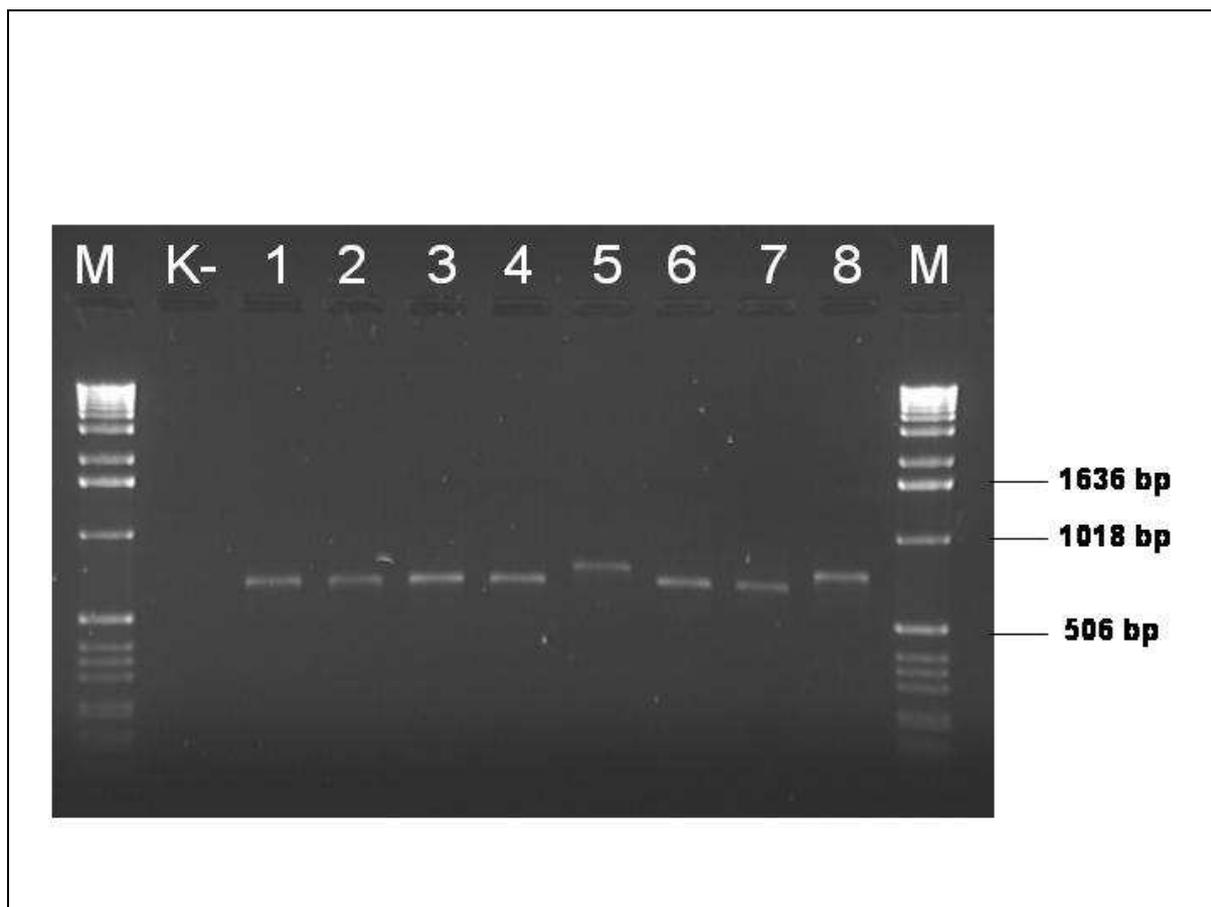


Abbildung 10: Spaltmuster PCR-Produkt MCP 2A gespalten mit *BamH* I

Abgebildet sind die MCP 2A PCR-Produkte des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), PPIV (Nr. 4), FV3 (Nr. 5), REV (Nr. 6), RTRV (Nr. 7) und SERV (Nr. 8) nach Spaltung mit *BamH* I. Bei der Negativkontrolle (K-) handelt es sich um eine Wasserkontrolle.

5.4.2 Spaltmuster *Sa*/I

Durch Spaltung des PCR-Produkts MCP 2A mit *Sa*/I können die Viren EHNV und SERV von den restlichen Viren differenziert werden. Das MCP 2A PCR-Produkt von EHNV wird in die Fragmente 635/115 nt gespalten, das PCR-Produkt von SERV in 668/ 82 nt. Die restlichen Viren weisen keine Spaltstelle in diesem Genabschnitt auf (Abb. 11).

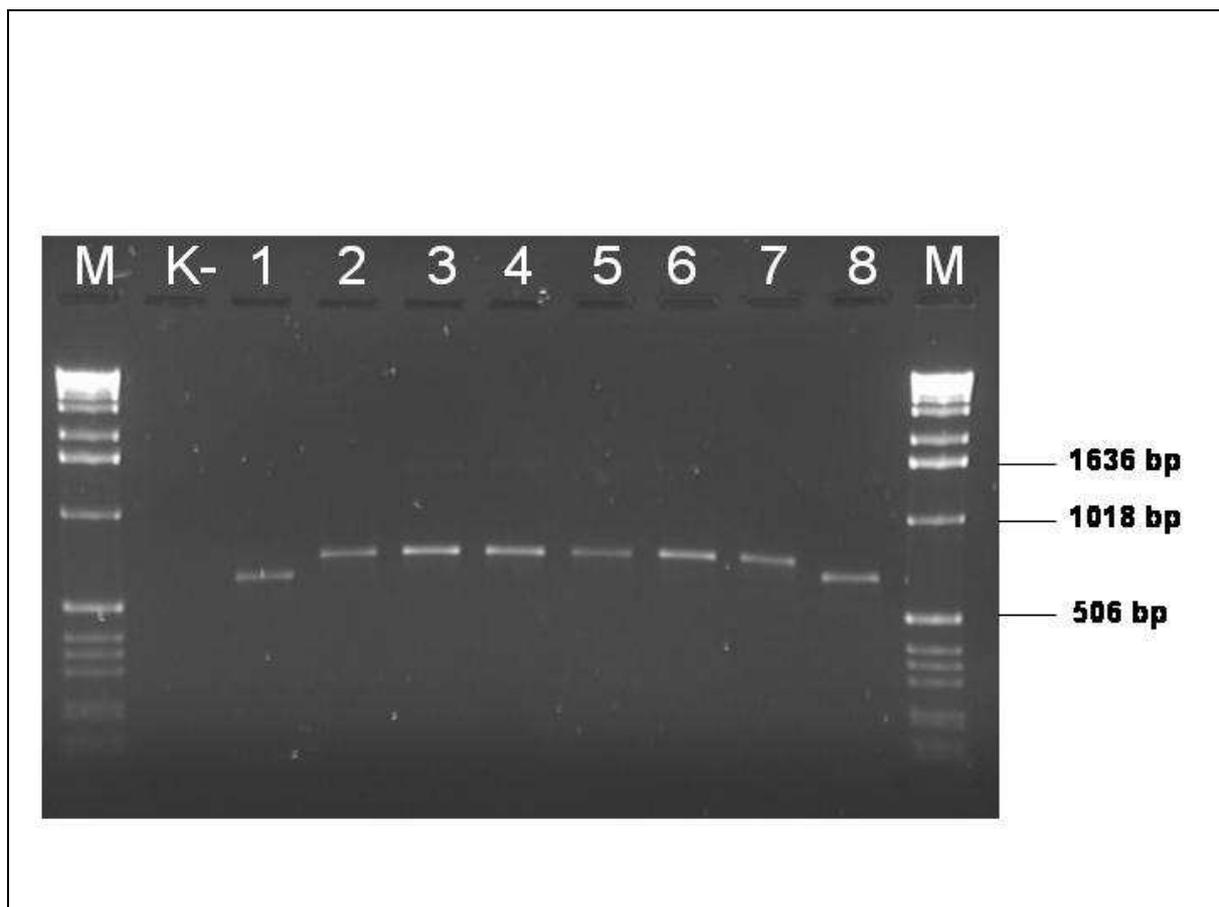


Abbildung 11: Spaltmuster PCR-Produkt MCP 2A gespalten mit *Sa*/I

Abgebildet sind die MCP 2A PCR-Produkte des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), PPIV (Nr. 4), FV3 (Nr. 5), REV (Nr. 6), RTRV (Nr. 7) und SERV (Nr. 8) nach Spaltung mit *Sa*/I. Bei der Negativkontrolle (K-) handelt es sich um eine Wasserkontrolle.

5.4.3 Spaltmuster *Hae* II

Die Spaltung mit *Hae* II ermöglicht die Identifizierung der Viren ESV/ ECV und SERV (Abb. 12). Das 750 nt große MCP 2A PCR-Produkt von EHNV, BIV, PPIV, FV3, REV und RTRV wird durch *Hae* II in drei Fragmente (663/ 63/ 24 nt) gespalten (Abb. 12). Im Gegensatz dazu wird das PCR-Produkt von ESV/ ECV in zwei Fragmente der Größe 726/ 24 nt gespalten, das von SERV in vier Fragmente (525/ 138/ 63/ 24 nt).

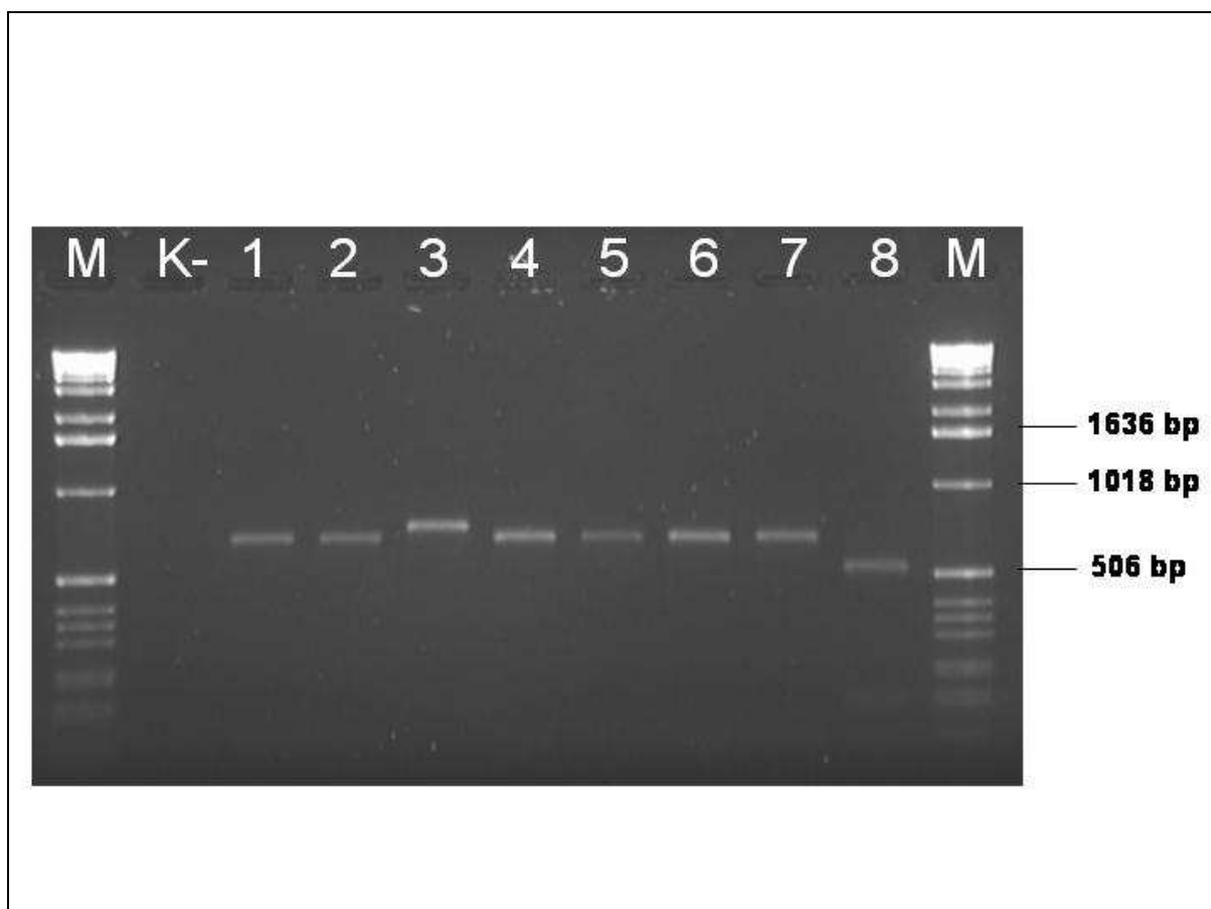


Abbildung 12: Spaltmuster PCR Produkt MCP 2A gespalten mit *Hae* II

Abgebildet sind die MCP 2A PCR-Produkte des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), PPIV (Nr. 4), FV3 (Nr. 5), REV (Nr. 6), RTRV (Nr. 7) und SERV (Nr. 8) nach Spaltung mit *Hae* II. Bei der Negativkontrolle (K-) handelt es sich um eine Wasserkontrolle.

5.4.4 Spaltmuster *Xho* I

Das Restriktionsenzym *Xho* I spaltet das MCP 2A PCR-Produkt von EHNV, ESV, ECV, PPIV, REV und SERV in zwei Fragmente (356/ 394 nt). Keine Spaltung erfolgt bei den Viren BIV, FV3 und RTRV (Abb. 13).

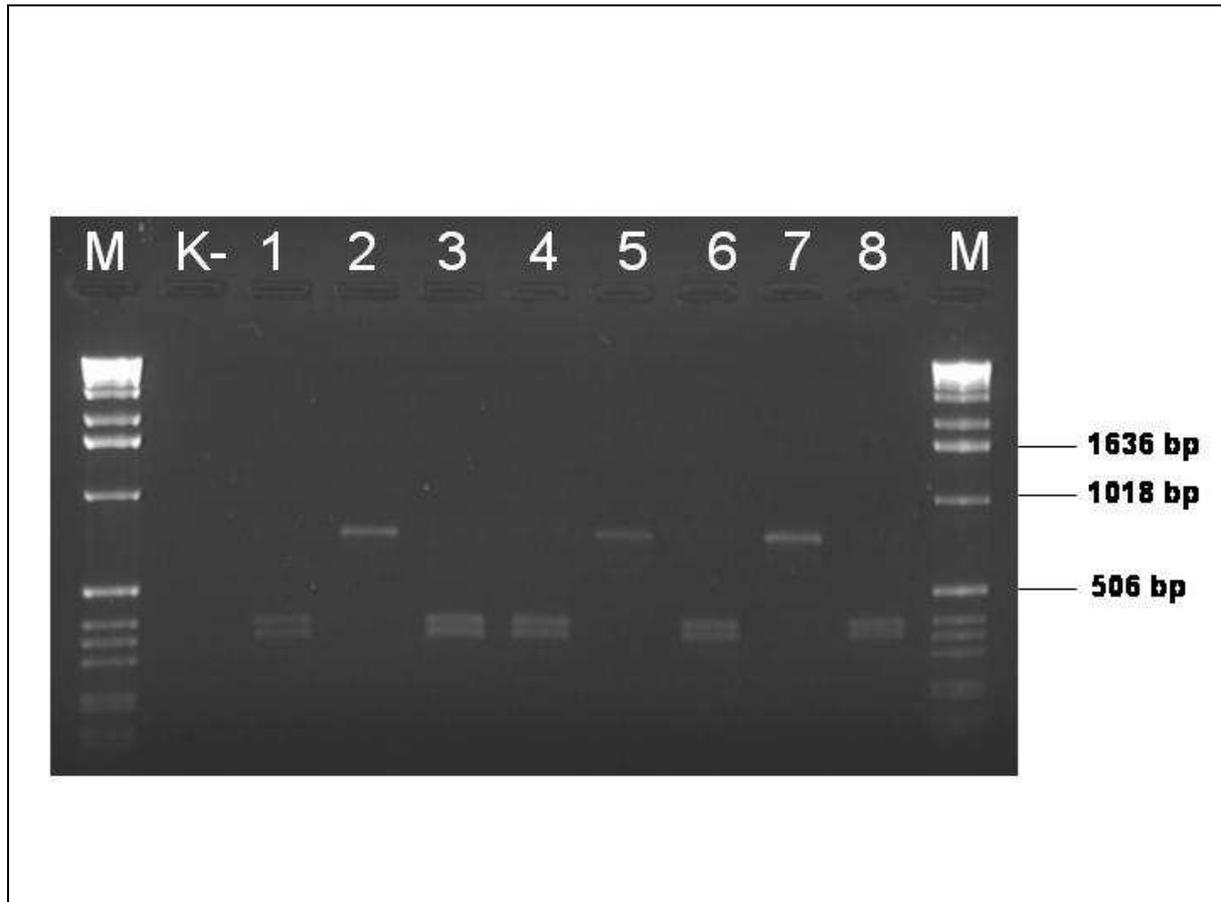


Abbildung 13: Spaltmuster PCR-Produkt MCP 2A gespalten mit *Xho* I

Abgebildet sind die MCP 2A PCR-Produkte des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), PPIV (Nr. 4), FV3 (Nr. 5), REV (Nr. 6), RTRV (Nr. 7) und SERV (Nr. 8) nach Spaltung mit *Xho* I. Bei der Negativkontrolle (K-) handelt es sich um eine Wasserkontrolle.

5.5 Identifizierung des MCP-Gens des DFV und GV6

5.5.1 Amplifikation mit herkömmlichen Primern

Ein Problem stellte die Amplifikation des MCP-Gens der zu analysierenden Santee-Cooper Ranaviren GV6 und DFV dar. Eine Amplifikation mit den Primerkombinationen MCP 1 & 2R, MCP 1 & 2A rev, MCP 3A for & 4A rev, MCP 5 & 6R sowie MCP 5A for & 6A rev war nicht möglich und somit nicht wie bei Hyatt et al. (2000) beschrieben reproduzierbar. Auch unter Verwendung der neu abgeleiteten Primer MCP 1 & 2A rev, MCP 3A for & 4A rev, MCP 5A for & 6A rev wurde das MCP-Gen dieser Erreger nicht identifiziert. Lediglich eine unzuverlässige sporadische Amplifikation des zweiten MCP-Genfragmentes mit der Primerkombination MCP 3 & 4R war möglich. Amplifiziert wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von 776 bp. Das entsprechende Produkt wurde in den Klonierungsvektor pGEM Teasy transformiert und anschließend sequenziert. Die Sequenzanalysen ergaben eine von den bislang publizierten Sequenzen des MCP-Gens von DFV (AF157665) bzw. GV6 (AF157671) abweichende Nukleotidabfolge. Die Sequenzen überschneiden sich auf einer Länge von 296 nt (Nukleotide 471-766 des MCP 2 PCR-Produktes). Die Unterschiede zwischen den ermittelten und den veröffentlichten Sequenzdaten sind mit einer Homologie von nur ca. 80 % beachtlich.

Die ersten 126 Nukleotide des MCP 2 PCR-Produktes von GV6 sind zu 95 % identisch mit der in GenBank vorhandenen MCP-Teilsequenz des LMBV, welches ebenfalls ein Vertreter der Santee-Cooper Ranaviren ist (AF080250).

Zur Bestätigung der ermittelten Teilsequenz des MCP-Gens von DFV und GV6 wurde auf der Basis der publizierten Sequenz des DFV (Labroides Dimidatus Ranavirus, GenBank Nr. U82550, Mao et al., 1997) der entsprechende Primer DF 1 for abgeleitet.

Zur Identifizierung der MCP Gensequenz des DFV und GV6 wurden zwei unterschiedliche Wege verfolgt. Zum einen sollte das MCP-Gen des DFV durch Shotgun-Klonierung identifiziert werden, während das MCP-Gen des GV6 durch Verwendung neuer Primer, abgeleitet von der MCP-Teilsequenz des Labroides Dimidatus Ranavirus und eigenen Sequenzdaten, amplifiziert werden sollte.

Die abgeleiteten und verwendeten Primer zur Identifizierung des MCP-Gens der Santee-Cooper Ranaviren sind in Abb. 21 schematisch dargestellt.

5.5.2 Identifizierung des MCP-Gens des DFV nach Southernblot-Analyse und Shotgun-Klonierung des viralen Genoms

Das MCP-Gen des DFV wurde nach Shotgun-Klonierung der viralen DNA identifiziert. Dazu wurde die virale DNA extrahiert und mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III bzw. *Kpn* I gespalten. Die DNA-Fragmente wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. DNA nicht-infizierter CCLV Rie88-Zellen diente als Negativkontrolle. Zum Vergleich wurde die virale DNA des EHNV herangezogen.

Die Southernblot-Analyse wurde mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierten spezifischen Primern (MCP 6R, DF 2 rev, Rana mcp rev) durchgeführt (Abb.14).

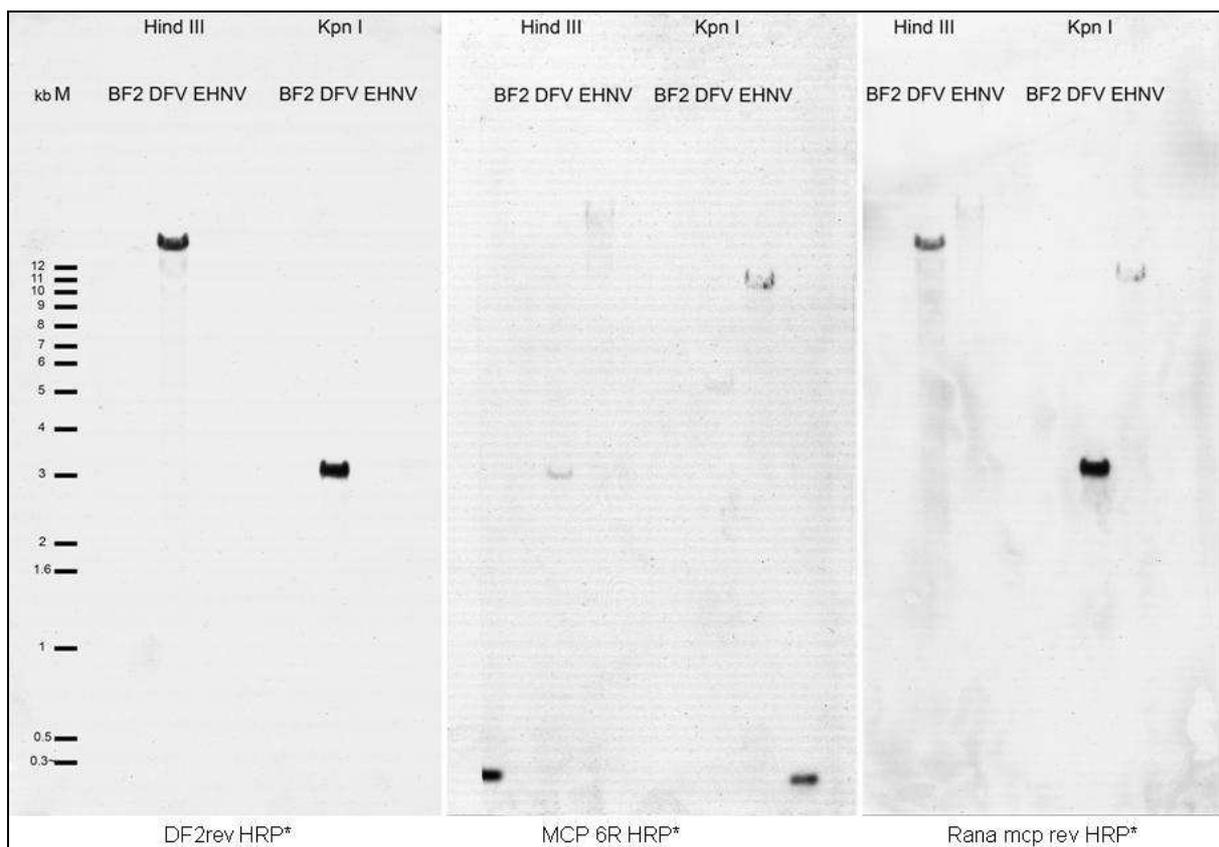


Abbildung 14: Southernblot-Analyse MCP-Gen des DFV und EHNV mit den HRP-markierten synthetischen Oligonukleotiden DF 2 rev, MCP 6R sowie Rana mcp rev

DFV und EHNV wiesen unterschiedliche Spaltpmuster nach Verdau der viralen DNA mit *Hind* III bzw. *Kpn* I auf. Die Southernblot-Analyse bestätigt, dass das MCP-Gen beider Erreger auf unterschiedlichen Fragmenten lokalisiert ist. Zur eindeutigen Identifizierung der DNA-Fragmente, auf denen das MCP-Gen lokalisiert ist, wurden drei unterschiedliche Sonden in der Southernblot-Analyse verwendet.

Das synthetische Oligonukleotid MCP 6R (Hyatt et al., 2000) bindet am 3' Ende der MCP-Gensequenz (FV3 nt Position 98.807 - 98.828; AY 548484). Der Primer Rana mcp rev bindet 131 Nukleotide sequenzaufwärts von der MCP 6R Sequenz (FV3 nt Position 98.676 - 98.697; AY548484). Der dritte verwendete Primer DF 2 rev wurde von den ermittelten Sequenzdaten des MCP 2 Produktes der GV6-DNA abgeleitet und ist ca. 800 Nukleotide sequenzaufwärts von der MCP 6R Sequenz lokalisiert.

Die mit HRP markierten Oligonukleotide MCP 6R und Rana mcp rev erkennen sowohl Fragmente *Hind* III bzw. *Kpn* I gespaltenen viralen DNA des DFV als auch des EHNV. Beide Primer identifizieren die gleichen Fragmente der gespaltenen EHNV-DNA (*Hind* III: > 20 kb; *Kpn* I: ca. 11 kb). Im Gegensatz dazu erkennen diese markierten Sonden jedoch unterschiedliche Fragmente der *Hind* III bzw. *Kpn* I gespaltenen DFV-DNA. Der HRP-markierte Primer MCP 6R identifiziert ein ca. 3 kb großes *Hind* III bzw. ein ca. 5 kb großes *Kpn* I -Fragment der DFV-DNA, während der Primer Rana mcp rev ein mehr als 15 kb großes *Hind* III Fragment und ein ca. 3 kb großes *Kpn* I -Fragment der DFV-DNA erkennt.

Im Gegensatz zu den synthetischen Oligonukleotiden MCP 6R und Rana mcp rev bindet der Primer DF 2 rev spezifisch nur an die virale DNA des DFV, nicht jedoch an die DNA des EHNV und der Zellkontrolle. Dieser HRP-markierte Primer erkennt ein *Hind* III Fragment von mehr als 15 kb und ein ca. 3 kb Fragment der *Kpn* I gespaltenen DFV DNA. Das heißt, die Sonden DF 2 rev und Rana mcp rev binden an die gleichen Fragmente der *Hind* III bzw. *Kpn* I gespaltenen viralen DNA, während der Primer MCP 6R nicht an das DFV Genom bindet. Anzumerken ist auch, dass der Primer MCP 6R eine starke Bindungskapazität zu einem ca. 200 bp großen Fragment des 1 kb Markers (Invitrogen) aufweist.

Die Ergebnisse der Southernblot-Analyse lassen wie schon die PCR-Analysen eine Abweichung der MCP-Gensequenz der Santee-Cooper Ranaviren von den anderen Ranaviren vermuten. Ferner weisen die Resultate darauf hin, dass das MCP-Gen des DFV auf einem 3 kb großen Fragment der *Kpn* I bzw. einem über 15 kb großen Fragment der *Hind* III gespaltenen viralen DNA lokalisiert ist. Beide Fragmente wurden in den entsprechend mit *Kpn* I bzw. *Hind* III gespaltenen Vektor pUC18 kloniert. Die MCP-Gensequenz wurde unter Verwendung spezifischer Primer, die von den ermittelten Sequenzen abgeleitet wurden, eindeutig identifiziert.

5.5.3 Identifizierung des MCP-Gens des GV6 nach Amplifikation mit spezifischen Primern

Parallel zur Shotgun-Klonierung des MCP-Gens des DFV wurde durch Kombination verschiedener Primer das MCP-Gen des GV6 in mehreren Schritten amplifiziert.

Während der PCR-Analysen trat sporadisch ein PCR-Produkt durch Kombination der Primer MCP 3 & 4R (Hyatt et al., 2000) auf. Entgegen den Erwartungen handelte es sich jedoch um ein Produkt mit einer Größe von circa 750 bp (Abb. 15, Nr. 8) und nicht um das bei den anderen Ranaviren amplifizierte 530 bp große Produkt. Die Klonierung in den Vektor pGEM-Teasy mit anschließender Sequenzierung bestätigte jedoch, dass es sich bei den amplifizierten 777 bp um einen MCP-Genabschnitt handelte.



Abbildung 15: Amplifizierung von MCP-Genbereichen des DFV und GV6

Abgebildet sind folgende PCR-Produkte des MCP-Gens: DFV MCP 1, 2 und 3 (Nr. 1 - 3) und MCP 1A, 2A und 3A (Nr. 4 - 6); GV6 MCP 1, 2 und 3 (Nr. 7 - 9) und MCP 1A, 2A und 3A (Nr. 10 - 12). Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

Die erhaltenen Sequenzdaten ermöglichten die Ableitung neuer spezifischer Primer (DF 2 for & rev). Zusätzlich wurde der Primer DF 1 for anhand bekannter DFV MCP-Gensequenzdaten abgeleitet (GenBank U82550, Labroides dimidatus ranavirus, Mao et al., 1999). Die Kombination der Primer DF 1 for & DF 2 rev ermöglichte die zuverlässige Amplifikation eines 923 bp großen MCP-Genfragmentes des DFV und GV6 (Abb. 16). In der Negativkontrolle und in der ESV Kontrolle hingegen trat kein PCR Produkt auf. Sequenzanalysen bestätigen eine starke Abweichung des MCP-Gens der Santee-Cooper Ranaviren im Vergleich zu den anderen Ranaviren.

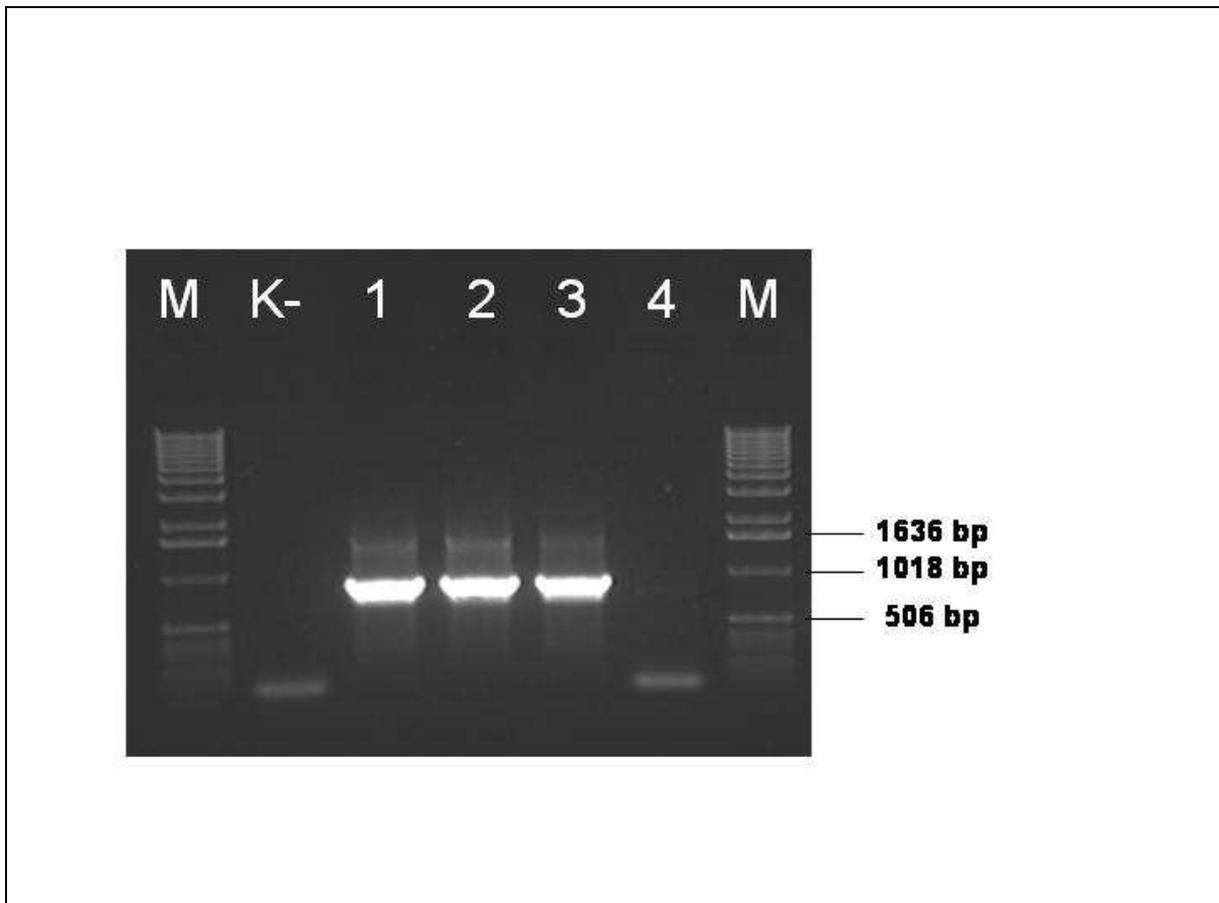


Abbildung 16: PCR MCP DF (Primer MCP DF 1 for & 2 rev), PCR Produkt 923 bp

Abgebildet sind PCR-Produkte des MCP-Gens nach Amplifikation mit den Primern MCP DF 1 for & 2 rev (923 bp). Amplifiziert wurde GV6 DNA nach DNA-Extraktion aus 20 μ l Zellkulturüberstand (Nr. 1), DFV DNA nach DNA-Extraktion aus 20 μ l Zellkulturüberstand (Nr. 2) und 200 μ l Zellkulturüberstand (Nr. 3) sowie ESV DNA aus 20 μ l Zellkulturüberstand (Nr. 4). Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

Abb. 17 dokumentiert die Spezifität der MCP DF PCR für die Santee-Cooper Ranaviren DFV und GV6 im Vergleich zu den Ranaviren EHNV, ESV, ECV, PPIV, SERV, REV, FV3 und BIV.

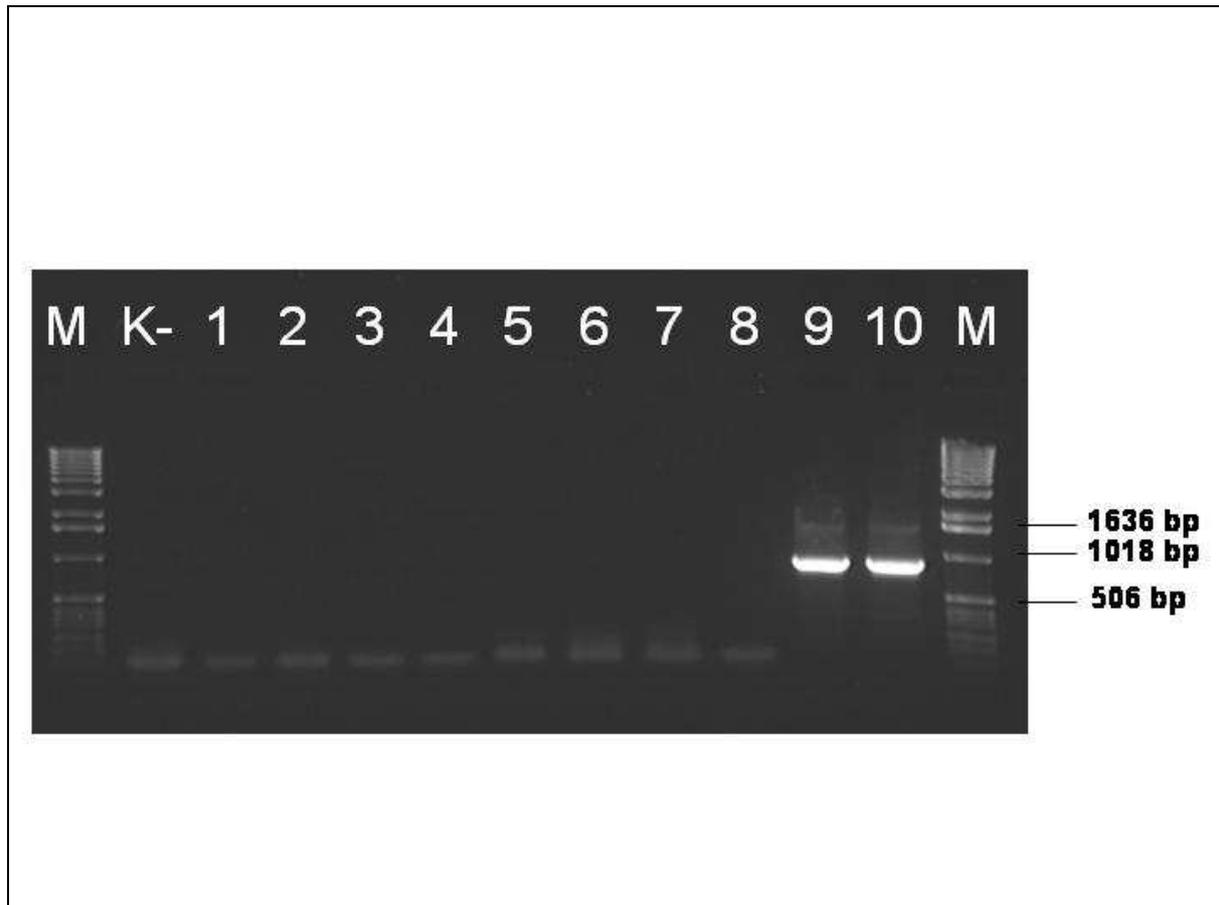


Abbildung 17: PCR MCP DF (Primer MCP DF 1 for & DF 2 rev)

PCR-Ergebnisse nach Amplifikation des MCP-Gens des EHNV (Nr. 1), ESV (Nr. 2), ECV (Nr. 3), PPIV (Nr. 4), SERV (Nr. 5), REV (Nr. 6), FV3 (Nr. 7), BIV (Nr. 8), GV6 (Nr. 9) und DFV (Nr. 10) mit den Primern MCP DF 1 for & 2 rev. Die Negativkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

Zur Erfassung weiterer MCP-Genbereiche wurde der Primer MCP DF 2 for mit dem Primer MCP 6A rev bzw. MCP 6R in weiteren PCR-Analysen kombiniert. Es entstand jeweils ein PCR-Produkt von ca. 550 bp, bei der Kombination DF 2 for & MCP 6R zusätzlich ein ca. 900 bp großes PCR Produkt (Abb. 18). Die Klonierung mit anschließender Sequenzanalyse der GV6 PCR-Produkte lieferten weitere Sequenzdaten des GV6 MCP-Gens (540 bp, 903 bp). Die Entstehung des 903 bp umfassenden zweiten PCR-Produktes basiert auf der zusätzlichen Bindung des Primers MCP 6R an einen weiteren Genomabschnitt außerhalb des MCP-Gens. Die durch Sequenzierung des 540 bp großen PCR-Produktes erhaltene Nukleotidsequenz des MCP-Gens des GV6 wurde durch das zweite 903 bp große PCR-Produkt verlängert bzw. ergänzt. Da der Primer MCP 6R in diesem Fall auch außerhalb des MCP-Gens bindet, war eine Identifizierung des gesamten 3' Bereiches des MCP-Gens einschließlich des Stopkodons möglich.

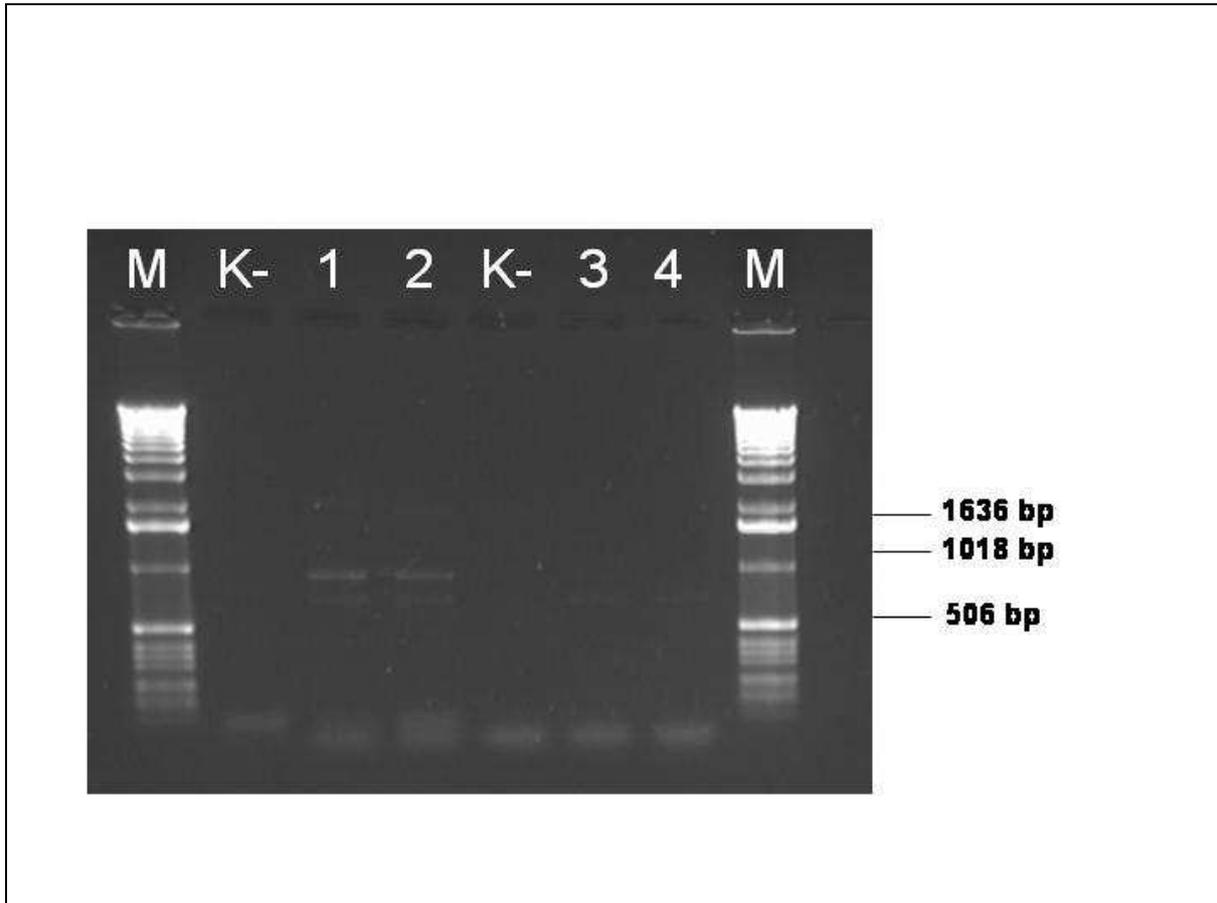


Abbildung 18: PCR MCP DF 2 for & MCP 6R bzw MCP 6A rev DFV und GV6

PCR-Ergebnisse nach Amplifikation von GV6 DNA (Nr. 1) und DFV DNA (Nr. 2) mit den Primern MCP DF 2 for & MCP 6R sowie von GV6 DNA (Nr. 3) und DFV DNA (Nr. 4) mit den Primern MCP DF 2 for & MCP 6A rev. Die beiden Wasserkontrollen wurden unter K- aufgetragen.

Um die noch fehlenden Sequenzdaten des 5' Endes der MCP-Nukleotidsequenz des GV6 zu ergänzen, wurde der Primer MCP DF 3 rev in Kombination mit dem Primer Irido MCP AF (Holopainen et al., 2009) und MCP 1 erfolgreich in der PCR eingesetzt. Abgeleitet wurde der Primer DF 3 rev von der erhaltenen MCP DF Sequenz, er bindet ca. 600 bp sequenzaufwärts von DF 2 for/ rev. Der Primer Irido MCP AF bindet außerhalb des MCP-Gens ca. 50 bp sequenzaufwärts.

Erwartet wurde ein PCR-Produkt von 410 bp bei der Kombination der Primer Irido MCP AF und DF 3 rev bzw. von 370 bp unter Verwendung der Primer MCP 1 und DF 3 rev. Während das PCR-Produkt aus der Kombination der Primer MCP 1 und DF 3 rev den Erwartungen entsprechend eine Größe von 370 bp aufwies, entstand in der PCR mit den Primern Irido MCP AF und DF 3 rev ein Produkt mit einer Größe von 638 bp. Die Bindungsposition des außerhalb des MCP-Gens bindenden Primers Irido MCP AF weicht somit von der Genomposition der anderen Ranaviren ab. Der Primer bindet am Genom des GV6 und DFV an Nukleotidposition -294 bis -274 sequenzaufwärts des MCP-Gens.

Beide Produkte konnten nach Klonierung und Sequenzierung als MCP-Gensequenz identifiziert werden (Abb. 19). Durch die Bindung des Primers Irido MCP AF außerhalb des MCP-Gens war die Identifizierung des kompletten 5` Endes der Nukleotidsequenz inklusive des Startkodons des MCP-Gens von GV6 möglich.

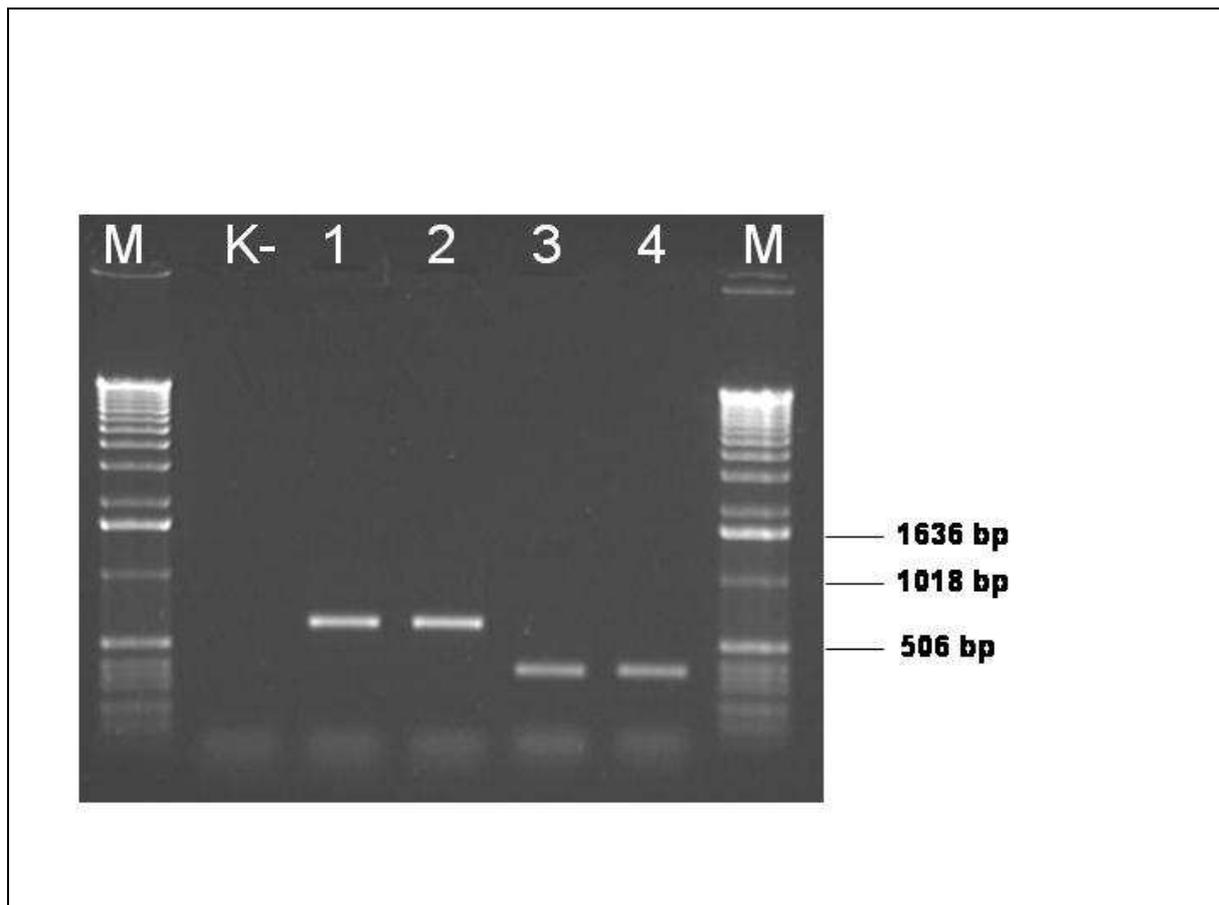


Abbildung 19: PCR Irido MCP AF bzw. MCP 1 & MCP DF 3 rev von GV6 und DFV

PCR-Ergebnisse nach Amplifikation von GV6 DNA (Nr. 1) und DFV DNA (Nr. 2) mit den Primern MCP AF & MCP DF 3 rev sowie von GV6 DNA (Nr. 3) und DFV DNA (Nr. 4) mit den Primern MCP 1 & MCP DF 3 rev. Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

Die ermittelten Sequenzen wiesen eine entsprechende Überlappung GV6 spezifischer MCP-Gensequenzen von wenigstens 300 Nukleotiden auf, so dass eine genaue Identifizierung des MCP-Gens von GV6 möglich war. Beim Vergleich der MCP-Gensequenzen des GV6 und des DFV wurde eine Identität von 100 % festgestellt (Kap. 5.5.2)

5.6 Identifizierung des MCP-Gens des LMBV

Die Nukleotidsequenz des MCP-Gens der Santee-Cooper Ranaviren GV6 und DFV (1392 bp) weist eine Identität von 100 % auf (Kap. 5.5.2). Laut aktueller Virustaxonomie wird auch das LMBV zu den Santee-Cooper Ranaviren gezählt. Publiziert ist bis dato lediglich ein 495 nt umfassender 5´Abschnitt des MCP-Gens des LMBV (GenBank AF080250). Um eine genauere Aussage über den Grad der Homologie des MCP-Gens des LMBV im Vergleich zu GV6 und DFV treffen zu können, wurde das gesamte MCP-Gen des LMBV amplifiziert und sequenziert. Hierzu wurden anhand der Sequenzdaten des MCP-Gens des DFV und GV6 neue Primer zur Amplifikation des gesamten MCP-Gens der Santee-Cooper Ranaviren abgeleitet (SCIV for & rev). Die Primerpositionen befinden sich außerhalb des MCP-Gens sequenzaufwärts an nt Position -189 bis -169 (SCIV for) und sequenzabwärts an nt Position +45 bis +24 (SCIV rev, Abb. 21, Tab. 4).

Entsprechend der ermittelten Sequenz des DFV bzw. GV6 MCP-Gens sollte mit diesen Primern ein ca. 1,6 kb großes Fragment amplifiziert werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung der SCIV PCR-Produkte im Agarosegel konnte ein Fragment dieser Größe für GV6, DFV und LMBV nachgewiesen werden (Abb. 20). Das SCIV PCR-Produkt des LMBV wurde nach Elution aus dem Agarosegel in den Vektor pGEM-Teasy kloniert. Eine eindeutige Identifizierung des LMBV MCP-Gens erfolgte in der Sequenzanalyse von drei unabhängig voneinander isolierten Klonen. Hierzu wurden die Sequenzprimer -40 und -48, sowie die Primer SCIV for & rev, DF 3 rev, DF 2 for & rev und DF 1 for genutzt. Die Gesamtlänge des LMBV MCP-Gens beträgt 1392 bp und entspricht somit der Größe des MCP-Gens der Ranaviren. Die Homologie des MCP-Gens des LMBV zu den anderen Santee-Cooper Ranaviren GV6 und DFV beträgt 99,21 %. Im Vergleich der ermittelten MCP-Gensequenz des LMBV zu der 495 bp publizierten Teilsequenz des LMBV (GenBank AF080250) besteht eine 100 % Übereinstimmung.

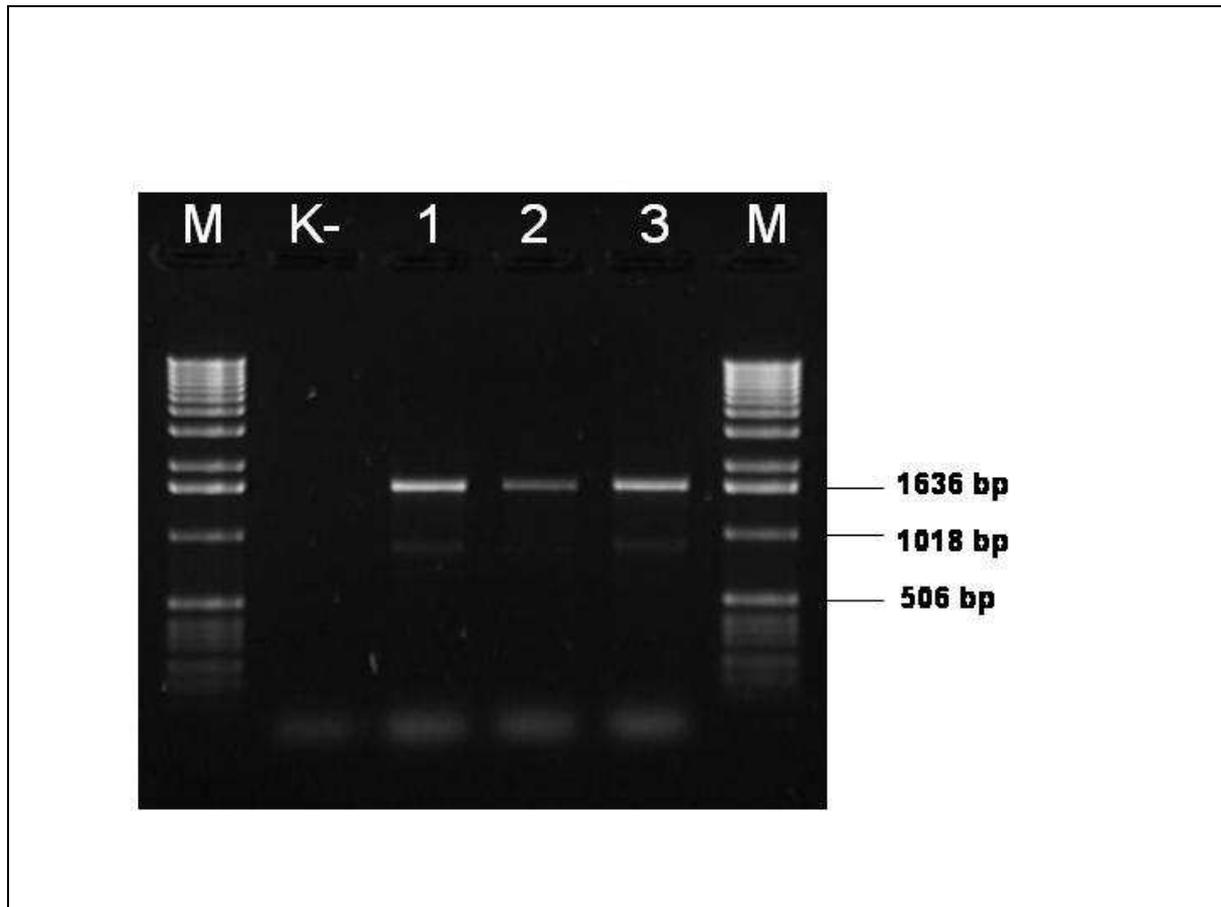


Abbildung 20: SCIV PCR zur Amplifikation des MCP-Gens des GV6, DFV und LMBV

PCR-Produkt SCIV (1626 bp) nach Amplifikation des MCP-Gens des GV6 (Nr. 1), DFV (Nr. 2) und LMBV (Nr. 3) mit den Primern SCIV for & rev. Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

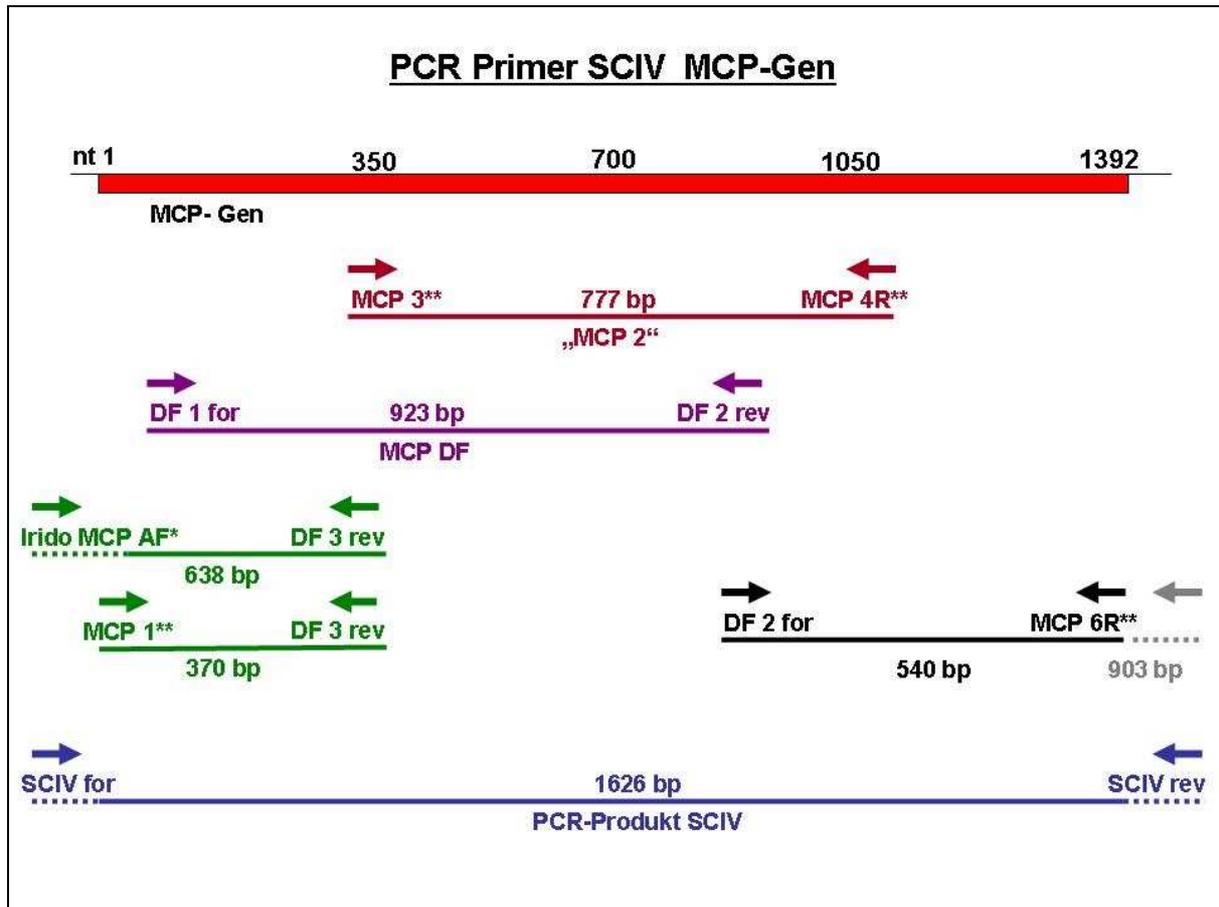


Abbildung 21: Primerposition der Santee-Cooper Ranaviren in Relation zum MCP-Gen

Schematische Darstellung des MCP-Gens und entsprechender Primerpositionen zur Amplifikation der abgebildeten MCP-Genabschnitte der Santee-Cooper Ranaviren. *: Primer nach Holopainen et al. (2009); **: Primer nach Hyatt et al. (2000). Gestrichelte Linien kennzeichnen außerhalb des MCP-Gens liegende Primerpositionen.

5.7 Sequenzanalyse des MCP-Gens der Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV

Das MCP-Gen der Santee-Cooper Ranaviren weist eine Länge von 1392 Nukleotiden auf und entspricht somit in seiner Größe exakt dem MCP-Gen aller bisher analysierten Ranaviren. Im Gegensatz dazu kodieren die Erreger des Genus *Megalozytivirus* ein MCP-Gen von 1362 bp. Die Vertreter des Genus *Lymphocystivirus* besitzen ein MCP-Gen von 1380 nt Länge, die des Genus *Chloriridovirus* eines von 1401 nt Länge. Das MCP-Gen der dem Genus *Iridovirus* zugeordneten Viren weisen hingegen MCP-Gene unterschiedlicher Länge auf (1389 bis maximal 1455 nt).

DFV und GV6 sind in ihrer MCP-Gensequenz identisch. Die ermittelte MCP-Gensequenz des DFV und GV6 weist jedoch lediglich eine Identität von 81 % zu den bislang veröffentlichten C-terminalen Sequenzen dieser Erreger auf (DFV: AF157665; GV6: AF157671, Hyatt et al., 2000). Hierbei handelt es sich um die Nukleotide 900 bis 1392 der ermittelten MCP-Gensequenz.

Der Vergleich der Nukleotidsequenz des MCP-Gens des DFV und GV6 mit dem von Mao et al. (1997) für das DFV beschriebenen 293 nt umfassenden Sequenzabschnitt (GenBank U82550) zeigt eine Homologie von 98 %. Dieser Abschnitt entspricht den Nukleotiden 43 bis 333 der ermittelten Gensequenz. Die ermittelte Sequenzhomologie bestätigt die Identität der MCP-Gensequenz des GV6 und DFV.

Das MCP-Gen des LMBV wurde ebenfalls vollständig identifiziert. Die ermittelte Nukleotidsequenz ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem in der GenBank verfügbaren 495 nt umfassenden MCP-Genbereich (AF080250). Es handelt sich hierbei um die Nukleotide 61 bis 555 der ermittelten MCP-Gensequenz.

Die ermittelte Nukleotidsequenz des MCP-Gens der Isolate GV6 und DFV weist zur identifizierten MCP-Nukleotidsequenz des LMBV eine Homologie von 99,2 % auf. Von den insgesamt elf Nukleotidaustauschen sind neun innerhalb der 500 N-terminalen Nukleotide der Sequenz lokalisiert.

Die vergleichende Sequenzanalyse des MCP-Gens verdeutlicht die enge genetische Verwandtschaft der Santee-Cooper Ranaviren untereinander und eine eindeutige Abgrenzung von den anderen analysierten Ranaviren. Die identifizierte Nukleotidsequenz der Santee-Cooper Ranaviren ist zu ca. 78 % identisch mit den entsprechenden MCP-Gensequenzen des FV3, EHNV, BIV, ESV/ ECV, PPIV, REV, RTRV und SERV (Tab. 13). Die Santee-Cooper Ranaviren stellen somit eine von den restlichen Ranavirusgruppen genetisch deutlich abweichende Virusgruppe dar.

Tabelle 13: Homologie (in Prozent) der ermittelten Nukleotidsequenzen des MCP-Gens (1392 bp) der Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV mit anderen Ranaviren

	FV3	EHNV	BIV	ESV	ECV	PPIV	REV	RTRV	SERV	DFV
DFV	78.089	78.017	78.089	78.448	78.448	78.448	78.305	78.233	78.376	
GV6	78.089	78.017	78.089	78.448	78.448	78.448	78.305	78.233	78.376	100
LMBV	78.017	77.945	78.017	78.520	78.520	78.376	78.233	78.233	78.448	99.210

Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um Prozentwerte. Es wurde jeweils die 1392 bp umfassende MCP-Gensequenz zweier Viren mit dem Programm NCBI blast2sequences verglichen. Der Homologiewert resultiert aus dem Quotienten übereinstimmender Nukleotide/ Gesamtzahl der Nukleotide (1392 nt).

5.8 Phylogenetischer Vergleich der analysierten Ranaviren

5.8.1 Sequenzvergleich des MCP-Gens

```

nt      1                                                                                               50
DFV    ATGTCTTCTG TTACGGGTTT TGGCATCACT AGCGGGTTCA TTGATCTCGC
GV6    ATGTCTTCTG TTACGGGTTT TGGCATCACT AGCGGGTTCA TTGATCTCGC
LMBV   ATGTCTTCTG TTACGGGTTT TGGCATCACT AGCGGGTTCA TTGATCTCGC
ECV    ATGTCTTCTG TAACCGGTTT AGGTATCACA AGTGGTTTCA TCGACTTGCC
ESV    ATGTCTTCTG TAACCGGTTT AGGTATCACA AGTGGTTTCA TCGACTTGCC
EHNV   ATGTCTTCTG TAACCGGTTT AGGTATCACA AGTGGTTTCA TCGACTTGCC
PPIV   ATGTCTTCTG TAACTGGTTC AGGTATCACA AGTGGTTTCA TCGACTTGCC
REV    ATGTCTTCTG TAACTGGTTC AGGTATCACA AGTGGTTTCA TCGACTTGCC
BIV    ATGTCTTCTG TAACTGGTTC AGGTATCACA AGTGGTTTCA TTGACTTGCC
FV3    ATGTCTTCTG TAACTGGTTC AGGTATCACA AGTGGTTTCA TCGACTTGCC
RTRV   ATGTCTTCTG TAACTGGTTC AGGTATCACA AGTGGTTTCA TCGACTTGCC
SERV   ATGTCTTCTG TAACCGGTTT AGGTATCACA AGTGGTTTCA TCGACTTGCC

```

```

51                                                                                               100
DFV    CACTTATGAC AGCCTTGACA AAGCGCTGTA CGGTGGAAAA GATGCAACTA
GV6    CACTTATGAC AGCCTTGACA AAGCGCTGTA CGGTGGAAAA GATGCAACTA
LMBV   CACTTATGAC AGCCTTGACA AAGCGCTGTA CGGTGGAAAA GATGCAACTA
ECV    CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGCTCG GACGCCACCA
ESV    CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGCTCG GACGCCACCA
EHNV   CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGCTCG GACGCCACCA
PPIV   CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGTTTCG GACGCCACCA
REV    CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGTTTCG GATGCCACCA
BIV    CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGTTTCG GACGCCACCA
FV3    CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGTTTCG GACGCCACCA
RTRV   CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGTTTCG GACGCCACCA
SERV   CACTTATGAC AATCTGAGA GAGCAATGTA CGGGGGCTCG GACGCCACCA

```

```

101                                                                                               150
DFV    CTTATTTTGT CAAAGAGCAT TATCCCGTGG GTTGGTTTAC CAAACTGCCT
GV6    CTTATTTTGT CAAAGAGCAT TATCCCGTGG GTTGGTTTAC CAAACTGCCT
LMBV   CTTATTTTGT CAAAGAGCAT TATCCCGTGG GTTGGTTTAC CAAACTGCCT
ECV    CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG
ESV    CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG
EHNV   CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG
PPIV   CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG
REV    CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG
BIV    CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG
FV3    CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG
RTRV   CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG
SERV   CGTACTTTGT CAAGGAGCAC TACCCCGTGG GGTGGTTTAC CAAGCTGCCG

```

	151					200
DFV	ACGGCTGCCA	CAAAAACCTC	TGGTACGCCT	GCTTTCGGAC	AGCACTTTTC	
GV6	ACGGCTGCCA	CAAAAACCTC	TGGTACGCCT	GCTTTCGGAC	AGCACTTTTC	
LMBV	ACGGCTGCCA	CAAAAACCTC	TGGTACGCCT	GCTTTCGGAC	AGCACTTTTC	
ECV	TCTCTGGCCG	CCAAGATGTC	GGGCAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	
ESV	TCTCTGGCCG	CCAAGATGTC	GGGCAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	
EHNV	TCTCTGGCCG	CCAAGATGTC	GGGCAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	
PPIV	TCTCTGGCTG	CCAAGATGTC	GGGTAAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	
REV	TCTCTGGCTG	CCAAGATGTC	GGGTAAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	
BIV	TCTCTGGCTG	CCAAGATGTC	GGGTAAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	
FV3	TCTCTGGCTG	CCAAGATGTC	GGGTAAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	
RTRV	TCTCTGGCTG	CCAAGATGTC	TGGTAAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	
SERV	TCTCTGGCCG	CCAAGATGTC	GGGCAACCCG	GCTTTCGGGC	AGCAGTTTTC	

	201					250
DFV	CGTAGGAGTG	CCCAGGTCGG	GCGACTATGT	GCTCAACTCT	TGGCTGGTCC	
GV6	CGTAGGAGTG	CCCAGGTCGG	GCGACTATGT	GCTCAACTCT	TGGCTGGTCC	
LMBV	CGTAGGAGTG	CCCAGGTCGG	GCGACTATGT	GCTCAACTCT	TGGCTGGTCC	
ECV	GGTCGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACACC	TGGTTGGTGC	
ESV	GGTCGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACACC	TGGTTGGTGC	
EHNV	GGTCGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACGCC	TGGTTGGTGC	
PPIV	GGTAGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACGCC	TGGTTGGTGC	
REV	GGTCGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACGCC	TGGTTGGTGC	
BIV	GGTCGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACGCC	TGGTTGGTGC	
FV3	GGTCGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACGCC	TGGTTGGTGC	
RTRV	GGTCGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACGCC	TGGTTGGTAC	
SERV	GGTCGGCGTT	CCCAGGTCGG	GGGATTACAT	CCTCAACGCC	TGGTGGTGC	

	251					300
DFV	TCAAGACCCC	TCAGATTAAA	CTGCTGGCCG	CAAACCAGTT	TAACAATGAC	
GV6	TCAAGACCCC	TCAGATTAAA	CTGCTGGCCG	CAAACCAGTT	TAACAATGAC	
LMBV	TCAAGACCCC	TCAGATTAAA	CTGCTGGCCG	CAAACCAGTT	TAACGCAAAC	
ECV	TCAAGACCCC	CCAGGTCAAG	CTCCTGGCCG	CAAACCAGCT	GGGTGCCAAC	
ESV	TCAAGACCCC	CCAGGTCAAG	CTCCTGGCCG	CAAACCAGCT	GGGTGCCAAC	
EHNV	TCAAGACCCC	CGAGGTCAAG	CTCCTGGCCG	CAAACCAGCT	GGGAGACAAC	
PPIV	TCAAGACCCC	CGAGGTCAAG	CTCCTGGCCG	CAAACCAGCT	GGGAGACAAC	
REV	TCAAGACCCC	CGAGGTCAAG	CTCCTGGCCG	CAAACCAGCT	GGGAGACAAC	
BIV	TCAAGACCCC	CGAGGTCAAG	CTCCTGGCTG	CAAACCAGCT	GGGAGACAAT	
FV3	TCAAGACCCC	CGAGGTCAAG	CTCCTGGCTG	CAAACCAGCT	GGGAGACAAT	
RTRV	TCAAGACCCC	TGAGGTCAAG	CTCCTGGCCG	CAAACCAGCT	GGGAGAAAAT	
SERV	TCAAGACCCC	CGAGGTCAAG	CTCCTGGCCG	CAAACCAGCT	CGCGGCCAAC	

	301					350
DFV	GGTACCATCA	GATGGACCAA	AAATCTCATG	CACAACGTTG	TGGAGCACGC	
GV6	GGTACCATCA	GATGGACCAA	AAATCTCATG	CACAACGTTG	TGGAGCACGC	
LMBV	GGTACCATCA	GATGGACCAA	AAATCTCATG	CACAACGTTG	TGGAGCACGC	
ECV	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAACGT	
ESV	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAACGT	
EHNV	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAACGT	
PPIV	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAACGT	
REV	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAACGT	
BIV	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAGCGT	
FV3	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAGCGT	
RTRV	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAGCGT	
SERV	GGCACCATCA	GGTGGACAAA	GAACCCCATG	CACAACATTG	TGGAGAGCGT	

	351					400
DFV	CGCACTCTCG	TTCAACGAGA	TTCAGGCCCA	GCAGTTTAAT	ACTGCTTTCC	
GV6	CGCACTCTCG	TTCAACGAGA	TTCAGGCCCA	GCAGTTTAAT	ACTGCTTTCC	
LMBV	CGCACTCTCG	TTCAACGAGA	TTCAGGCCCA	GCAGTTTAAT	ACTGCTTTCC	
ECV	CAACCTCTCA	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GTCCTTTAAC	ACGGCCTACC	
ESV	CAACCTCTCA	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GTCCTTTAAC	ACGGCCTACC	
EHNV	CAACCTCTCA	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GTCCTTTAAC	ACGGCATAACC	
PPIV	CAACCTCTCG	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GTCCTTTAAC	ACGGCATAACC	
REV	CAACCTCTCA	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GTCCTTTAAC	ACGGCATAACC	
BIV	CAACCTCTCA	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GTCCTTTAAC	ACGGCATAACC	
FV3	CAACCTCTCA	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GTCCTTTAAC	ACGGCATAACC	
RTRV	CAACCTCTCA	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GTCCTTTAAC	ACGGCATAACC	
SERV	GACCTCTCC	TTCAACGACA	TCAGGCCCA	GACCTTTAAC	ACTGCTTACC	

	401					450
DFV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCCG	AGGCCAAGCG	CATCGGGTAC	
GV6	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCCG	AGGCCAAGCG	CATCGGGTAC	
LMBV	TGGATGCCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCCG	AGGCCAAGCG	CATCGGGTAC	
ECV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATAGGCTAC	
ESV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATAGGCTAC	
EHNV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATAGGCTAC	
PPIV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATAGGCTAC	
REV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATAGGCTAC	
BIV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATAGGCTAC	
FV3	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATAGGCTAC	
RTRV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATAGGCTAC	
SERV	TGGACGCCTG	GAGCGAGTAC	ACCATGCCAG	AGGCCAAGCG	CATCGGGTAC	

	451					500
DFV	TACAACATGA	TTGGCAACAC	TAGCGATCTC	GTCAATCCCG	CCCCGCCAC	
GV6	TACAACATGA	TTGGCAACAC	TAGCGATCTC	GTCAATCCCG	CCCCGCCAC	
LMBV	TACAACATGA	TTGGCAACAC	TAGCGATCTC	GTCAATCCCG	CCCCGCCAC	
ECV	TATAACATGA	TAGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	
ESV	TATAACATGA	TAGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	
EHNV	TATAACATGA	TAGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	
PPIV	TATAACATGA	TAGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	
REV	TATAACATGA	TAGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	
BIV	TATAACATGA	TAGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	
FV3	TATAACATGA	TAGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	
RTRV	TATAACATGA	TAGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	
SERV	TATAACATGA	TCGGCAACAC	CAGCGATCTC	ATCAACCCCG	CCCCGCCAC	

	501					550
DFV	CGGACAAGCA	GGAGCTAGGG	TCCTGCCCGC	CAAAAACCTT	GTCCTTCCTC	
GV6	CGGACAAGCA	GGAGCTAGGG	TCCTGCCCGC	CAAAAACCTT	GTCCTTCCTC	
LMBV	CGATCAAGCA	GGAGCTAGGG	TCCTGCCCGC	CAAAAACCTT	GTCCTTCCTC	
ECV	AGGCCAGAAC	GGAGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTTCTTCCCC	
ESV	AGGCCAGAAC	GGAGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTTCTTCCCC	
EHNV	AGGCCAGAAC	GGAGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTTCTTCCCC	
PPIV	AGGCCAGGAC	GGAGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTTCTTCCCC	
REV	AGGCCAGAAAT	GGAGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTTCTTCCCC	
BIV	AGGCCAGGAC	GGAGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTTCTTCCCC	
FV3	AGGCCAGGAC	GGAGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTTCTTCCCC	
RTRV	AGGCCAGGAC	GGAGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTTCTTCCCC	
SERV	AGGCCAGAAC	GGCGCCAGGG	TCCTCCCGGC	CAAGAACCTG	GTCCTTCCCC	

	551					600
DFV	TCCCCTTCTT	TTTCGGCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	TACAGTCACC	
GV6	TCCCCTTCTT	TTTCGGCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	TACAGTCACC	
LMBV	TCCCCTTCTT	TTTCGGCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	TACAGTCACC	
ECV	TCCCATTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	AGTCGTCTCC	
ESV	TCCCATTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	AGTCGTCTCC	
EHNV	TCCCATTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	AGTCGTCTCC	
PPIV	TCCCATTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	AGTCGTCTCC	
REV	TCCCATTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	AGTCGTCTCC	
BIV	TCCCATTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	AGTCGTCTCC	
FV3	TCCCATTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	AGTCGTCTCC	
RTRV	TCCCATTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGAC	TGGCCCTGCC	AGTCGTCTCC	
SERV	TCCCCTTCTT	CTTCTCCAGA	GACAGCGGCC	TGGCCCTGCC	CGTCGTCTCC	

	601					650							
DFV	CTG	CCT	TACA	ACGAA	ATTAG	AATCACC	ATC	AGC	CTGAGAT	CCATT	CAGGA		
GV6	CTG	CCT	TACA	ACGAA	ATTAG	AATCACC	ATC	AGC	CTGAGAT	CCATT	CAGGA		
LMBV	CTG	CCT	TACA	ACGAA	ATTAG	AATCACC	ATC	AGC	CTGAGAT	CCATT	CAGGA		
ECV	CT	CCC	TACA	ACGAG	ATCAG	GATAA	CAGTC	AAG	CTGAGGG	CCAT	CAGGA		
ESV	CT	CCC	TACA	ACGAG	ATCAG	GATAA	CAGTC	AAG	CTGAGGG	CCAT	CAGGA		
EHNV	CT	CCC	TACA	ACGAG	ATCAG	GATAA	CAGTC	AAG	CTGAGGG	CCAT	CAGGA		
PPIV	CT	CCC	TACA	ACGAG	ATCAG	GATAA	CAGTC	AAG	CTGAGGG	CCAT	CAGGA		
REV	CT	CCC	TACA	AT	GAGATCAG	GATAA	CAGTC	AAG	CTGAGGG	CCAT	CAGGA		
BIV	CT	CCC	TACA	AT	GAAATCAG	GATAA	CAGTC	AAG	CTGAGGG	CCAT	CAGGA		
FV3	CT	CCC	TACA	ACGAG	ATCAG	GATAA	CAGTC	AAG	CTGAGGG	CCAT	CAGGA		
RTRV	CT	CCC	TACA	ACGAG	ATCAG	GATAA	CAGTC	AAG	CTGAGGG	CCAT	CAGGA		
SERV	CT	T	CC	TACA	ACGAG	ATCAG	GAT	CAG	GTC	AAG	CTGAGGG	CCAC	CAGGA

	651					700						
DFV	TCT	CCT	GATT	CTT	CAGCACA	AGACG	ACCGG	AGA	AAGTCAAG	CCA	AATCGTGG	
GV6	TCT	CCT	GATT	CTT	CAGCACA	AGACG	ACCGG	AGA	AAGTCAAG	CCA	AATCGTGG	
LMBV	TCT	CCT	GATT	CTT	CAGCACA	AGACG	ACCGG	AGA	AAGTCAAG	CCA	AATCGTGG	
ECV	CCT	CCT	GATC	CT	CAGCACA	ACACC	CAGG	GGCA	AATCAGC	CCC	AATCGTGG	
ESV	CCT	CCT	GATC	CT	CAGCACA	ACACC	CAGG	GGCA	AATCAGC	CCC	AATCGTGG	
EHNV	CCT	CCT	GATC	CT	CAGCACA	ACACC	CAGG	GGCA	AATCAGC	CCC	AATCGTGG	
PPIV	CCT	CCT	GATC	CT	CAGCACA	ACACC	CAGG	GGCA	ATTAGC	CCC	AATCGTGG	
REV	CCT	CCT	GATC	CT	CAGCACA	ACACC	CAGG	GGCA	AATCAGC	CCC	AATCGTGG	
BIV	CCT	CCT	GATT	CT	CAGCACA	ACACC	CAGG	GGCA	AATCAGC	CCC	AATCGTGG	
FV3	CCT	CCT	GATC	CT	CAGCACA	ACACC	CAGG	GGCA	AATCAGC	CCC	AATCGTGG	
RTRV	CCT	CCT	GATC	CT	CAGCACA	ACACC	CAGG	GGCA	AATCAGC	CCC	AATCGTGG	
SERV	TCT	CCT	GATT	CT	CAG	AACA	ACACC	CAGG	GGCA	AATCAGC	CCC	AATCGTGG

	701					750																								
DFV	CC	A	G	A	T	C	T	G	G	A	A	G	G	A	G	G	T	C	C	C	A	G	T	C	T	A	C			
GV6	CC	A	G	A	T	C	T	G	G	A	A	G	G	A	G	G	T	C	C	C	A	G	T	C	T	A	C			
LMBV	CC	A	G	A	T	C	T	G	G	A	A	G	G	A	G	G	T	C	C	C	A	G	T	C	T	A	C			
ECV	CC	G	C	C	G	A	C	C	T	CG	A	G	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	C	G	A	C	T	A	C
ESV	CC	G	C	C	G	A	C	C	T	CG	A	G	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	C	G	A	C	T	A	C
EHNV	CC	G	C	C	G	A	C	C	T	CG	A	G	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	C	G	A	C	T	A	C
PPIV	CC	G	C	C	G	A	C	C	T	CG	A	G	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	C	G	A	C	T	A	C
REV	CC	G	C	C	G	A	C	C	T	CG	A	G	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	C	G	A	C	T	A	C
BIV	CC	T	C	C	G	A	C	C	T	CG	G	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	C	G	A	C	T	A	C	
FV3	CC	T	C	C	G	A	C	C	T	T	G	C	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	C	G	A	C	T	A	C
RTRV	CC	T	C	C	G	A	C	C	T	CG	C	G	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	C	G	A	C	T	A	C
SERV	CC	G	C	C	G	A	C	C	T	CG	A	G	G	G	A	G	G	T	C	T	C	C	C	G	A	C	T	A	C	

751 800

DFV	ATGACTGTGG	GTCTGGTGAC	TGCCGCGAG	CGTCAGGCTA	TGAGCAGCTC
GV6	ATGACTGTGG	GTCTGGTGAC	TGCCGCGAG	CGTCAGGCTA	TGAGCAGCTC
LMBV	ATGACTGTGG	GTCTGGTGAC	TGCCGCGAG	CGTCAGGCTA	TGAGCAGCTC
ECV	ATGACCGTCG	GCCTCATCAC	CGGGGACGAG	AGGCAGGCCA	TGAGCAGCAC
ESV	ATGACCGTCG	GCCTCATCAC	CGGGGACGAG	AGGCAGGCCA	TGAGCAGCAC
EHNV	ATGACCGTCG	CCCTCATCAC	CGGGGACGAG	AGGCAGGCCA	TGAGCAGCAC
PPIV	ATGACCGTCG	CCCTCATCAC	CGGGGACGAG	AGGCAGGCCA	TGAGCAGCAC
REV	ATGACCGTCG	CCCTCATCAC	CGGGGACGAG	AGGCAGGCCA	TGAGCAGCAC
BIV	ATGACCGTCG	CCCTCATCAC	CGGGGACGAG	AGCAGGCCA	TGAGCAGCAC
FV3	ATGACCGTCG	CCCTCATCAC	CGGGGACGAG	AGCAGGCCA	TGAGCAGCAC
RTRV	ATGACCGTCG	CCCTCATCAC	CGGGGACGAG	AGGCAGGCCA	TGAGCAGCAC
SERV	ATGACCGTCG	GCCTCATCAC	CGGGGATGAG	AGCAGGCCA	TGAGCAGCAC

801 850

Rana MCP for

DFV	AGTCAGGGAC	ATGGTGGTGG	AGCAGATGCA	GATGGCTCCA	<u>GTCCACATGG</u>
GV6	AGTCAGGGAC	ATGGTGGTGG	AGCAGATGCA	GATGGCTCCA	<u>GTCCACATGG</u>
LMBV	AGTCAGGGAC	ATGGTGGTGG	AGCAGATGCA	GATGGCTCCA	<u>GTCCACATGG</u>
ECV	AGTCAGGGAC	ATGGTCGTGG	AGCAGGTGCA	GGCCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>
ESV	AGTCAGGGAC	ATGGTCGTGG	AGCAGGTGCA	GGCCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>
EHNV	AGTCAGGGAC	ATGGTCGTGG	AGCAGGTGCA	GGCCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>
PPIV	AGTCAGGGAC	ATGGTCGTGG	AGCAGGTGCA	GGCCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>
REV	AGTCAGGGAC	ATGGTCGTGG	AGCAGGTGCA	GGCCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>
BIV	AGTCAGGGAC	ATGGTGTGG	AGCAGGTGCA	GGCCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>
FV3	AGTCAGGGAC	ATGGTGTGG	AGCAGGTGCA	GGCCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>
RTRV	AGTCAGGGAC	ATGGTGTGG	AGCAGGTGCA	GGTCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>
SERV	AGTCAGGAC	ATGGTCGTGG	AGCAGGTGCA	GGCCGCCCA	<u>GTCCACATGG</u>

851 900

DFV	<u>TCAACCCAA</u>	GAACGCCACC	GTCTTTCACG	CCGACCTGCG	CTTTTCCAC
GV6	<u>TCAACCCAA</u>	GAACGCCACC	GTCTTTCACG	CCGACCTGCG	CTTTTCCAC
LMBV	<u>TCAACCCAA</u>	GAACGCCACC	GTCTTTCACG	CAGACCTGCG	CTTTTCCAC
ECV	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGGCC	ACCTTCCACA	CCGACATGCG	GTTCTCACAC
ESV	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGGCC	ACCTTCCACA	CCGACATGCG	GTTCTCACAC
EHNV	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGGCC	ACCTTCCACA	CCGACATGCG	GTTCTCACAC
PPIV	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGGCC	ACCTTCCACA	CCGACATGCG	GTTCTCACAC
REV	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGGCC	ACCTTCCACA	CCGACATGCG	GTTCTCACAC
BIV	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGGCC	ACCTTCCACA	CCGACATGAG	GTTCTCACAC
FV3	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGACC	ACCTTCCACA	CCGACATGCG	GTTCTCACAC
RTRV	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGGCC	ACCTTCCACA	CCGACATGCG	GTTCTCACAC
SERV	<u>TCAACCCAG</u>	GAACGCGGCA	ACTTTCCACA	CCGACATGCG	GTTCTCGCAC

	901					950
DFV	GCCGTCAAAG	CGCTGATGTT	TATGGTGCAA	AACGTCACTC	ACAAGTCTGT	
GV6	GCCGTCAAAG	CGCTGATGTT	TATGGTGCAA	AACGTCACTC	ACAAGTCTGT	
LMBV	GCCGTCAAAG	CGCTGATGTT	TATGGTGCAA	AACGTCACTC	ACAAGTCTGT	
ECV	GCAGTCAAGG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	
ESV	GCAGTCAAGG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	
EHNV	GCAGTCAAGG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	
PPIV	GCAGTCAAGG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	
REV	GCAGTCAAGG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	
BIV	GCAGTCAAGG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	
FV3	GCAGTCAAGG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	
RTRV	GCAGTCAAGG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	
SERV	TCTGTCAAAG	CCCTGATGTT	TATGGTGCAG	AACGTCACAC	ACCCTTCCGT	

	951			Sal I		1000
DFV	GGGTCCAAC	TACACTGCG	TCACTCCGT	TGTTGGAGCG	GGTAACACCG	
GV6	GGGTCCAAC	TACACTGCG	TCACTCCGT	TGTTGGAGCG	GGTAACACCG	
LMBV	GGGTCCAAC	TACACTGCG	TCACTCCGT	TGTTGGAGCG	GGTAACACCG	
ECV	CGGCTCCAAT	TACACCTGCG	CACTCCCGT	CGTGGGAGTC	GGCAACACGG	
ESV	CGGCTCCAAT	TACACCTGCG	CACTCCCGT	CGTGGGAGTC	GGCAACACGG	
EHNV	CGGCTCCAAT	TACACCTGCG	CACTCCCGT	CGTGGGAGTC	GGCAACACGG	
PPIV	CGGCTCCAAT	TACACCTGCG	TCACTCCCGT	CGTGGGAGTC	GGCAACACGG	
REV	CGGCTCCAAT	TACACCTGCG	TCACTCCCGT	CGTGGGAGTC	GGCAACACGG	
BIV	CGGCTCCAAT	TACACCTGCG	TCACTCCCGT	CGTGGGAGTC	GGCAACACGG	
FV3	CGGCTCCAAT	TACACCTGCG	TCACTCCCGT	CGTGGGAGTC	GGCAACACGG	
RTRV	CGGCTCCAAT	TACACCTGCG	TCACTCCCGT	CGTGGGAGTC	GGCAACACGG	
SERV	CGGCTCCAAC	TACACCTGCG	CACTCCCGT	CGTGGGAGCC	GACAACACTG	

	1001		BamH I		1050
DFV	TCCTGGAGCC	CGCCCTGGCC	GTCGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCTGTTGTG
GV6	TCCTGGAGCC	CGCCCTGGCC	GTCGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCTGTTGTG
LMBV	TCCTGGAGCC	CGCCCTGGCC	GTCGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCTGTTGTG
ECV	TCCTGGAGCC	AGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGTGC	CAGCCTGTTG
ESV	TCCTGGAGCC	AGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGTGC	CAGCCTGTTG
EHNV	TCCTGGAGCC	AGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCCTGTTG
PPIV	TCCTGGAGCC	AGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCCTGTTG
REV	TCCTGGAGCC	AGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCCTGTTG
BIV	TCCTGGAGCC	AGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCCTGTTG
FV3	TCCTGGAGCC	AGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCCTGTTG
RTRV	TCCTGGAGCC	AGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCCTGTTG
SERV	TCCTGGAGCC	GGCCCTGGCG	GTGGATCCCG	TCAAGAGCGC	CAGCCTGTTG

Sal I

	1051					1100
DFV	TACGAAAACA	CTACCAGGCT	TCCAGACATG	AGCGTAGAGT	ACTATTCCCT	
GV6	TACGAAAACA	CTACCAGGCT	TCCAGACATG	AGCGTAGAGT	ACTATTCCCT	
LMBV	TACGAAAACA	CTACCAGGCT	TCCAGACATG	AGCGTAGAGT	ACTATTCCCT	
ECV	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACCTG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	
ESV	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACCTG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	
EHNV	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACCTG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	
PPIV	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACATG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	
REV	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACATG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	
BIV	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACATG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	
FV3	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACATG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	
RTRV	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACATG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	
SERV	TACGAAAACA	CCACAAGGCT	CCCCGACATG	GGAGTCGAGT	ACTACTCGCT	

	1101					1150
DFV	GGTGCAGCCC	TGGTACTAAG	CACCCGCCAT	TCCCATCAGC	ACTGGGCACC	
GV6	GGTGCAGCCC	TGGTACTAAG	CACCCGCCAT	TCCCATCAGC	ACTGGGCACC	
LMBV	GGTGCAGCCC	TGGTACTAAG	CACCCGCCAT	TCCCATCAGC	ACTGGGCACC	
ECV	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACCGGGCACC	
ESV	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACCGGGCACC	
EHNV	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACCGGGCACC	
PPIV	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACCGGGCACC	
REV	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACCGGGCACC	
BIV	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACCGGGCACC	
FV3	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACCGGGCACC	
RTRV	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACCGGGCACC	
SERV	GGTGCAGCCC	TGGTACTATG	CCACCTCCAT	CCCAGTCAGC	ACTGGGCACC	

	1151		<i>Pst</i> I		<i>Bam</i> H I	1200
DFV	ACCTCTACTC	TTACGCCCTG	AGCCTCAACG	ATCCTCACC	TTCAGGGTCT	
GV6	ACCTCTACTC	TTACGCCCTG	AGCCTCAACG	ATCCTCACC	TTCAGGGTCT	
LMBV	ACCTCTACTC	TTACGCCCTG	AGCCTCAACG	ATCCTCACC	TTCAGGGTCT	
ECV	ACCTCTACTC	TTATGCCCTC	AGCCTGCAGG	ACCCCCACCC	ATCCGGATCC	
ESV	ACCTCTACTC	TTATGCCCTC	AGCCTGCAGG	ACCCCCACCC	ATCCGGATCC	
EHNV	ACCTCTACTC	TTATGCCCTC	AGCCTGCAGG	ACCCCCACCC	ATCCGGATCC	
PPIV	ACCTCTACTC	CTATGCCCTC	AGCCTGCAGG	ACCCCCACCC	ATCCGGATCC	
REV	ACCTCTACTC	CTATGCCCTC	AGCCTGCAGG	ACCCCCACCC	ATCCGGATCC	
BIV	ACCTCTACTC	TTATGCCCTC	AGCCTGCAGG	ACCCCCACCC	ATCCGGATCC	
FV3	ACCTCTACTC	TTATGCCCTC	AGCCTGCAGG	ACCCCCACCC	ATCCGGATCC	
RTRV	ACCTCTACTC	TTATGCCCTC	AGCATGCAGG	ACCCCCACCC	ATCCGGATCA	
SERV	ACCTCTACTC	TTATGCCCTC	AGCCTGCAGG	ACCCCCACCC	CTCAGGATCC	

	1201			Afl III		1250
DFV	ACCAATTTCG	GTCGCCTGAC	CAACGCAAGC	ATCA ⁷ ACGTGT	CTCTGTCTGC	
GV6	ACCAATTTCG	GTCGCCTGAC	CAACGCAAGC	ATCAACGTGT	CTCTGTCTGC	
LMBV	ACCAATTTCG	GTCGCCTGAC	CAACGCAAGC	ATCAACGTGT	CTCTGTCTGC	
ECV	ACCAATTACG	GCAGACTGAC	CAACGCCAGC	ATCAACGTCA	CCCTGTCCGC	
ESV	ACCAATTACG	GCAGACTGAC	CAACGCCAGC	ATCAACGTCA	CCCTGTCCGC	
EHN	ACCAATTACG	GCAGACTGAC	CAACGCCAGC	CTTAACGTCA	CCCTGTCCGC	
PPIV	ACCAATTACG	GCAGACTGAC	CAACGCCAGC	CTTAACGTCA	CCCTGTCCGC	
REV	ACCAATTACG	GCAGACTGAC	CAACGCCAGC	CTTAACGTCA	CCCTGTCCGC	
BIV	ACCAATTACG	GCAGACTGAC	CAACGCCAGC	CTTAACGTCA	CCCTGTCCGC	
FV3	ACCAATTACG	GTAGACTGAC	CAACGCCAGC	CTTAACGTCA	CCCTGTCCGC	
RTRV	ACCAATTACG	GCAGACTGAC	CAACGCCAGC	CTTAACGTCA	CCCTGTCCGC	
SERV	ACCAATTACG	GCAGACTGAC	CAACGCCAGC	ATCAACGTCA	CACTGTCCGC	

	1251					1300
DFV	CGAGGCCCGA	ACTGCCGCCG	GAGGAGGAGG	GGCAGACAAC	TCTGGGTACA	
GV6	CGAGGCCCGA	ACTGCCGCCG	GAGGAGGAGG	GGCAGACAAC	TCTGGGTACA	
LMBV	CGAGGCCCGA	ACTGCCGCCG	GAGGAGGAGG	GGCAGACAAC	TCTGGGTACA	
ECV	TGAGGCCGCC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGCGG	AGGCAACAAC	TCTGGGTACA	
ESV	TGAGGCCGCC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGCGG	AGGCAACAAC	TCTGGGTACA	
EHN	TGAGGCCACC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGCGG	AGGCGACAAC	TCTGGGTACA	
PPIV	TGAGGCCACC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGCGG	AGGTGACAAC	TCTGGGTACA	
REV	TGAGGCCACC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGCGG	AGGTGACAAC	TCTGGGTACA	
BIV	TGAGGCCACC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGCGG	AGGTGACAAC	TCTGGGTACA	
FV3	TGAGGCCACC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGTGG	AGGTAACAAC	TCTGGGTACA	
RTRV	TGAGGCCACC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGCGG	AGGTGACAAC	TCTGGGTACA	
SERV	AGAGGCCGCC	ACGGCCGCCG	CAGGAGGCGG	AGGCAACAAC	TCTGGGTACA	

	1301			Rana MCP rev		1350
DFV	AAAACCCTCA	GAAATACGCC	CTGGTGGTCA	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
GV6	AAAACCCTCA	GAAATACGCC	CTGGTGGTCA	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
LMBV	AAAACCCTCA	GAAATACGCC	CTGGTGGTCA	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
ECV	CCACCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCATCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
ESV	CCACCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCATCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
EHN	CCACCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCATCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
PPIV	CCACCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCGTCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
REV	CCACCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCATCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
BIV	CCACCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCATCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
FV3	CCACCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCATCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
RTRV	CCACCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCATCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	
SERV	CCGCGCCCA	AAAGTACGCC	CTCATCGTTC	TGGCCATCAA	CCACAACATT	

```

1351                                     1392
DFV ATCCGCATCA TGAACGGTTC CATGGGTTTC CCCATTCTGT AA
GV6 ATCCGCATCA TGAACGGTTC CATGGGTTTC CCCATTCTGT AA
LMBV ATCCGCATCA TGAACGGTTC CATGGGTTTC CCCATTCTGT AA
ECV ATCCGCATCA TGAACGGGCTC GATGGGATTC CCAATCTTGT AA
ESV ATCCGCATCA TGAACGGGCTC GATGGGATTC CCAATCTTGT AA
EHNV ATCCGCATCA TGAACGGGCTC GATGGGATTC CCAATCTTGT AA
PIIV ATCCGCATCA TGAACGGGCTC GATGGGATTC CCAATCTTGT AA
REV ATCCGCATCA TGAACGGGCTC GATGGGATTC CCAATCTTGT AA
BIV ATCCGCATCA TGAACGGGCTC GATGGGATT CCAATCTTGT AA
FV3 ATCCGCATCA TGAACGGGCTC GATGGGATTC CCAATCTTGT AA
RTRV ATCCGCATCA TGAACGGGCTC GATGGGATTC CCAATCTTGT AA
SERV ATCCGCATCA TGAACGGTTC GATGGGATTC CCAATCTTGT AA

```

Abbildung 22: Sequenzvergleich (engl. multiple alignment) der MCP-Gen-Nukleotidsequenz

In Abbildung 22 abgebildet ist ein Sequenzvergleich (engl. multiple alignment) des MCP-Gens (1392 bp) der Ranaviren DFV, GV6, LMBV, ECV, ESV, EHNV, PPIV, REV, BIV, FV3, RTRV und SERV, erstellt mit der Software GCG-X-Win32, v.11.1.3. UNIX (Accelrys Inc.). Farblich unterlegt sind von den Nukleotidsequenzen der restlichen Ranaviren abweichende Nukleotide. Die Positionen der PAN-RANA-MCP PCR Primer Rana MCP for & rev sind besonders gekennzeichnet (fettgedruckt/unterstrichen). Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen des PAN-RANA-MCP PCR-Produktes (*Afl* III, *Pst* I, *Bam*H I, *Sal* I) sind oberhalb bzw. unterhalb der Nukleotidsequenzabschnitte eingezeichnet. Die entsprechenden Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind in roter Schrift abgesetzt.

5.8.2 Phylogenese des Genus *Ranavirus*

Die identifizierten Nukleotidsequenzen des MCP-Gens der Ranaviren (Abb. 22) wurden mit den entsprechenden publizierten Daten verglichen, Verwandtschaftsverhältnisse wurden rekonstruiert und als phylogenetischer Baum dargestellt.

Das in Abbildung 23 dargestellte Phylogramm der Vertreter des Genus *Ranavirus* ermöglicht eine Einschätzung der phylogenetischen Verwandtschaft der Viren untereinander. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Viren sind farblich gekennzeichnet. Bei den zusätzlich in den phylogenetischen Stammbaum aufgenommenen Ranaviren handelt es sich um in der GenBank publizierte Sequenzdaten von Erregern des Genus *Ranavirus* (siehe Anhang 3).

Die Stammbäume wurden in entsprechenden Parsimony-Analysen in Paupsearch der Software GCG-X-Win32, v.11.1.3. UNIX (Accelrys Inc.) erstellt. Bei den an jeder Abzweigung angegebenen Zahlen handelt es sich um Bootstrap-Werte. Diese Bootstrap-Werte entsprechen Signifikanzniveaus, die die statistische Verlässlichkeit der jeweiligen Abzweigungen angeben. Es handelt sich dabei nicht um prozentuale Angaben einer Sequenzhomologie. Bootstrap-Werte über 90 stehen für eine hohe Signifikanz der Maximum-Parsimony-Stammbaumrekonstruktion. Die Bootstrap-Analysen wurden jeweils mit wenigstens 100 Replikationen durchgeführt.

Basierend auf den phylogenetischen Analysen des MCP-Gens ergibt sich eine Einteilung der Erreger des Genus *Ranavirus* in drei Gruppen (Abb. 23).

Deutlich von den Ranaviren abgegrenzt ist die Gruppe mit den Vertretern GIV (AY666015) und SGIV (AY521625). Beide Erreger sind mit einer Identität des MCP-Gens von 98,35 % eng miteinander verwandt. Die Abweichung in der MCP-Sequenzhomologie dieser beiden Viren zu der großen FV3 beinhaltenden *Ranavirus*-Gruppe ist mit wenigstens ca. 69,3 % (SGIV und FV3) noch stärker als die der Santee-Cooper Ranaviren.

Das Phylogramm verdeutlicht in einer zweiten Gruppe die Abgrenzung der Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV von den restlichen analysierten Ranaviren. Die Identität der MCP-Nukleotidsequenzen beträgt 100 % für das DFV und das GV6 bzw. 99,2 % für DFV/ GV6 im Vergleich zum LMBV. Im Vergleich zu den anderen analysierten Ranaviren ergibt sich eine MCP-Gensequenzhomologie von minimal 70,3 % (DFV und GV6 im Vergleich zu GIV) bis maximal 78,5 % im Vergleich zum ECV/ ESV bzw. PPIV.

Somit repräsentieren die Santee-Cooper Ranaviren eine eigenständige Gruppe innerhalb des Genus *Ranavirus*.

Die dritte Gruppe innerhalb dieses Genus umfasst die Ranaviren SERV, ESV, ECV, EHNV, PPIV, RTRV, BIV, FV3 und REV, zusammen mit den Viren ATV (NC005832), *Ambystoma Tigrinum Stebbensi Virus* (AY150217), *Tiger Frog Virus* (AF389451, AY033630) und *Soft-shelled Turtle Iridovirus* (STIV, DQ335253).

Innerhalb dieser Gruppe beträgt die Identität 100 % (ESV und ECV) bis 98,9 % (EHNV und ESV/ECV; Tab. 11). Dem SERV obliegt eine Sonderstellung innerhalb dieser Gruppe, da es sich im Vergleich zu den restlichen genannten Viren in seiner MCP-Sequenz stärker unterscheidet. Die MCP-Sequenzhomologie beträgt wenigstens ca. 93,7 % für das SERV und das Ambystoma Tigrinum Stebbensi Virus (AY150217). Die maximale Übereinstimmung der MCP-Nukleotidsequenz des SERV ergibt sich mit 95,7 % im Vergleich zu ECV/ESV (Tab. 11). Basierend auf Homologievergleichen der MCP-Nukleotidsequenz wurde eine Zugehörigkeit des STIV zum Genus Ranavirus gezeigt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurde eine eindeutige Zugehörigkeit des GIV und SGIV zum Genus Ranavirus gezeigt.

Genus: Ranavirus

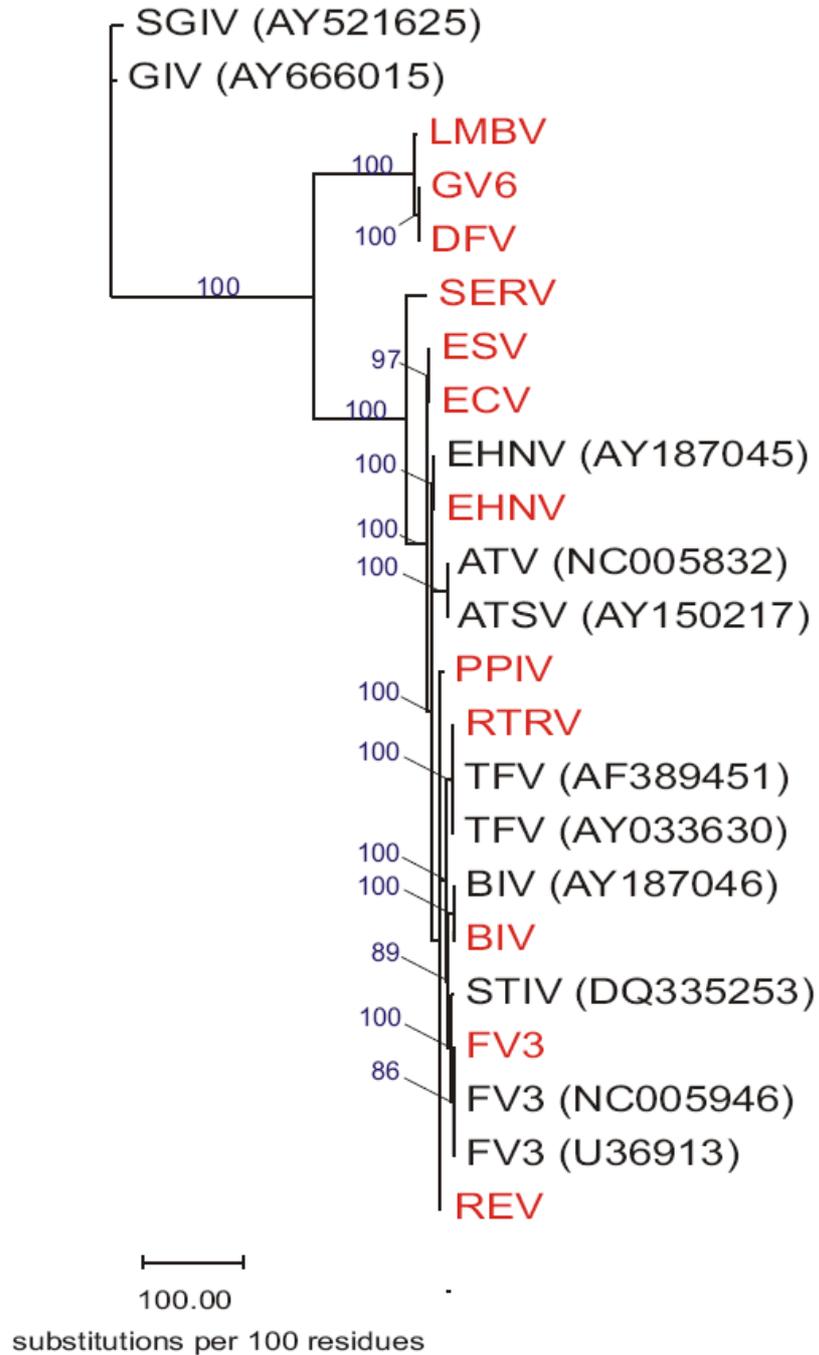


Abbildung 23: Phylogramm Genus *Ranavirus*

Dieser Stammbaum wurde durch eine Parsimony-Analyse der MCP-Nukleotidsequenz folgender Ranaviren erstellt: LMBV, GV6, DFV, SERV, ESV, ECV, EHNV, PPIV, RTRV BIV, FV3 und REV, sowie zusätzlich der Viren SGIV (*Singapore grouper Iridovirus*, AY521625), GIV (*Grouper Iridovirus*, AY666015), EHNV (AY187045), ATV (*Ambystoma tigrinum Virus*, NC005832), ATSV* (*Ambystoma tigrinum stebbensi Virus*, AY150217), TFV (*Tiger frog Virus*, AF389451, AY033630), BIV (AY187046), STIV* (*Soft-shelled turtle Iridovirus*, DQ335253), sowie FV3 (NC005946, U36913). Die Zahlen entsprechen den jeweiligen Bootstrap-Werten. Die im Rahmen dieser Dissertation analysierten und in der MCP-Gensequenz identifizierten Ranaviren sind rot dargestellt. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden die Namen der Erreger abgekürzt, es handelt sich bei den mit * gekennzeichneten Abkürzungen jedoch nicht um offiziell anerkannte Abkürzungen.

Um die Stellung der analysierten Ranaviren und insbesondere der Santee-Cooper Ranaviren und der Viren GIV (AY666015) sowie SGIV (AY521625) in Relation zu den anderen Genera der Familie *Iridoviridae* zu setzen, wurde ein Stammbaum der Erreger aller fünf Genera erstellt (Abb. 24). Berücksichtigt wurden alle in der internationalen Datenbank verfügbaren MCP-Sequenzen der Iridoviren. Somit wurden in die Analyse zusätzlich ein Chloriridovirus, sechs Lymphocystiviren, sechs Vertreter des Genus *Iridovirus* sowie insgesamt 44 Viren des Genus *Megalocytyvirus* einbezogen. Eine Übersicht aller Viren und der zugehörigen GenBank Sequenznummern ist aus Anhang 3 zu entnehmen. Das in Abbildung 24 dargestellte Phylogramm der Familie der Iridoviridae basiert auf dem Vergleich der jeweils vollständigen MCP-Gensequenz. Die Länge des entsprechenden MCP-Gens variiert von 1362 bp (Genus: *Megalocytyvirus*) bis 1455 bp (Genus: *Iridovirus*).

Die Erreger des Genus *Megalocytyvirus* stellen sich im Phylogramm als eine einheitliche, klar von den anderen Genera abgegrenzte Gruppe dar. Alle *Megalocytyviren* haben eine MCP-Nukleotidsequenzlänge von 1362 nt und die Homologie der MCP-Sequenzen untereinander beträgt wenigstens 93,3 % zwischen Dwarf Gourami Iridovirus (DGIV, AY285744) und Rock Bream Iridovirus (RBIV, AY532611) bzw. Korean Flounder Iridovirus (KFIV, AY633986) und maximal 99,6 % zwischen RBIV (AY532611) und Turbot Reddish Body Iridovirus (TRBIV, AY590687) bzw. KFIV (AY633988, AY633987). Die Sequenzhomologie der *Megalocytyviren* zu den anderen Genera der Familie *Iridoviridae* liegt bei ca. 50 %, wobei die höchsten Homologiewerte im Vergleich mit den Ranaviren erreicht werden (56,6 %).

Die Genera *Ranavirus*, *Iridovirus*, *Chloriridovirus* und *Lymphocystivirus* sind weniger deutlich voneinander abzugrenzen wie der Genus *Megalocytyvirus*, eine Einteilung in die verschiedenen Genera lässt sich dennoch vornehmen.

Die Vertreter des Genus *Iridovirus* unterscheiden sich in der Länge ihres MCP-Gens. Diese variiert von 1389 bp (Costelytra Zealandica Iridescent Virus, CZIV, AF025775) bis 1455 bp (Wiseana Iridescent Virus, WIV, AF025774). Die weniger einheitliche Gruppe von Vertretern des Genus *Iridovirus* mit im Phylogramm benachbarten Lymphocysti- und Chloriridoviren lässt sich von der Gruppe der Ranaviren inklusive der Viren GIV (AY666015) sowie SGIV (AY521625) unterscheiden.

Die Sequenzhomologie des MCP-Gens der Ranaviren im Vergleich zum MCP-Gen der Genera *Lymphocystivirus*, *Iridovirus* und *Chloriridovirus* variiert von 47,7 % zwischen RTRV und Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV6, M99395, Genus *Iridovirus*) bis 56,8 % zwischen SGIV und Lymphocystis Disease Virus (LCDV, AY297741, Genus *Lymphocystivirus*).

Das MCP-Gen der Lymphocystiviren hat eine einheitliche Länge von 1380 bp, das MCP-Gen der Chloriridoviren eine Länge von 1401 bp. Das Grouper Iridovirus sowie das Singapore Grouper Iridovirus besitzen jedoch wie alle Ranaviren ein MCP-Gen mit einer Länge von 1392 bp, was eine nahe Verwandtschaft mit den Ranaviren bestätigt. Jedoch bilden diese beiden Viren, bezogen auf das MCP-Gen, eine eigenständige Gruppe innerhalb des Genus *Ranavirus*.

GIV und SGIV sind in ihrer MCP-Gensequenz 98,4 % identisch. Im Vergleich zu anderen Ranaviren wurden Homologiewerte von 69,3 % (SGIV und FV3) bis 71,3 % (GIV und LMBV) ermittelt. Gleiches gilt für die Gruppe der Santee-Cooper Ranaviren (Kap.5.6.2.). Die Santee-Cooper Ranaviren GV6, DFV und LMBV sowie die Erreger GIV und SGIV sind entsprechend den vorliegenden Analysen mit den Ranaviren eng verwandt. Jedoch bilden sie innerhalb des Genus *Ranavirus* eigenständige Gruppen. Derzeit werden die Erreger innerhalb des Genus *Ranavirus* verschiedenen Spezies zugeordnet: 1) *Ambystoma Tigrinum Virus* mit *Ambystoma Tigrinum Virus* und *Regina Ranavirus*; 2) *Bohle Iridovirus*; 3) *Epizootisches Hämato-poetisches Nekrose Virus*; 4) *European Catfish Virus* mit *European Catfish* und *European Sheatfish Virus*; 5) *Frog Virus 3* mit *Box Turtle Virus*, *Bufo Bufo Virus 3*, *Bufo Marinus Venezuelan Iridovirus 1*, *Frog Virus 3*, *Lucké Triturus Virus 1*, *Rana Temporaria United Kingdom Virus*, *Redwood Park Virus*, *Stickleback Virus*, *Tadpole Edema Virus*, *Tadpole Virus 2*, *Tiger Frog Virus* und *Tortoise Virus 5* sowie 5) *Santee-Cooper Ranavirus* mit *Doctor Fish Virus*, *Guppy Virus* und *Santee-Cooper Ranavirus (Largemouth Bass Virus)*.

Tendenzielle Spezies innerhalb des Genus *Ranavirus* sind das *Rana Esculenta Iridovirus*, das *Singapore Grouper Iridovirus* sowie das *Testudo Iridovirus*. Zu den Kriterien der taxonomischen Einteilung der Ranaviren zählen Profile des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus und der Proteine, das Wirtsspektrum sowie die Homologie viraler Proteine z.B. des Hauptstrukturproteins MCP. Erreger einer Gruppe sollten in ihren Proteinsequenzen mindestens zu 95 % homolog sein.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen und den Kriterien zur Taxonomie der Ranaviren ist eine Unterteilung des Genus *Ranavirus* in folgende Gruppen vorzuschlagen: I) *Grouper Iridovirus* mit GIV und SGIV, II) *Santee-Cooper Iridovirus* mit LMBV, GV6 und DFV sowie III) *Frog Virus 3* mit EHNV, ESV, ECV, ATV, ATSV, PPIV, RTRV, TFV, BIV, STIV, FV3 und REV. SERV ist tendenziell der letztgenannten Gruppe zuzuordnen.

Nach der derzeit bestehenden Taxonomie sind die Erreger *Box Turtle Virus*, *Bufo Bufo Virus 3*, *Bufo Marinus Venezuelan Iridovirus*, *Lucké Triturus Virus 1*, *Rana Temporaria United Kingdom Virus*, *Redwood Park Virus*, *Stickleback Virus*, *Tadpole Edema Virus*, *Tadpole Virus 2* und *Tortoise Virus* ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet. Analysen basierend auf den jeweiligen Nukleotidsequenzen des MCP-Gens oder weiterer Gene liegen hierzu aber noch nicht vor. Das *Testudo Iridovirus* ist taxonomisch noch nicht eindeutig klassifiziert und daher bis zur eindeutigen Charakterisierung ein tendenzieller Vertreter der Ranaviren.

Familie Iridoviridae

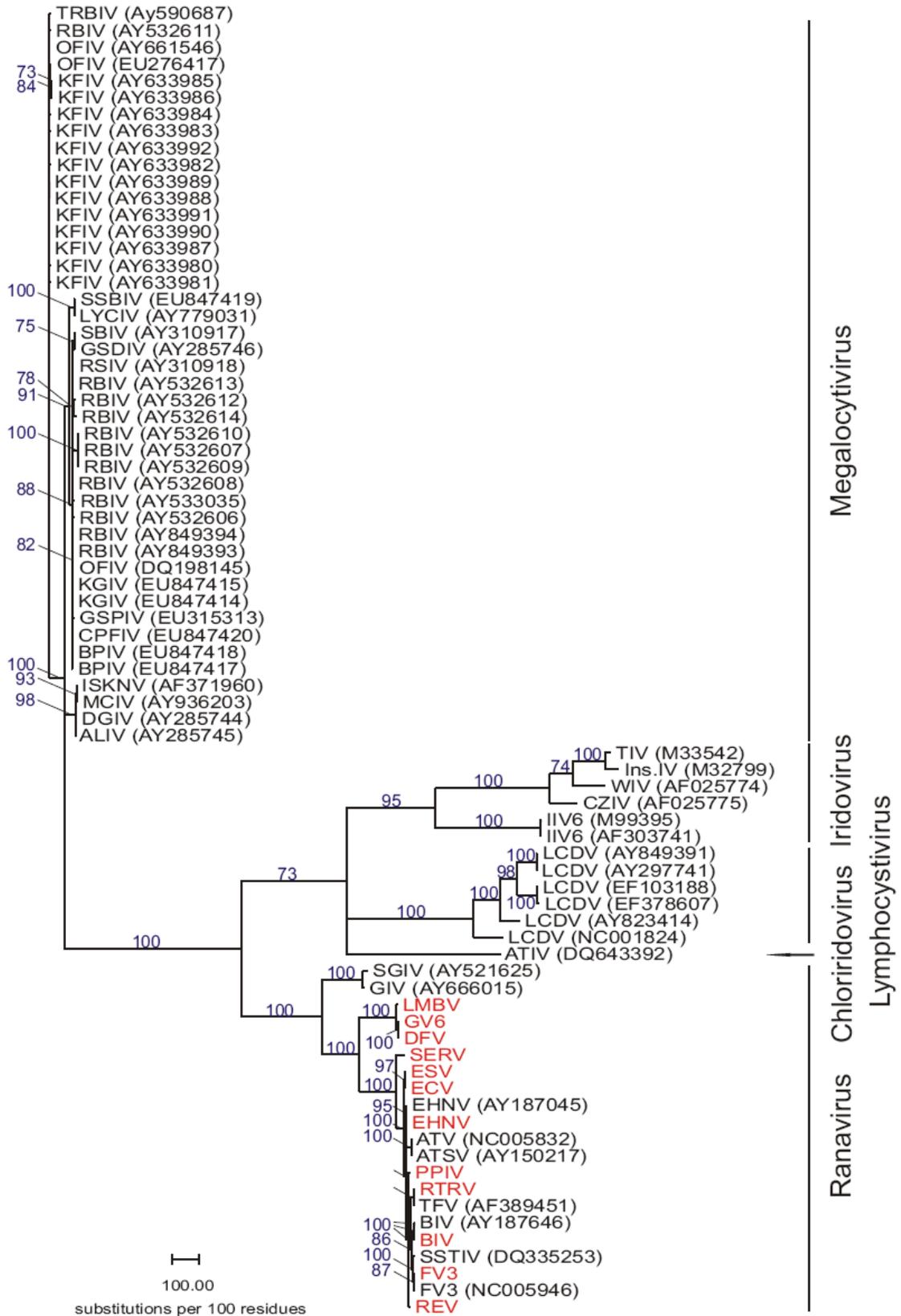


Abbildung 24: Phylogramm Familie *Iridoviridae*

Dieser Stammbaum wurde durch eine Parsimony-Analyse der MCP-Nukleotidsequenz von verschiedenen Erregern aller Genera der Familie *Iridoviridae* erstellt. Der Stammbaum der Erreger des Genus *Ranavirus* (Abb. 23) wurde durch Erreger der Genera *Megalocyctivirus*, *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus* ergänzt. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden die Namen der Erreger abgekürzt. Eine Tabelle der jeweiligen Erreger mit genauen Bezeichnungen ist in Anhang 3 zu finden. Die Zahlen entsprechen den jeweiligen Bootstrap-Werten. Farblich (rot) gekennzeichnet sind die im Rahmen dieser Dissertation analysierten Ranaviren.

5.9 Nachweis und Differenzierung aller Ranaviren mit der PAN-RANA-MCP PCR

Ziel der Sequenzanalysen war die Etablierung einer zuverlässigen diagnostischen PCR sowohl zur Erfassung aller analysierten Ranaviren einschließlich der Santee-Cooper Ranaviren als auch zur Differenzierung der Erreger nach Restriktionsendonukleaseverdau des PCR-Produktes. Im multiplen Vergleich der identifizierten MCP-Gensequenzen aller analysierten Ranavirusisolate wurden Bereiche mit identischer Nukleotidsequenz identifiziert und für die Ableitung universaler Primer (Rana MCP for & rev) genutzt (Abb. 22 und 26). Die Position dieser Primer bezogen auf die 1392 Nukleotide lange MCP-Sequenz der Ranaviren umfasst die Nukleotide 838 bis 857 (Rana MCP for) und 1353 bis 1332 (Rana MCP rev).

Das zu erwartende Produkt der PAN-RANA-MCP PCR hat eine Größe von 516 bp. In Abbildung 25 ist die elektrophoretische Auftrennung dieses amplifizierten MCP-Genbereiches (nt 838-1353) aller analysierten Ranaviren dargestellt. Die PCR erfolgte unter Verwendung der Primer Rana MCP for & rev. Damit ist ein Nachweis aller analysierten Ranaviren einschließlich der Santee-Cooper Ranaviren möglich. Diese PCR wurde für die Analyse der Proben von mit DFV und GV6 infizierten Fischen eingesetzt und ermöglichte so die korrekte Auswertung der Infektionsversuche mit diesen Viren.

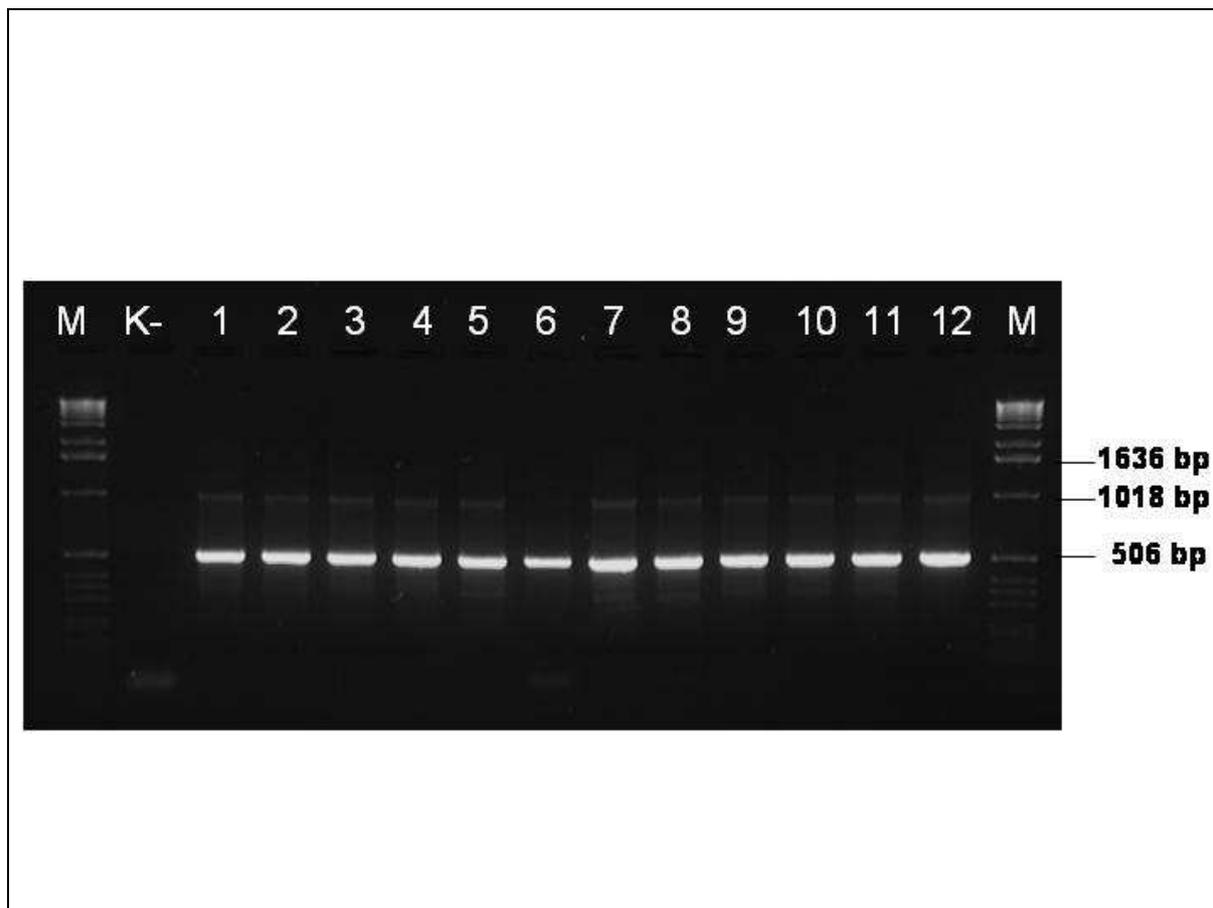


Abbildung 25: PCR PAN-RANA-MCP zum Nachweis aller Ranaviren

PAN-RANA-MCP PCR-Produkt (516 bp) des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), ECV (Nr. 4), PPIV (Nr. 5), FV3 (Nr. 6), REV (Nr. 7), RTRV (Nr. 8), SERV (Nr. 9), GV6 (Nr. 10), DFV (Nr. 11) und LMBV (Nr. 12) nach Amplifikation mit den Primern Rana MCP for & rev. Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

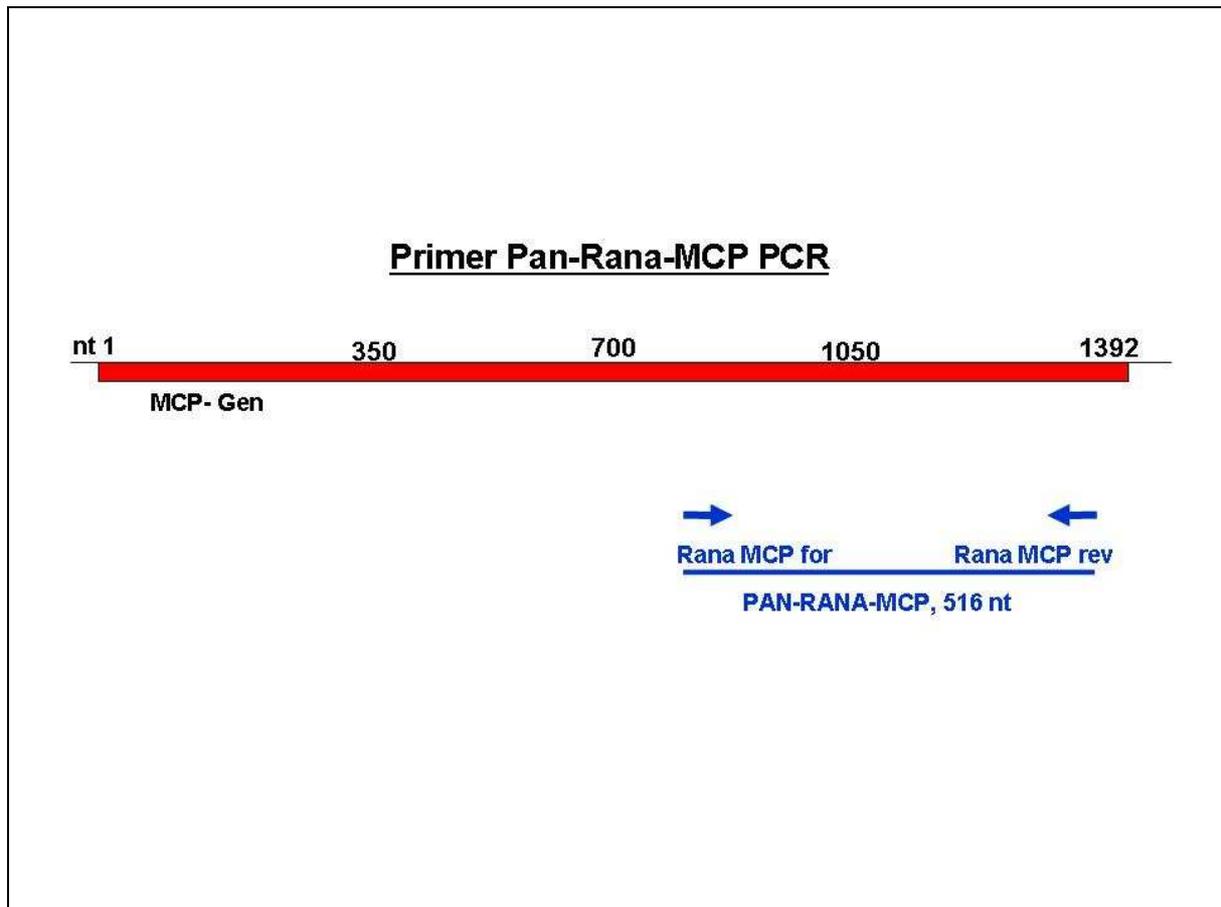


Abbildung 26: Position der Primer Rana MCP for & rev in Relation zum MCP-Gen

Schematische Darstellung des MCP-Gens und entsprechender Primerpositionen zur Amplifikation des 516 bp umfassenden PAN-RANA-MCP Genabschnittes der Ranaviren.

5.10 Restriktionsanalyse der PAN-RANA-MCP PCR-Produkte

Zur weiteren Differenzierung der Ranaviren ist es möglich, das PAN-RANA-MCP PCR-Produkt mit spezifischen Restriktionsendonukleasen zu verdauen. Nach vergleichenden Nukleotidsequenzanalysen wurden die Restriktionsenzyme *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I und *Afl*III zur Unterscheidung der verschiedenen Ranavirusisolate ausgewählt. Die resultierenden Spaltmuster sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Spaltanalyse PAN-RANA-MCP PCR

Virus	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	<i>Afl</i> III	<i>Sal</i> I
EHN V	186/ 172/ 158	341/ 175	516	365/ 151
BIV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
ESV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
ECV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
PPIV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
FV3	358/ 158	341/ 175	516	516
REV	186/ 172/ 158	341/ 175	516	516
RTRV	330/ 186	516	516	516
SERV	358/ 158	341/ 175	516	332/ 184
DFV	516	516	398/ 118	516
GV6	516	516	398/ 118	516
LMBV	516	516	398/ 118	516

Aufgeführt sind die Spaltprodukte in Anzahl der Basenpaare, welche nach Spaltung des PAN-RANA-MCP PCR Produktes mit den abgebildeten Restriktionsendonukleasen entstehen. Farblich unterlegt sind Spaltmuster, die eine eindeutige Identifizierung des jeweiligen Ranavirus erlauben.

Ziel der Restriktionsanalyse des PAN-RANA-MCP PCR-Produktes war die Entwicklung einer Methode zur schnellen und einfachen Differenzierung der verschiedenen analysierten Ranaviren. Durch Kombination der Restriktionsenzyme *BamH* I, *Sal* I, *Pst* I und *Afl* III können die Viren EHNV, FV3, RTRV, SERV sowie die Santee-Cooper Ranaviren eindeutig von den restlichen Ranaviren (BIV, ESV, ECV, PPIV und REV) unterschieden und identifiziert werden. Eine eindeutige Identifizierung der Santee-Cooper Ranaviren und der Ranaviren BIV, ESV, ECV, PPIV und REV ist mit dieser Methode nicht möglich und kann nur über die direkte Sequenzierung des jeweiligen PAN-RANA-MCP PCR-Produktes erfolgen. Zu beachten ist jedoch, dass die Nukleotidsequenz des gesamten MCP-Gens sowohl des DFV und GV6 als auch des ESV und ECV 100 % identisch ist. In den nachfolgenden Abschnitten sind die Ergebnisse zur Differenzierung der Ranaviren basierend auf dem Restriktionsendonukleaseverdau der PAN-RANA-MCP PCR-Produkte dargestellt.

5.10.1 Spaltmuster *BamH* I

Das PAN-RANA-MCP PCR-Produkt des EHNV, BIV, ESV, ECV, PPIV und REV wird durch *BamH* I in drei Fragmente mit einer Größe von 186, 172 und 158 bp gespalten. Davon zu unterscheiden sind mit jeweils nur einer Schnittstelle die *BamH* I Spaltprodukte des FV3 und SERV (358/ 158 bp) bzw. RTRV (330/ 186 bp). Die Santee-Cooper Viren GV6, DFV und LMBV weisen keine *BamH* I Schnittstelle in diesem Bereich auf und das PCR Produkt bleibt somit unverändert (Abb. 27).

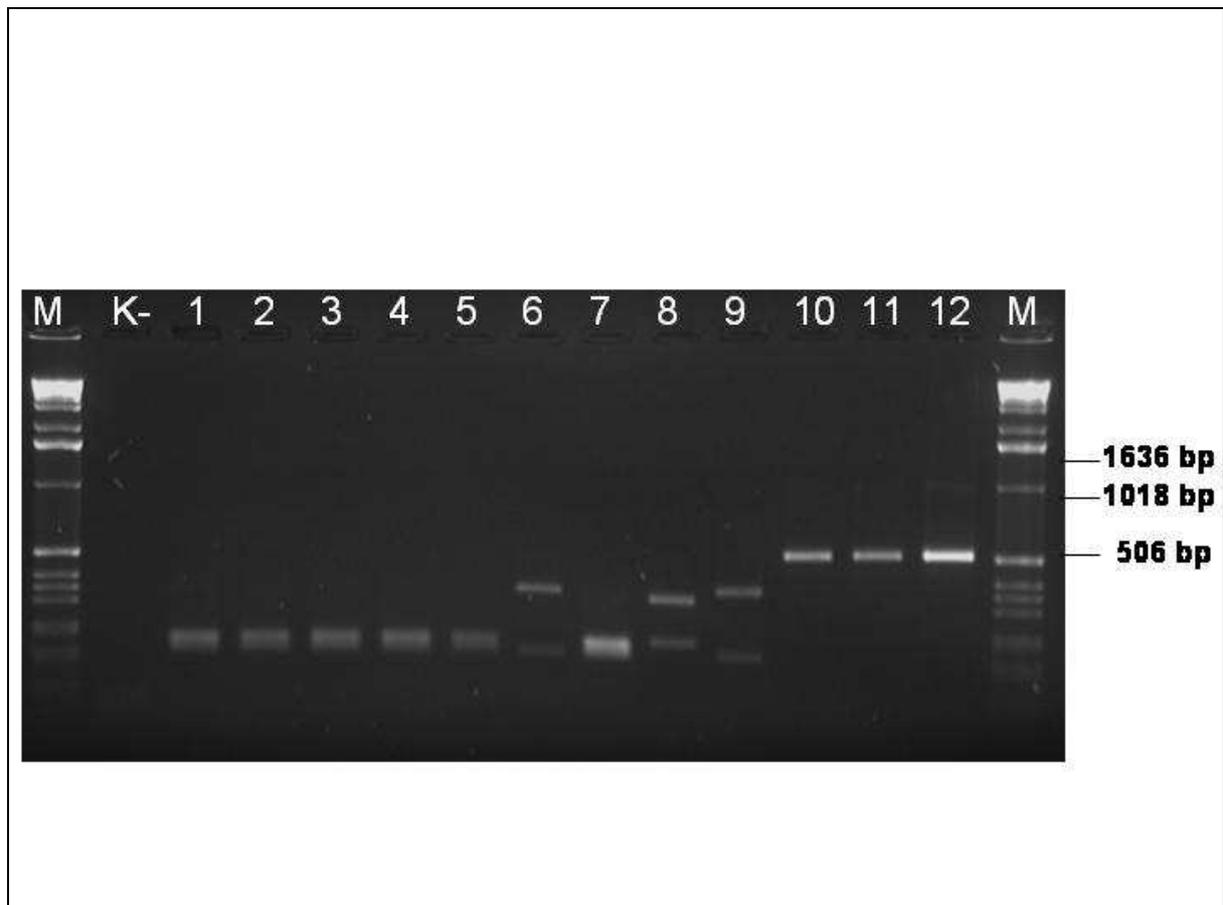


Abbildung 27: PCR-Produkt PAN-RANA-MCP nach Spaltung mit *BamH* I

PAN-RANA-MCP PCR-Produkt (516 bp) des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), ECV (Nr. 4), PPIV (Nr. 5), FV3 (Nr. 6), REV (Nr. 7), RTRV (Nr. 8), SERV (Nr. 9), GV6 (Nr. 10), DFV (Nr. 11) und LMBV (Nr. 12) nach Spaltung mit *BamH* I. Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

5.10.2 Spaltmuster *Sa*/I

Eine Spaltung des PAN-RANA-MCP PCR-Produktes mit *Sa*/I ist lediglich für das Produkt des EHNV und des SERV möglich. Alle anderen PCR-Produkte bleiben ungespalten. Das entsprechende PCR-Produkt des EHNV wird in zwei Fragmente (365/ 151 bp) gespalten, während das homologe Produkt des SERV in zwei Fragmente anderer Größe gespalten wird (332/ 184 bp). Auf diese Weise ist eine eindeutige Identifizierung und Differenzierung des EHNV und SERV möglich (Abb. 28).

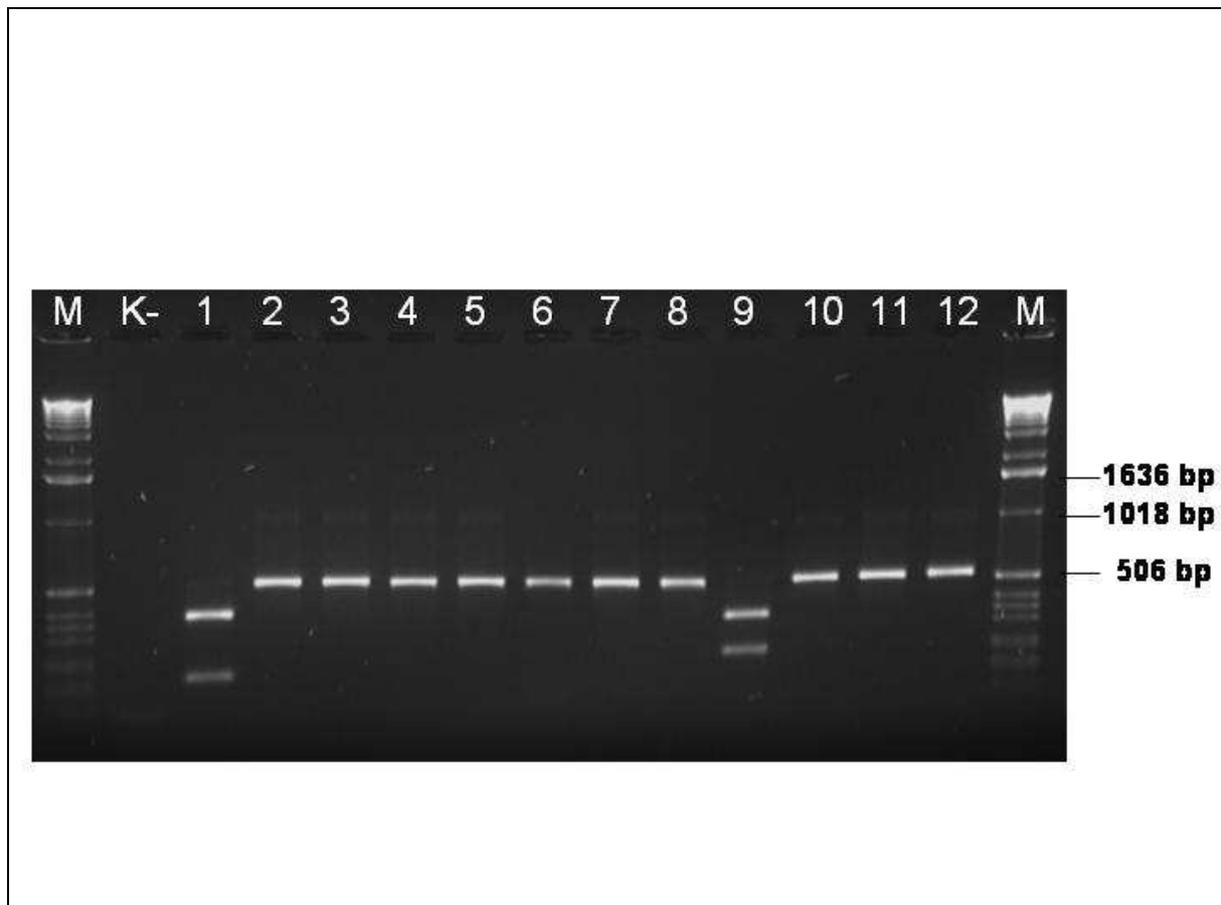


Abbildung 28: PCR-Produkt PAN-RANA-MCP nach Spaltung mit *Sa*/I

PAN-RANA-MCP PCR-Produkt (516 bp) des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), ECV (Nr. 4), PPIV (Nr. 5), FV3 (Nr. 6), REV (Nr. 7), RTRV (Nr. 8), SERV (Nr. 9), GV6 (Nr. 10), DFV (Nr. 11) und LMBV (Nr. 12) nach Spaltung mit *Sa*/I. Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

5.10.3 Spaltmuster *Pst* I

Die Restriktionsendonuklease *Pst* I spaltet das PAN-RANA-MCP PCR-Produkt des EHNV, BIV, ESV, ECV, PPIV, FV3, REV und SERV an Nukleotid-Position 341. Infolge entstehen zwei Fragmente mit einer Größe von 341 und 175 bp. Eine entsprechende Erkennungssequenz ist in diesem Genbereich des RTRV, GV6, DFV und LMBV nicht vorhanden. Das PAN-RANA-MCP PCR-Produkt wird in diesem Fall nicht gespalten (Abb. 29).

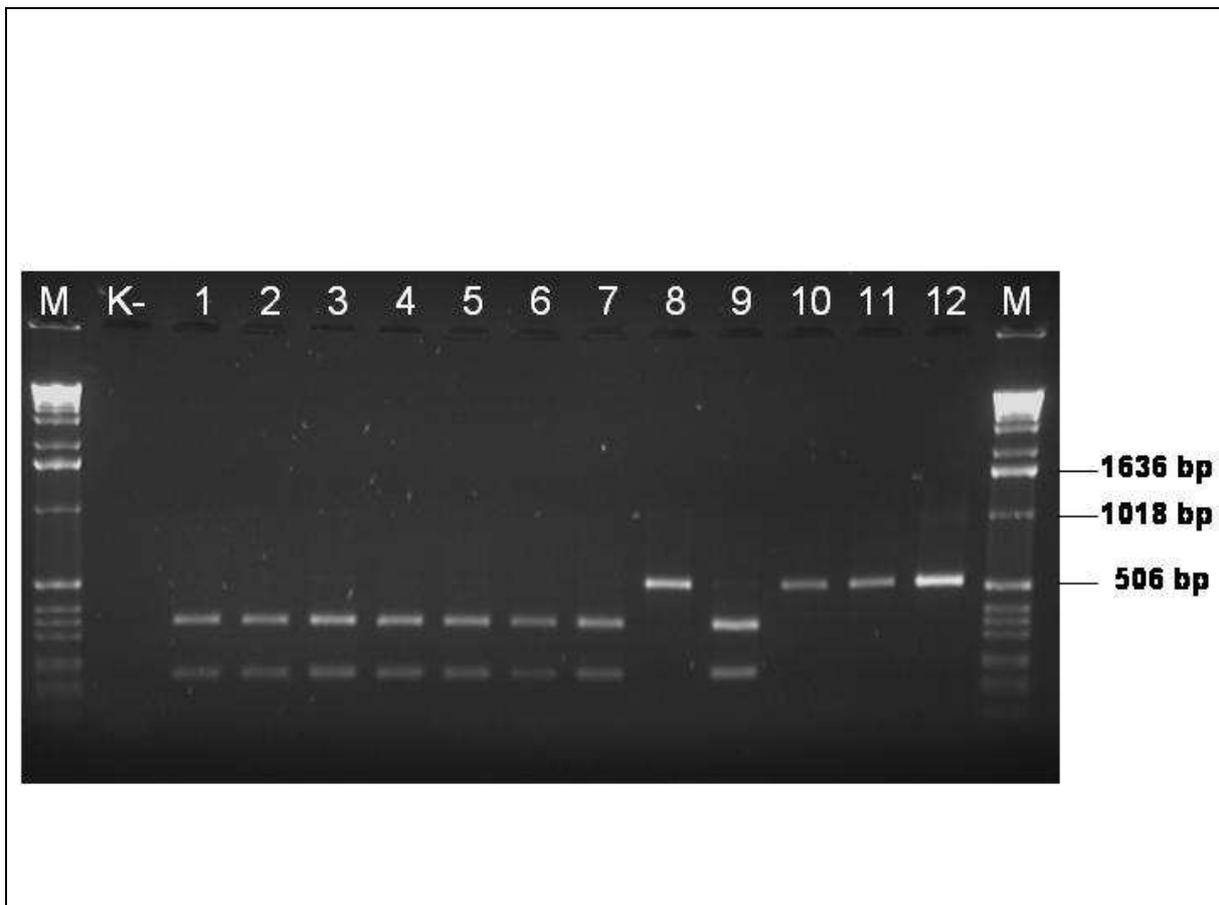


Abbildung 29: PCR-Produkt PAN-RANA-MCP nach Spaltung mit *Pst* I

PAN-RANA-MCP PCR-Produkt (516 bp) des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), ECV (Nr. 4), PPIV (Nr. 5), FV3 (Nr. 6), REV (Nr. 7), RTRV (Nr. 8), SERV (Nr. 9), GV6 (Nr. 10), DFV (Nr. 11) und LMBV (Nr. 12) nach Spaltung mit *Pst* I. Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

5.10.4 Spaltmuster *Afl* III

Afl III ist im Rahmen dieser Spaltanalyse die einzige Restriktionsendonuklease, die das PAN-RANA-MCP PCR-Produkt der Santee-Cooper Ranaviren spaltet. Die resultierenden Fragmente haben eine Größe von 398 und 118 bp. Es erfolgt keine Spaltung der Produkte der anderen Viren (Abb. 30).

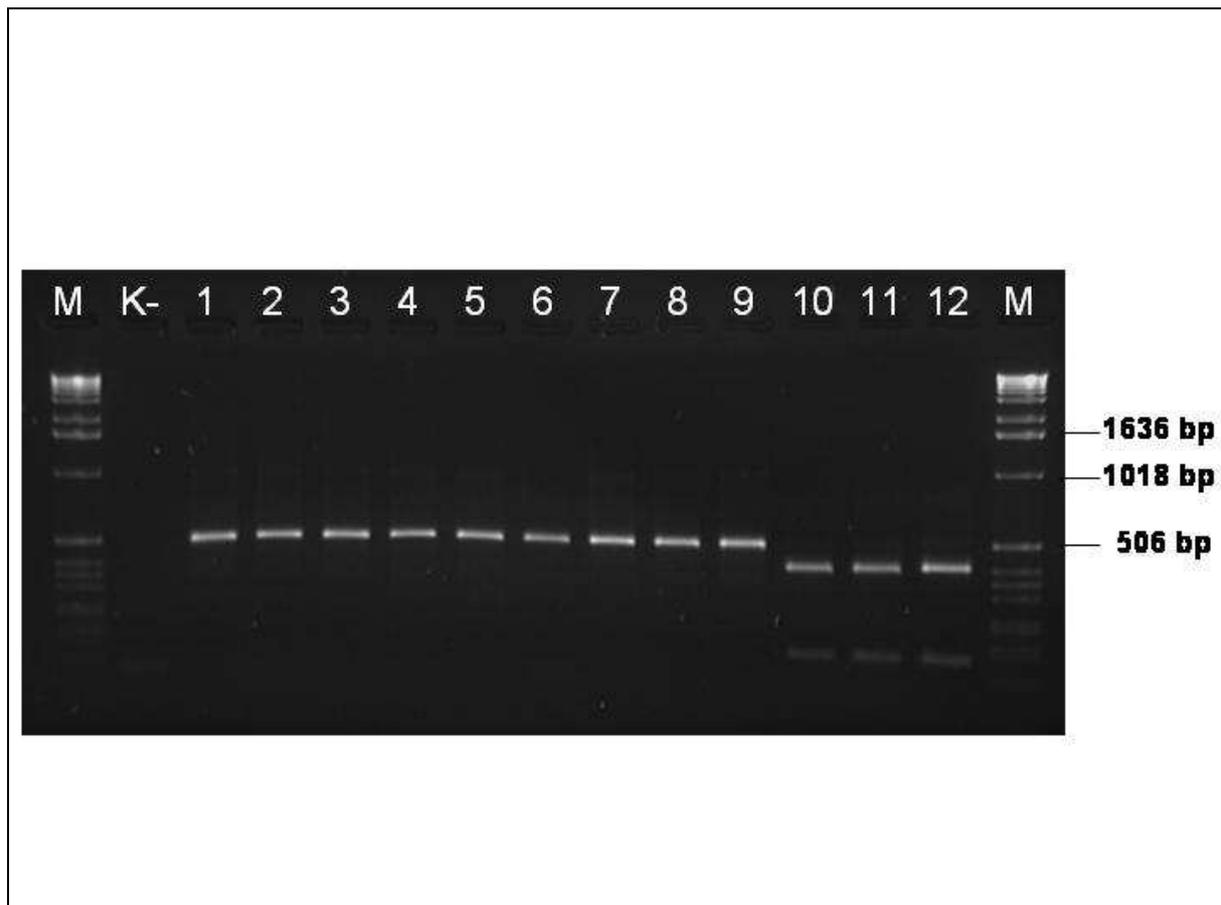


Abbildung 30: PCR-Produkt PAN-RANA-MCP nach Spaltung mit *Afl* III

PAN-RANA-MCP PCR-Produkt (516 bp) des EHNV (Nr. 1), BIV (Nr. 2), ESV (Nr. 3), ECV (Nr. 4), PPIV (Nr. 5), FV3 (Nr. 6), REV (Nr. 7), RTRV (Nr. 8), SERV (Nr. 9), GV6 (Nr. 10), DFV (Nr. 11) und LMBV (Nr. 12) nach Spaltung mit *Afl* III. Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

5.10.5 PAN-RANA-MCP Sequenzanalyse

Durch die beschriebene Restriktionsanalyse des PAN-RANA-MCP PCR-Produktes ist eine eindeutige Identifizierung und Differenzierung der Santee-Cooper Ranaviren und der Ranaviren BIV, ESV, ECV, PPIV und REV nicht möglich. Für die weitergehende Differenzierung muss daher auf die Sequenzanalyse des MCP-Gens zurückgegriffen werden.

Für die Virusidentifikation kann jedoch auf die Analyse der Nukleotidsequenz des gesamten MCP-Gens verzichtet werden, da die Sequenzanalyse des PAN-RANA-MCP PCR-Produktes die eindeutige Differenzierung aller analysierten Ranaviren ermöglicht.

Mit Ausnahme der zu 100 % identischen Nukleotidsequenzen des ESV und ECV bzw. des GV6 und DFV ist die eindeutige Identifizierung der Virusisolate anhand der 516 Nukleotide umfassenden PAN-RANA-MCP Sequenz möglich (Tab. 15).

Tabelle 15: Sequenzanalyse des PAN-RANA-MCP PCR-Produktes

	FV3	EHNV	BIV	ESV	ECV	PPIV	REV	RTRV	SERV	DFV
EHNV	97.481									
BIV	98.643	98.450								
ESV	97.287	98.643	97.868							
ECV	97.287	98.643	97.868	100						
PPIV	98.062	98.256	99.031	97.674	97.674					
REV	98.450	98.643	99.419	98.062	98.062	99.612				
RTRV	98.256	98.062	99.225	97.481	97.481	98.643	99.031			
SERV	93.023	94.186	93.411	94.767	94.767	93.217	93.605	93.411		
DFV	80.233	79.845	80.039	80.426	80.426	80.233	80.233	80.233	80.039	100
GV6	80.233	79.845	80.039	80.426	80.426	80.233	80.233	80.233	80.039	100
LMBV	80.039	79.651	79.845	80.233	80.233	80.039	80.039	80.039	79.845	99.806

Dargestellt sind Homologiewerte (in Prozent) jeweils zweier Ranaviren in Bezug auf die Nukleotidsequenz kodierend für das PAN-RANA-MCP Fragment (516 nt).

5.11 Stabilität des MCP-Gens

Um die Stabilität der Nukleotidsequenz des MCP-Gens zu untersuchen, wurden CCLV Rie173-Zellen mit ESV infiziert. Hierzu wurden jeweils 24 h alte CCLV Rie173-Zellen in 12,5 cm² Zellkulturflaschen in Zellkulturmedium (ZB23) mit 10 µl Virussuspension der vorherigen Passage infiziert und bei 20 °C in 2,5 % CO₂-Atmosphäre für drei Tage bis zur vollständigen Ablösung des Zellrasens (100 % CPE) inkubiert. Insgesamt erfolgten 75 Passagen dieses Erregers in der Zellkultur. Nach der 1., 5., 9., 40., 50., 60., 70. und 75. Passage in CCLV Rie173-Zellen wurde der Virustiter ermittelt und die Nukleotidsequenz des gesamten MCP-Gens überprüft (Abb. 31).

Während der Passagen wurden weder in der MCP-Gensequenz noch in der Vermehrungsintensität des Virus Veränderungen beobachtet. Der Titer schwankte zwischen 10^{7,5} TCID₅₀/ ml und 10⁹ TCID₅₀/ ml (Tab. 16).

Tabelle 16: Titrationsergebnisse ESV Passagen

Passage	1	5	9	40	50	60	70	75
Virustiter TCID ₅₀ / ml	10 ^{7,5}	10 ⁹	10 ^{8,25}	10 ^{8,375}	10 ^{8,25}	10 ^{8,625}	10 ^{7,625}	10 ⁸

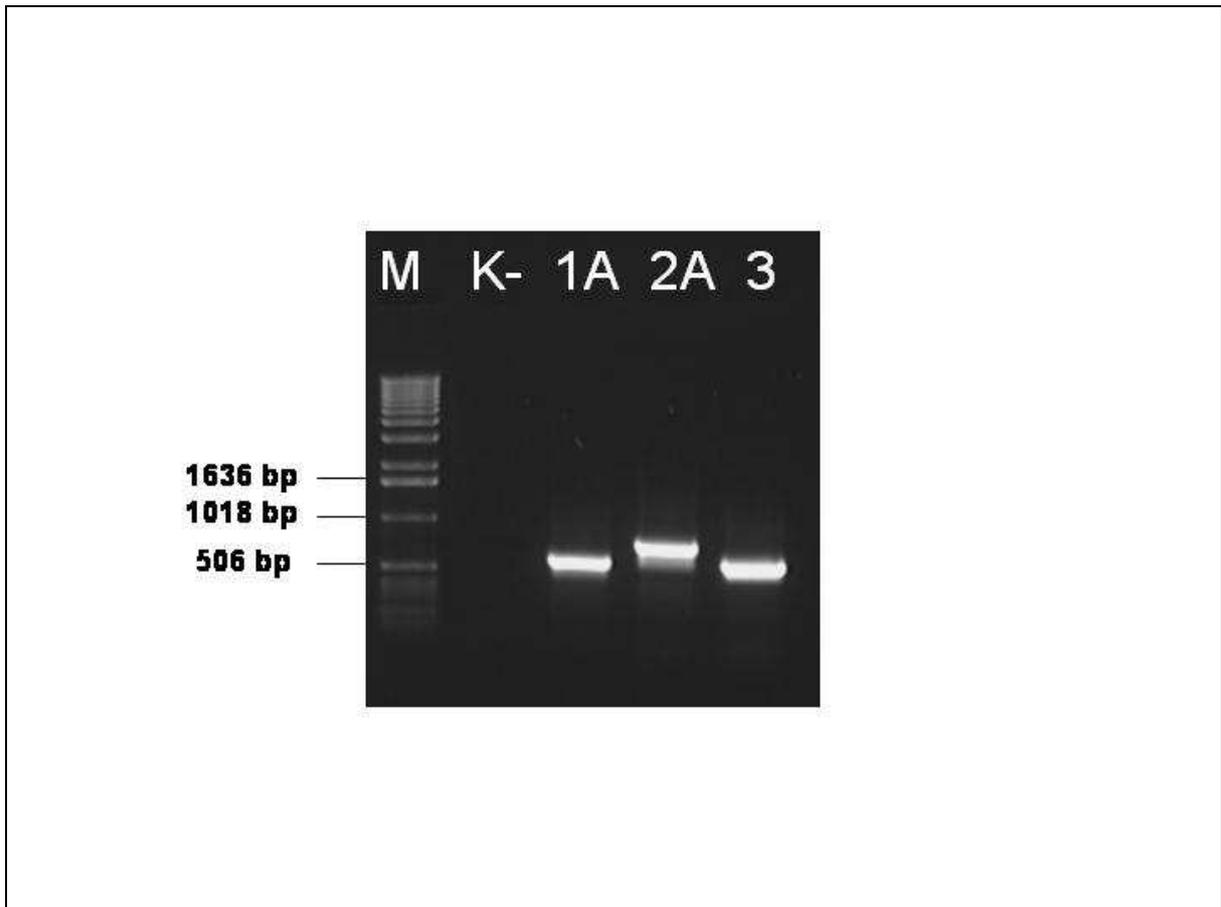


Abbildung 31: PCR MCP 1A, 2A und 3 ESV nach 75 Zellkultur-Passagen

PCR-Produkt MCP 1A (591 bp, Nr. 1A), MCP 2A (750 bp, Nr. 2A) und MCP 3 (611 bp, Nr. 3) des ESV nach 75 Zellkulturpassagen. Die Wasserkontrolle wurde unter K- aufgetragen.

Die MCP-Gensequenz war auch nach der 75. Passage des ESV in der Zellkultur unverändert. Zusätzlich wurde virusinfiziertes Organmaterial aus den Infektionsversuchen auf mögliche Veränderungen in der MCP-Gensequenz untersucht. In keinem Fall wurden Veränderungen in der MCP-Nukleotidsequenz nach Passage der entsprechenden Erreger im Tier festgestellt.

Diese Ergebnisse bestätigen die Stabilität des MCP-Gens während der Vermehrung der Ranaviren in der Zellkultur bzw. im Fisch und unterstreichen somit die Eignung des MCP-Gens für die Ranavirusdiagnostik.

5.12 Ergebnisse der Infektionsversuche

5.12.1 DNA-Extraktionskontrollen

5.12.1.1 Barsch Beta-Actin-Gen Kontrolle

Um eine erfolgreich verlaufende DNA-Extraktion aus dem jeweiligen Organmaterial der Flussbarsche (*Perca fluviatilis*) zu garantieren, wurde eine Kontrolle zum Nachweis vorhandener Barsch-DNA etabliert. Hierzu wurde das Beta-Actin-Gen, welches in jeder Zelle des Barsches vorhanden ist, ausgewählt. Anhand der bekannten mRNA-Nukleotidsequenz des Flussbarsches (GenBank EU664997) wurden Primer zur Amplifikation des Beta-Actin-Gens abgeleitet (Perch β -Actin 1 for, 2 for/rev und 3 rev).

Die Primerpositionen bezogen auf die publizierte mRNA-Nukleotidsequenz (GenBank EU664997) können aus den Tabellen 7 und 8 und Abbildung 34 entnommen werden.

Das Produkt Perch β -Actin 1 wurde durch die Primerkombination Perch β -Actin 1 for & 2 rev amplifiziert. Es weist eine Länge von 1224 bp auf. Unter Verwendung der Primer Perch β -Actin 2 for & 3 rev wurde das Produkt Perch β -Actin 2 mit einer Länge von 796 bp amplifiziert. Der gesamte DNA Bereich, auf dem das Beta-Actin Gen des Barsches lokalisiert ist, wurde mit Hilfe der Primer Perch β -Actin 1 for & 3 rev amplifiziert. Das resultierende Produkt weist eine Größe von 2000 bp auf und ist somit länger als die funktionelle aus 1127 nt bestehende mRNA. In Abbildung 32 sind die PCR Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel dokumentiert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM-Teasy kloniert und sequenziert. Die ermittelte DNA-Nukleotidsequenz des Barsches kodierend für das Beta-Actin-Gen ist in Abbildung 34 dargestellt. Die vier Introns sind an den Nukleotidpositionen 125-247, 486-1017, 1460-1562 und 1742-1857 lokalisiert (Abb. 34).

Der Vergleich der ermittelten kodierenden Sequenz des Beta-Actin-Gens (Exons) des Flussbarsches mit der veröffentlichten mRNA-Nukleotidsequenz (GenBank EU664997) ergibt eine Identität von 96,4 %.

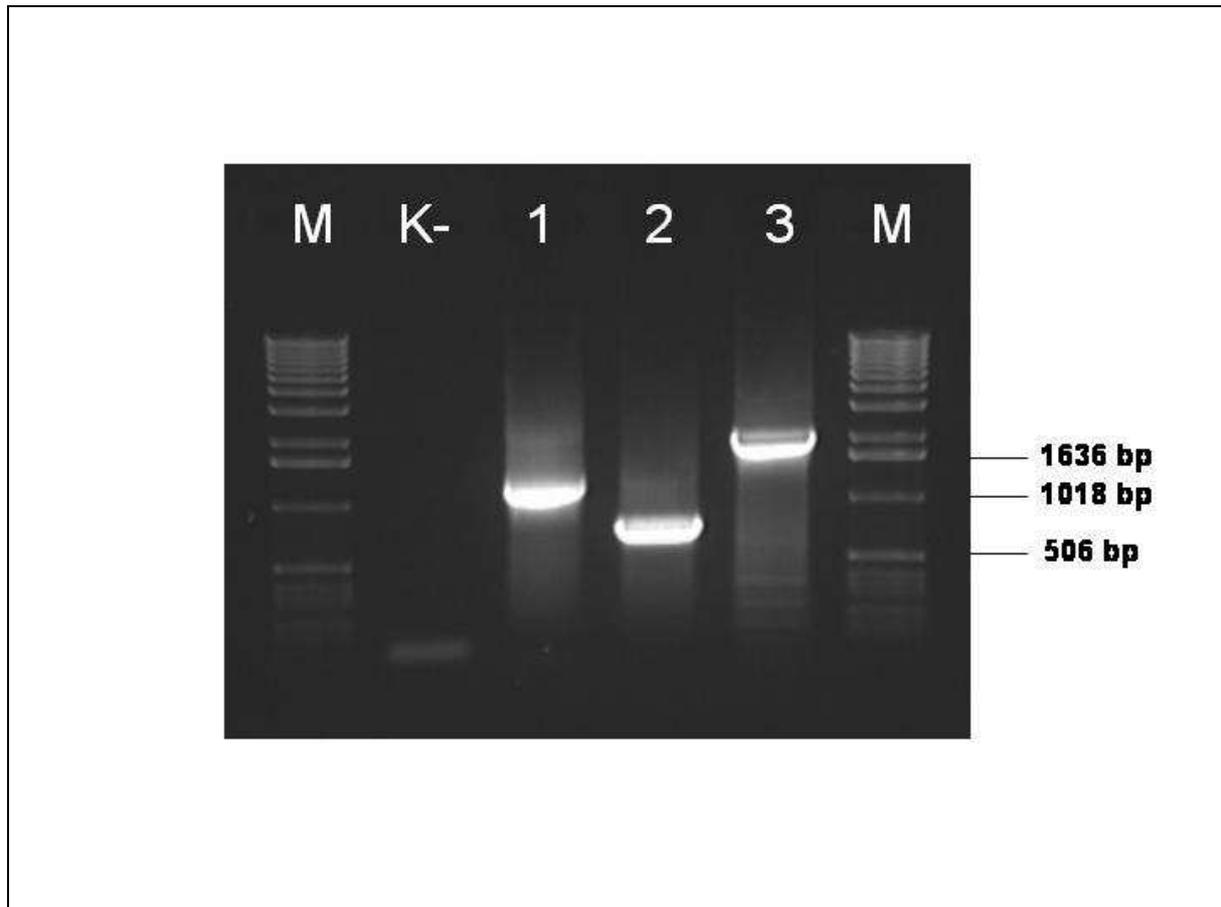


Abbildung 32: PCR Barsch Beta-Actin-Gen

Amplifikation des Barsch Beta-Actin-Genes mit den Primern Perch β -Actin 1 for & 2 rev (PCR-Produkt Perch β -Actin 1, 1224 bp, Nr. 1); Perch β -Actin 2 for & 3 rev (PCR-Produkt Perch β -Actin 2, 796 bp, Nr. 2); Perch β -Actin 1 for & 3 rev (PCR-Produkt Perch β -Actin 1, 2000 bp, Nr. 3). Die Wasserkontrolle ist unter K- aufgetragen.

Um die Amplifikation β -Actin spezifischer Bereiche von der mRNA auszuschließen, wurde der Primer Perch β -Actin 2i for abgeleitet. Dieser bindet nur in der Nukleotidsequenz des dritten Introns der DNA kodierend für das Barsch β -Actin-Gen, jedoch nicht an der entsprechenden mRNA. Durch Einsatz dieses Intron-spezifischen Primers in Kombination mit dem Primer Perch β -Actin 3 rev wird in der PCR ein 527 bp umfassendes DNA-Fragment (Perch β -Actin 2i) amplifiziert (Abb. 33). Um eine mögliche Amplifikation dieses Bereiches von eventuell vorhandener mRNA in der DNA-Präparation auszuschließen, wurde die Bindungskapazität dieser Primer an die mRNA überprüft. Dazu wurde RNA aus den Organen des Flussbarsches extrahiert und in der RT-PCR mit den entsprechenden Primern untersucht. Wie zu erwarten, erfolgte keine Amplifikation der mRNA mit diesen Primern.

Basierend auf der PCR des β -Actin spezifischen DNA Bereiches ist damit sowohl eine interne Überprüfung der DNA-Extraktion aus Organmaterial als auch eine interne PCR Kontrolle möglich.

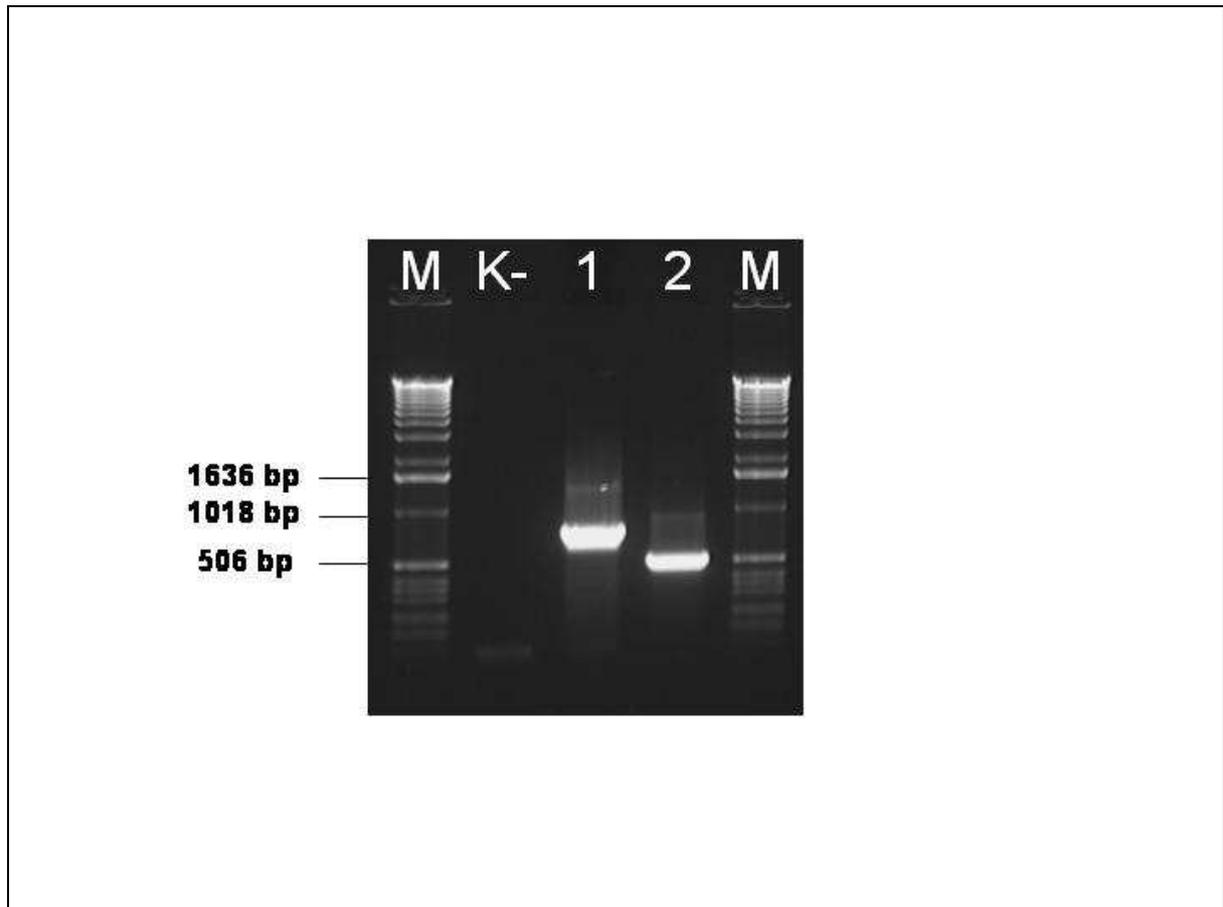


Abbildung 33: PCR Perch β -Actin 2 und 2i

Amplifikation des Barsch Beta-Actin-Gens mit den Primern Perch β -Actin 2 for & 3 rev (PCR-Produkt Perch β -Actin 2, 796 bp, Nr. 1); und Perch β -Actin 2i for & 3 rev (intronspezifisches PCR-Produkt Perch β -Actin 2i, 527 bp, Nr. 2). Die Wasserkontrolle ist unter K- aufgetragen.

In den Analysen des Organmaterials aus den Infektionsversuchen mit Flussbarschen wurde diese Perch β -Actin 2i PCR als Kontrolle eingesetzt. Auf diese Weise ist es möglich, eine fehlerhafte DNA-Extraktion in Ranavirus-negativen Proben sowie eine entsprechend negative PCR auszuschließen.

Beta-Actin-Gensequenz Barsch (*Perca fluviatilis*)

1 ATGGAAGATG AAATCGCCGC CCTCGTTGTT GACAACGGAT CCGGTATGTG
 Perch β -Actin 1 for
 51 CAAAGCTGGC TTTGCAGGAG ATGATGCTCC GCGTGCTGTT TTCCCCTCCA
 Intron I
 101 TTGTTGACG TCCCAGACAT CAGGTACAGT *TTCTTCATAA ATGATATAAA*
 151 *TTGATAAACT ATGAATAACA AAGCTTGTAG AAACGTGCCT ACATTTCTGT*
 201 *TCACTTTTGT CTTGATTTTA ACTTGTTTTC CTGTTTTCTT TCAAAGGGTG*
 251 TGATGGTTGG TATGGGCCAG AAAGATAGTT ATGTTGGTGA TGAGGCACAG
 301 AGCAAAGGG GTATCCTGAC CCTGAAGTAC CCCATTGAGC ATGGTATCGT
 351 CACCAACTGG GACGACATGG AGAAGATCTG GCATCACACC TTCTACAACG
 401 AGCTGAGAGT TGCCCCGAG GAGCACCCCG TCCTGCTCAC AGAGGCTCCC
 Intron II
 451 CTGAACCCCA AGGCCAACAG GGAAAAGATG ACCCAGGTAA *CGAGGGCTTG*
 501 *ACACACTGAC CTTTCCTCTC AATCAGGAAA CCCACTCCGC TCACCTGTAG*
 551 *GGCTCCGCAA CGGGAAAATG TGTGCCGCT CAGGCATCTC TTCTTCTGCT*
 601 *CAATCTGTCC ATTTCTCCT GTCCTTCAA TCTCCAGGT TCTTCTATCC*
 651 *TGTGCTGATC TTTTCATCTC TCGGATGCT TCAGGTGTCT ATCTCGCTTC*
 701 *ACTGTGATGC ATCAGGAATG ACTTGTGCA GCATGGTTAC TGCTGATTTG*
 751 *AAATTAGGCT TGTTTCAGAC CGACAAGCAT CTAACTTCAC TGGTGTTCCT*
 801 *GCATGATGCA ACCAATGACA GTAGAGCAGG TAGCTGCACT CATGTACAGT*
 851 *CAACGTGACC AAACATAAAA GTATAGGTCA TTGTATTGAT TGGTTTTTCGT*
 901 *ATGGTATTAA TACTTAAAAC AGGACTGTGT GCTGTGCTTT TCTCGAATCT*
 951 *GACTGTACTA ACCCGTACTA GCTTACTTTG ACTCACTGAC TCATCTCTCG*
 1001 *TCTTCTCTGT CCTCCAGATC ATGTTTCGAGA CCTTCAACAC CCCTGCCATG*
 1051 TATGTGGCCA TCCAGGCTGT GCTGTCCCTG TATGCCTCTG GTCGTACCAC
 1101 TGGTATTGTC ATGGACTCTG GTGATGGTGT GACCCACACA GTGCCCATCT
 1151 ATGAAGGCTA CGCCCTGCCC CATGCCATCC TCAGGTTGGA CCTGGCTGGC

```

1201 AGAGACCTCA CAGACTACCT CATGAAGATC CTGACAGAGC GTGGTTACTC
      Perch  $\beta$ -Actin 2 for/ rev
1251 ATTCACCACC ACAGCTGAGA GGGAAATCGT GCGTGACATC AAGGAGAAGC
1301 TGTGCTATGT CGCCCTGGAC TTCGAGCAGG AGATGGGCAC TGCTGCCTCC
1351 TCTTCCTCCC TGGAGAAGAG CTACGAGCTG CCCGACGGAC AGGTCATCAC
1401 CATCGGCAAT GAGAGGTTCC GTTGCCAGG GGCCTCTTC CAGCCCTCCT
      Intron III
1451 TCCTCGGTAG GTTTCCAACT TGAGCCTAAC CTGCACTACA TACCTAACTA
      Perch  $\beta$  Actin 2i for
1501 AACCTGTATG GTTACCCTGC ACTTCAACTT GCTGACAAGT GTTTTGTATC
1551 TGCCCTCAGG TATGGAGTCC TGCGGAATCC ATGAGACCAC CTACAACAGC
1601 ATCATGAAGT GTGATGTCGA CATCCGTAAG GACCTGTACG CCAACACCGT
1651 GCTGTCTGGA GGTACCACCA TGTACCCCGG CATTGCTGAC AGGATGCAGA
      Intron IV
1701 AGGAGATCAC AGCCCTGGCC CCATCCACCA TGAAGATCAA GGTGAGCTGA
1751 CTTGCTTCAG AGCCAGCAGG GTGACATTTT GTTGCTACTT GCATGGTGTG
1801 ATTAATGCAG AAAAATGCTT TGGTATCCTA AAGTTTTTTT TGTCTGTCTC
1851 CCTGCAGATC ATTGCCCCAC CAGAGCGTAA ATACTCTGTC TGGATCGGAG
1901 GCTCCATCCT GGCCTCTCTG TCCACCTTCC AGCAGATGTG GATCAGCAAG
1951 CAGGAGTACG ATGAGTCCGG CCCCTCCATC GTCCACCGCA AATGCTTCTA
      Perch  $\beta$ -Actin 3 rev

```

Abbildung 34: Beta-Actin-DNA -Sequenz des Flussbarsches (*Perca fluviatilis*)

Abgebildet ist die ermittelte DNA Sequenz des Beta-Actin-Gens des Flussbarsches (*Perca fluviatilis*) mit einer Länge von 2000 nt. Primerpositionen sind gesondert gekennzeichnet (fett/ unterstrichen), Intron-Abschnitte sind durch blaue Schriftfarbe markiert.

5.12.1.2 Wels Beta-Actin Gen Kontrolle

Zur Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Extraktion aus Organmaterial der Welse (*Silurus glanis*) wurde wie bei den Flussbarschen das Beta-Actin-Gen herangezogen. Entsprechende Sequenzdaten sind in der internationalen Datenbank nicht verfügbar, so dass zunächst eine Identifikation des entsprechenden Gens nötig war.

Zur Identifikation des Beta-Actin-Gens des Welses kamen die Primer Perch β -Actin 1 for, 2 for, 2 rev und 3 rev zum Einsatz (Tab. 7, Abb. 36). Wie in Abbildung 35 sichtbar, wurden in Abhängigkeit der Primerkombinationen mehrere PCR-Produkte amplifiziert. D.h., die verwendeten Primer weisen zusätzliche Bindungskapazitäten auf. Alle PCR-Produkte wurden jeweils in den Vektor pGEM Teasy kloniert und sequenziert. Unter Verwendung des Primerpaares Perch β -Actin 1 for & 2 rev wurde ein 1015 bp umfassendes Produkt als Beta-Actin-Sequenz identifiziert, für die Primerkombination Perch β -Actin 2 for & 3 rev entsprechend ein 765 bp umfassendes Produkt. Durch Kombination der Primer Perch β -Actin 1 for & 3 rev wurde ein entsprechendes Genfragment mit einer Länge von 1760 bp amplifiziert und als Wels Beta-Actin-Gensequenz identifiziert. Die jeweiligen Beta-Actin-Gen PCR-Produkte sind in Abbildung 35 farblich markiert. Die in der ermittelten Nukleotidsequenz enthaltenen vier Introns befinden sich an den Positionen 124-206, 447-808, 1250-1348 und 1529-1617.

Der Vergleich der ermittelten β -Actin Gensequenz mit den publizierten Daten des Amur-Stachelwelses (Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*; EU161066, Song et al., 2007), welcher ebenfalls der Ordnung Siluriformes angehört, ergab eine Identität von 96 %. Die Homologie zur identifizierten kodierenden Beta-Actin-mRNA-Sequenz des Flussbarsches beträgt 90 %.

Auf die Anwendung einer intronspezifischen PCR (Primer Perch β -Actin 2i for & 3 rev) wurde aufgrund fehlender Bindungskapazität des Primers Perch β -Actin 2i for verzichtet.

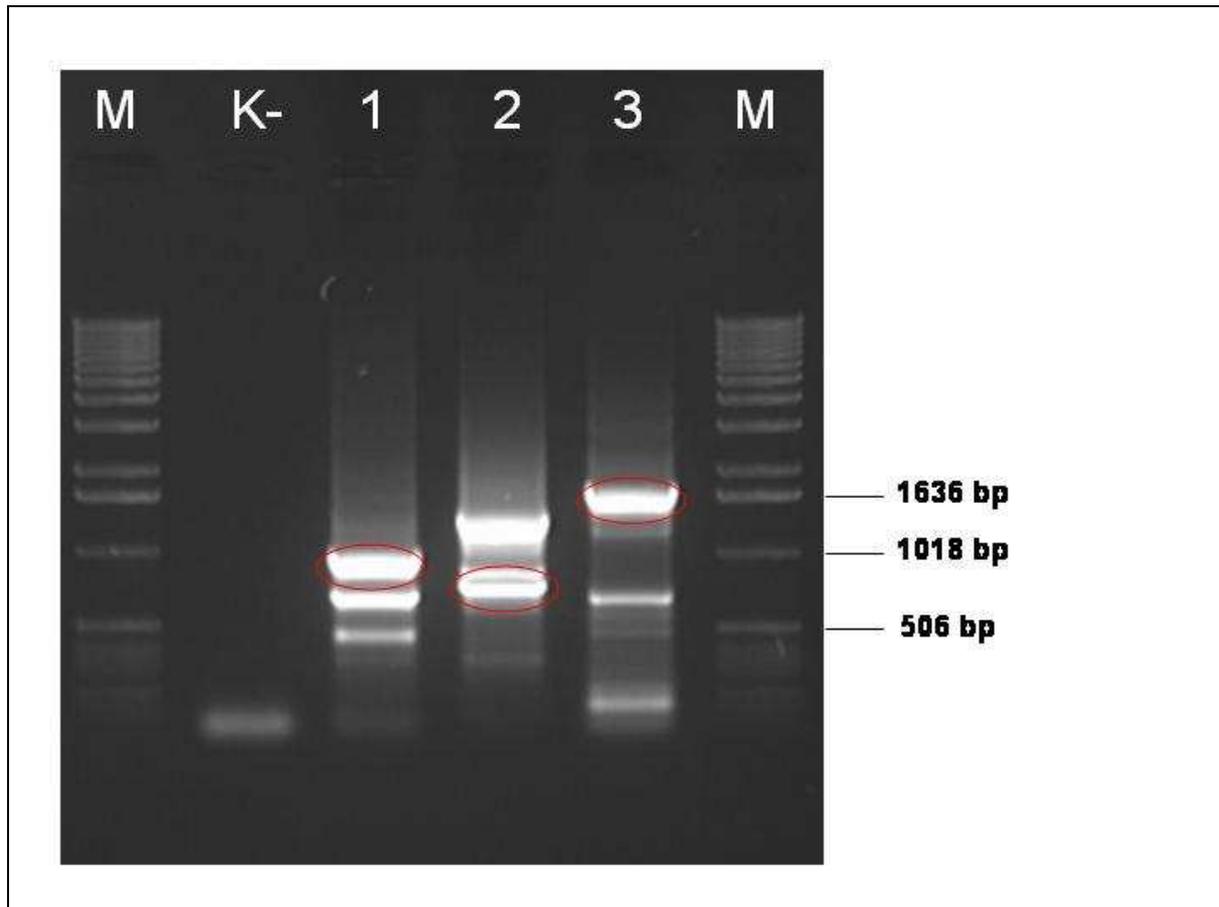


Abbildung 35: Wels PCR Beta-Actin-Gen

Amplifikation des Wels Beta-Actin-Genes mit den Primern Perch β -Actin 1 for & 2 rev (PCR-Produkt β -Actin 1, 1015 bp, Nr. 1); Perch β -Actin 2 for & 3 rev (PCR-Produkt β -Actin 2, 765 bp, Nr. 2); Perch β -Actin 1 for & 3 rev (PCR-Produkt β -Actin, 1760 bp, Nr. 3). Die entsprechenden PCR-Produkte sind durch die rote Markierung gekennzeichnet. Die Wasserkontrolle ist unter K- aufgetragen.

Als Kontrolle für die erfolgreich abgeschlossene DNA-Extraktion wurden die Primer Perch β -Actin 2 for & 3 rev in der PCR eingesetzt, welche jeweils im Falle vorhandener Wels-DNA einen Beta-Actin-Genabschnitt von 765 bp amplifizieren. Eine Amplifikation eventuell vorhandener RNA kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, da es sich hierbei nicht um eine intronspezifische PCR handelt. Die Kontrolle dient jedoch vordergründig dem Nachweis der erfolgreichen DNA-Extraktion aus Wels-Organmaterial. Während der DNA-Extraktion wurde außerdem durch einen zusätzlichen RNase-Verdau die noch in der Probe enthaltene RNA zerstört.

Beta-Actin-Gensequenz Wels (*Silurus glanis*)

1 ATGGAAGATG AAATCGCCGC ACTGGTTGTT GACAACGGAT CCGGTATGTG
Perch β -Actin 1 for

51 CAAGGCCGGA TTTGCTGGAG ATGATGCTCC CCGTGCTGTC TTCCATCCA
Intron 1

101 TTGTGGGTCG CCCAAGACAC CAGGTATAAC TTATTTTTAT TATTTATTAT

151 TCTGCATTAC AAAGTTATTT CTGCATTTC AAAAAATTA ACTTTGCTTT

201 TTACAGGGTG TGATGGTTGG TATGGGACAG AAGGACAGCT ATGTTGGTGA

251 TGAGGCTCAG AGCAAAAGAG GTATCCTGAC CCTGAAATAC CCCATTGAGC

301 ACGGTATTGT CACCAACTGG GATGATATGG AGAAGATCTG GCATCATAAC

351 TTCTACAACG AGCTGCGTGT TGCCCCCTGAG GAGCACCCCG TCCTGCTTAC

401 CGAAGCTCCC CTGAACCCCA AAGCCAACAG GGAAAAGATG ACCCAGGTTA
Intron 2

451 GTTTAGTAAT GGATTTAAAA TGTAAGTGA CTCTACCTTT TGGCTGGTCT

501 TTTCAGAGCT TTTACTTTAC TCCCTTAGTT CATTCAATTC ATTCCTTCAT

551 TCACTTTCTC CAGGCTTCAT CTCTTCTGAA CTCCTGAGTT TCTCCTCTGT

601 TGGAACCAGC AGGTACTTGG TTCCCTGCCT GGTCTTTCGA CACTTACTGC

651 ACTGTTTATA TATTTAAAAA AAAAAAAAAA ACACCCTTTT AATTGCCTGA

701 CTGCGCTTTT TTTATTTATT TATTTTTTTG TTACTTCTAA CAGCATGGTT

751 TGTAGTGGTG ACACGAATGA CTGGAACAGA AAATAAACTT TCATTTTTGT

801 CATTTTCAGAT TATGTTTGAG ACCTTCAACA CCCCAGCCAT GTACGTTGCC

851 ATCCAGGCTG TGCTGTCCCT GTACGCCTCT GGTCGTACCA CTGGTATTGT

901 GATGGACTCT GGTGAGGGTG TGACCCACAC TGTGCCCATC TATGAAGGTT

951 ACGCTCTTCC CCATGCCATC CTCCGTCTGG ACTTGCGTGG TCGTGACCTG

1001 ACTGACTACC TCATGAAGAT CCTGACCGAG AGAGGCTACA GCTTCACTAC
Perch β -Actin 2

1051 CACAGCCGAG AGGGAAATTG TCCGTGATAT CAAGGAGAAG CTGTGCTATG

1101 TTGCTCTCGA CTTTGAGCAG GAGATGGGCA CTGCTGCCTC TTCTTCCCTC

1151 CTGGAGAAGA GCTATGAGCT GCCTGACGGA CAGGTCATCA CCATTGGTAA

1201 TGAGAGGTTT AGGTGTCCCG AGGCTCTCTT CCAGCCATCT TTCCTGGGTA

```

      Intron 3
1251 AGGATATTTA TTTTAAATTG AAATTCCTATA GGTGCAGTTC AATTGTACTA

1301 TTTTAGTGTT TCTGGAGACA TTGTCTAATA TAGTATTGGT TCTCAGGTAT

1351 GGAGTCCTGT GGAATCCATG AGACTACCTT CAACTCAATC ATGAAGTGTG

1401 ACGTGGACAT CCGTAAGGAT CTGTATGCCA ACACCGTACT GTCTGGTGGT

1451 ACCACCATGT ACCCAGGCAT TGCAGACAGG ATGCAGAAGG AAATCACATC
      Intron 4
1501 CCTGGCCCCC AGCACAATGA AAATTAAGGT GAGCTTTGTT TACATATGGC

1551 TTGGTACAAG TGGTGGATAA ATGCAGCTGA AGGCTTTGTA TGACTAATGC

1601 TGATCTTGTA CCTGCAGATC ATTGCCCCAC CTGAGCGCAA ATACTCTGTC

1651 TGGATCGGAG GCTCCATCCT GGCCTCCCTG TCCACCTTCC AGCAGATGTG

1701 GATCAGCAAG CAGGAGTACG ATGAGTCCGG ACCCTCCATC GTCCACCGCA
      Perch β-
1751 AATGCTTCTA
      Actin 3 rev

```

Abbildung 36: Beta-Actin-Gensequenz Wels (*Silurus glanis*)

Abgebildet ist die ermittelte DNA Sequenz des Beta-Actin-Gens des Flussbarsches (*Perca fluviatilis*) mit einer Länge von 1760 nt. Primerpositionen sind gesondert gekennzeichnet (fett/ unterstrichen), Intron-Abschnitte sind durch blaue Schriftfarbe markiert.

5.12.1.3 Negativkontrollen

Bei allen DNA-Extraktionen und PCR-Analysen wurden entsprechende Negativkontrollen mitgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Bei DNA-Extraktionen wurde in jedem Extraktionszyklus jeweils eine PBS-Kontrolle am Ende der Probenserie aufgearbeitet, die dann in der anschließenden Ranavirus PCR auf ein negatives Ergebnis überprüft wurde.

Als Negativkontrolle für die PCR wurde statt der DNA jeweils eine Wasserprobe unter den gleichen Reaktionsbedingungen mitgeführt.

Ein entsprechendes Beispiel ist in Abbildung 37 gezeigt. Neben den Tierversuchsproben der PCR MCP 2A (Nr. 3-14) wurden in Spalte 1 und 2 die PCR Negativkontrolle und die DNA-Extraktionskontrolle auf das Agarosegel aufgetragen, welche nach erfolgter Elektrophorese wie erwartet negativ waren. In Spalte 15 wurde die PCR-Positivkontrolle aufgetragen. Hierbei handelt es sich um eine mit ESV-DNA angesetzte PCR MCP 2A. Diese Kontrolle diente zum Nachweis der erfolgreich verlaufenen PCR MCP 2A. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 750 bp. Die DNA-Extraktionskontrolle wurde in Spalte 16 aufgetragen.

Das 527 bp umfassende PCR-Produkt diente (im Falle der Barsch-Proben) zum Nachweis der erfolgreich verlaufenen DNA-Extraktion (Kap. 5.9.1.1.). Die Tierversuchsproben sind in diesem Fall als Ranavirus-negativ einzustufen. Ein entsprechendes Beispiel für eine vergleichbare PCR MCP 2A der Tierversuchsproben der Welse ist in Abbildung 38 dargestellt. Als Positivkontrolle für die DNA-Extraktion wurde in diesem Fall die PCR Perch β -Actin 2 (765 bp) verwendet.

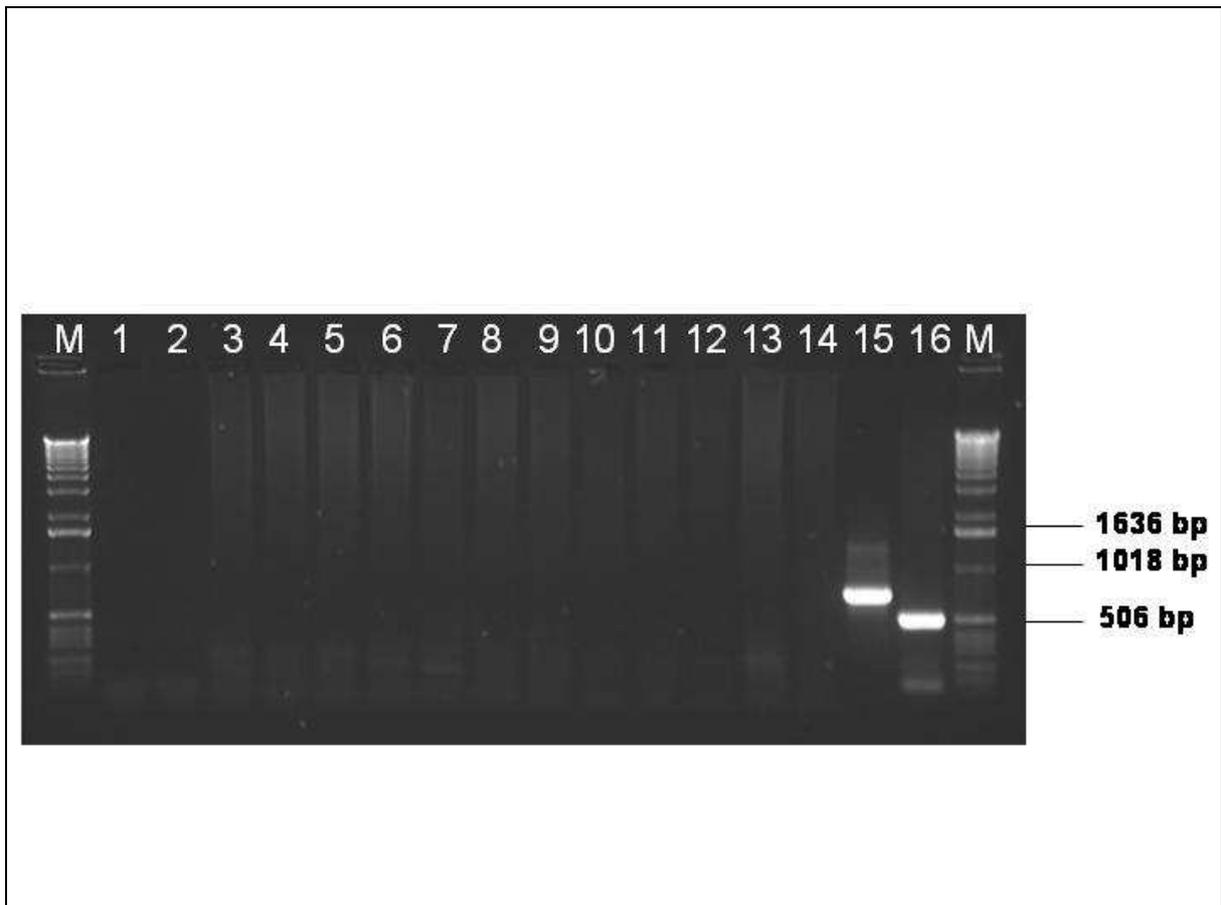


Abbildung 37: Beispiel PCR MCP 2A Flussbarsch

Beispielhafte Abbildung einer PCR MCP 2A zur Untersuchung von Flussbarsch DNA auf Ranavirusgenom. Als Negativkontrollen wurden eine Wasserkontrolle (Nr. 1) und eine DNA-Extraktionskontrolle mit PBS Puffer (Nr. 2) in der PCR MCP 2A mitgeführt. Die Tierversuchsproben (Nr. 3 – 14) weisen kein MCP 2A PCR-Produkt auf. Als Positivkontrollen wurde eine PCR MCP 2A Kontrolle mit ESV-DNA als Template (750 bp, Nr. 15) mitgeführt, sowie eine DNA-Extraktionskontrolle in Form einer Perch β -Actin 2i PCR (527 bp, Nr. 16).

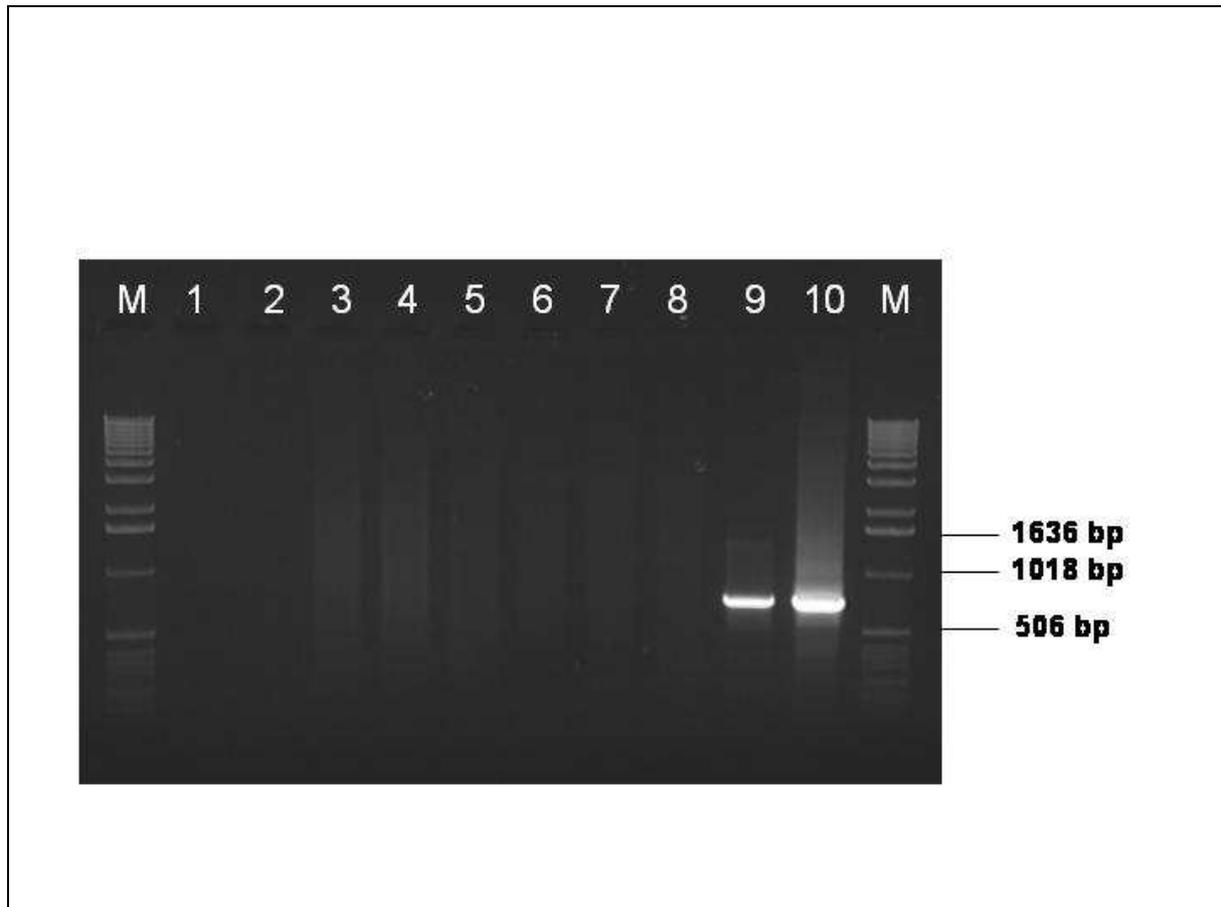


Abbildung 38: Beispiel PCR MCP 2A Wels

Beispielhafte Abbildung einer PCR MCP 2A zur Untersuchung von Wels DNA auf Ranavirusgenom. Als Negativkontrollen wurden eine Wasserkontrolle (Nr. 1) und eine DNA-Extraktionskontrolle mit PBS Puffer (Nr. 2) in der PCR MCP 2A mitgeführt. Die Tierversuchsproben (Nr. 3 – 8) weisen kein MCP 2A PCR-Produkt auf. Als Positivkontrollen wurde eine PCR MCP 2A Kontrolle mit ESV-DNA als Template (750 bp, Nr. 9) mitgeführt, sowie eine DNA-Extraktionskontrolle in Form einer Perch β -Actin 2 PCR (765 bp, Nr. 10).

5.12.2 Infektion von Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) mit Ranaviren

5.12.2.1 Kumulative Mortalität nach Ranavirus-Infektion bei 15 °C und 25 °C

Etwa ein Jahr alte Flussbarsche (*Perca fluviatilis*) mit einem Gewicht von ca. 30 g wurden mit den Ranaviren EHNV, SERV, BIV, GV6, FV3 sowie RTRV (10^4 TCID₅₀/ ml) im Bad bei einer Wassertemperatur von 15 °C und 25 °C infiziert. Die Barsche wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen bei der entsprechenden Wassertemperatur gehältert und täglich kontrolliert. Während dieser Zeit wurden keine sichtbaren Beeinträchtigungen der Fische hinsichtlich des Gesundheitszustandes beobachtet. Lediglich in der bei 25 °C Wassertemperatur gehaltenen Kontrollgruppe verendeten 2 von 196 Tieren. Diese beiden verendeten Barsche zeigten keine virusbedingten Veränderungen. Die kumulative Mortalität von 1 % in dieser Kontrollgruppe lag im Rahmen der zu erwartenden regulären Verlustrate. In keiner weiteren Gruppe wurden Mortalitäten oder Auffälligkeiten in Verhalten oder Aussehen beobachtet (Abb. 40). Die Tabellen 17 und 18 geben Auskunft über die Anzahl der Barsche je Versuchsgruppe und die entsprechende Auswertung der Mortalitätsrate.



Abbildung 39: Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) nach Infektionsversuch ohne klinischen Befund

Tabelle 17: Kumulative Mortalität Flussbarsche (*Perca fluviatilis*) nach Ranavirus-Infektion bei 25 °C Wassertemperatur

Virusisolat	Anzahl Mortalitäten (Gesamtzahl Fische)	Kumulative Mortalität
EHNV	0 (38)	0 %
SERV	0 (38)	0 %
GV6	0 (38)	0 %
BIV	0 (38)	0 %
FV3	0 (37)	0 %
RTRV	0 (38)	0 %
Kontrollgruppe	2 (196)	1 %

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der innerhalb des Versuchszeitraumes verendeten Fische, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der Fische der jeweiligen Versuchsgruppe.

Tabelle 18: Kumulative Mortalität Flussbarsche (*Perca fluviatilis*) nach Ranavirus-Infektion bei 15 °C Wassertemperatur

Virusisolat	Anzahl Mortalitäten (Gesamtzahl Fische)	Kumulative Mortalität
EHNV	0 (33)	0 %
SERV	0 (33)	0 %
GV6	0 (34)	0 %
BIV	0 (34)	0 %
FV3	0 (34)	0 %
Kontrollgruppe	0 (26)	0 %

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der innerhalb des Versuchszeitraumes verendeten Fische, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der Fische der jeweiligen Versuchsgruppe.

5.12.2.2 Virus- und Genomnachweis nach Ranavirus-Infektion bei 15 °C und 25 °C

Barsche der verschiedenen Versuchsgruppen wurden zum einen auf pathologische Veränderungen und zum anderen auf das Vorhandensein des in der Infektion verwendeten Ranavirus bzw. viralen Genoms untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Organe entnommen und aufgearbeitet. Der Virusnachweis erfolgte durch Inokulation dieses Materials auf CCLV Rie88 bzw. Rie173-Zellen in zwei aufeinanderfolgenden Zellkulturpassagen. Weder im Infektionsversuch bei 25 °C noch bei 15 °C Wassertemperatur wurden pathologische Veränderungen beobachtet. Aus der 15 °C und 25 °C Kontrollgruppe wurden jeweils 5 Barsche sowie aus der 25 °C Kontrollgruppe zusätzlich die beiden verwendeten Fische untersucht. Sowohl der Virusnachweis (Virusreisolierung) als auch der virale Genomnachweis (Amplifikation des MCP-Gens) waren in den Proben der Versuchskontrollen negativ.

Bereits sechs Tage nach der Infektion wurden jeweils zwei Barsche je Gruppe des Infektionsversuches bei 25 °C auf das Vorhandensein von Virusgenom und vermehrungsfähigem Virus untersucht. Auch nach Abschluss der Infektionsversuche, d.h., 28 Tage nach Infektion wurden die infizierten Tiere entsprechend auf eine Ranavirusinfektion getestet. Sowohl sechs Tage als auch 28 Tage p. i. wurde weder der entsprechende virale Erreger reisoliert noch das virale Genom nachgewiesen. In allen untersuchten Proben, d.h., nach Infektion der Barsche bei 15 °C und 25 °C wurde kein vermehrungsfähiges Ranavirus reisoliert. Ebenso war das virale Genom dieser Erreger nicht nachweisbar, d.h. die Amplifikation des MCP-Genbereiches MCP 2A mit den Primern MCP 3A for & 4A rev bzw. die Amplifikation in der PAN-RANA-MCP PCR (im Falle von GV6) war negativ (Tab. 19 und 20).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) bei 15 °C und 25 °C Wassertemperatur unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht mit EHNV, SERV, GV6, BIV und FV3 infizierbar ist. Ebenso ist der Flussbarsch bei 25 °C Wassertemperatur auch nicht für RTRV empfänglich.

Entgegen den Erwartungen zeigten die verwendeten Flussbarsche ebenfalls keine Empfänglichkeit für EHNV, obwohl dieser Erreger aus australischen Barschen (*Perca fluviatilis*) innerhalb eines Infektionsgeschehens mit hoher Mortalitätsrate isoliert worden war.

Tabelle 19: Ergebnisse Infektionsversuche Barsch (*Perca fluviatilis*) 25 °C Wassertemperatur

Virusisolat	Virusgenomnachweis		Virusreisolation		Virusgenomnachweis nach 2. Zellkulturpassage	
	6 dpi	28 dpi	6 dpi	28 dpi	6 dpi	28 dpi
EHNV	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)
SERV	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)
GV6	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)
BIV	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)
FV3	0 (2)	0 (35)	0 (2)	0 (35)	0 (2)	0 (35)
RTRV	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)	0 (2)	0 (36)
Kontrollgruppe	-	0 (7)	-	0 (7)	-	0 (7)

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der positiv getesteten Proben, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der untersuchten Proben der jeweiligen Versuchsgruppe.

Tabelle 20: Ergebnisse Infektionsversuche Barsch (*Perca fluviatilis*) 15 °C Wassertemperatur

Virusisolat	Virusgenomnachweis	Virusreisolation	Virusgenomnachweis nach 2. Zellkulturpassage
EHNV	0 (31)	0 (31)	0 (31)
SERV	0 (31)	0 (31)	0 (31)
GV6	0 (32)	0 (32)	0 (32)
BIV	0 (32)	0 (32)	0 (32)
FV3	0 (32)	0 (32)	0 (32)
Kontrollgruppe	0 (5)	0 (5)	0 (5)

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der positiv getesteten Proben, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der untersuchten Proben der jeweiligen Versuchsgruppe.

5.12.3 Infektion von Welsen (*Silurus glanis*) mit Ranaviren

5.12.3.1 Kumulative Mortalität nach Ranavirus-Infektion bei 15 °C

Welse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 17 g wurden auf ihre Empfänglichkeit für die Ranaviren EHNV, ESV, ECV, SERV, REV, DFV und GV6 bei 15 °C Wassertemperatur untersucht. Die Infektion erfolgte im Bad mit einer Infektionsdosis von 10^4 TCID₅₀/ ml. Die entsprechend gehälterten Welse prägten nach Infektion mit den verschiedenen Ranaviren unterschiedliche Mortalitätsraten aus. In der Kontrollgruppe sowie in der mit SERV infizierten Versuchsgruppe kam es zu keinen Verlusten. In den mit EHNV, ECV, REV, DFV und GV6 infizierten Versuchsgruppen war eine schwache kumulative Mortalität von 7,9 % (ECV) bis 15,8 % (EHNV) zu verzeichnen (Abb. 41, Tab. 21). In keiner dieser genannten Gruppen kam es zu Abnormalitäten in Form von Krankheitsanzeichen oder Verhaltensänderungen. Signifikant erhöht war die kumulative Mortalität in der mit ESV infizierten Versuchsgruppe. In dieser Gruppe kam es erstmals am Tag 16 nach der Infektion zum Auftreten von akuten Krankheitssymptomen und Sterbefällen. Am Tag 25 nach der Infektion erreichte die kumulative Mortalität den Maximalwert von 100 %, so dass von den 70 infizierten Welsen keiner die Infektion überlebte. Die Krankheitssymptome äußerten sich in Form von akut auftretenden diffusen Unterhautgewebeblutungen, welche vorrangig in der Unterkieferregion als auch in den Flossenansatzbereichen zu sehen waren. Die sichtbar erkrankten Welse starben innerhalb weniger Stunden.

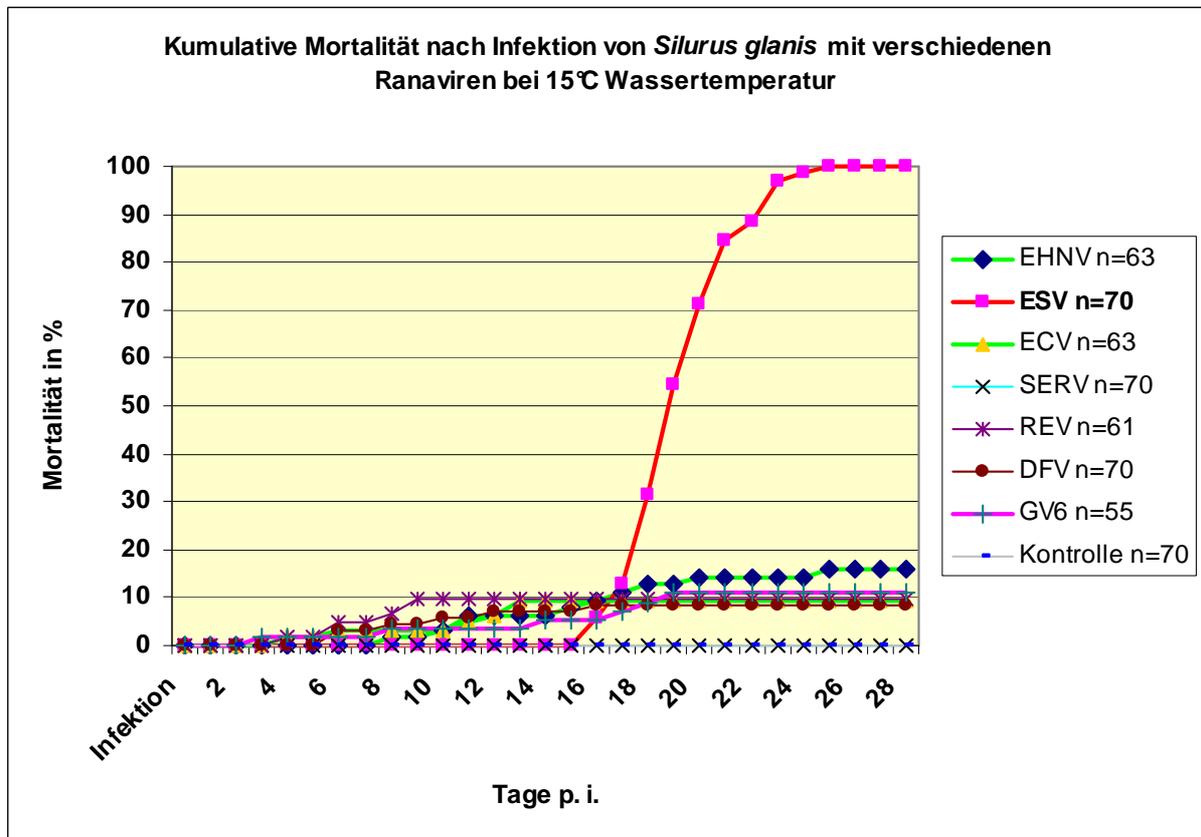


Abbildung 40: Kumulative Mortalität Wels (*Silurus glanis*) nach Infektion mit verschiedenen Ranaviren bei 15 °C Wassertemperatur

Tabelle 21: Kumulative Mortalität Welse (*Silurus glanis*) nach Ranavirusinfektion bei 15 °C Wassertemperatur

Virusisolat	Anzahl Mortalitäten (Gesamtzahl Fische)	Kumulative Mortalität
EHNV	10 (63)	15,8 %
ESV	70 (70)	100 %
ECV	5 (63)	7,9 %
SERV	0 (70)	0 %
REV	6 (61)	9,8 %
DFV	6 (70)	8,6 %
GV6	6 (55)	10,9 %
Negativkontrolle	0 (70)	0 %

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der innerhalb des Versuchszeitraumes verendeten Fische, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der Fische der jeweiligen Versuchsgruppe.

5.12.3.2 Virus- und Genomnachweis nach Ranavirus-Infektion bei 15 °C

Die patho-morphologische Untersuchung der verendeten Welse gab lediglich bei ESV-infizierten Tieren Hinweise auf eine systemische Virusinfektion. Petechiale Blutungen in inneren Organen wie Leber, Niere und Milz sowie vermehrte Flüssigkeitsansammlungen (Aszites) im Bauchraum wurden beobachtet.

Von allen mit ESV infizierten Welsen wurde der Erreger bereits in der ersten Zellkulturpassage reisoliert. Ebenso wurde das MCP Gen des ESV direkt aus dem Organmaterial infizierter Welse sowie aus den Zellkulturpassagen nach Virusreisolierung nachgewiesen.

Nach Infektion der Welse mit EHNV, ECV, SERV, REV, DFV und GV6 wurden zwar mit Ausnahme der mit SERV infizierten Tiere Mortalitäten beobachtet, doch zeigten diese Fische keine pathologischen Veränderungen. Alle verendeten Fische dieser Gruppen, sowie jeweils 10 überlebende Tiere dieser Gruppen wurden 28 Tage nach Infektion auf das Vorhandensein des viralen Erregers und des entsprechenden Genoms untersucht. In allen analysierten Proben wurden weder der Erreger in der Zellkultur noch dessen Genom in der MCP 2A und PAN-RANA-MCP PCR nachgewiesen. Die Ergebnisse der Reisolierung des entsprechenden Ranavirus und der Genomnachweis sind in der Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Ergebnisse Infektionsversuche Welse (*Silurus glanis*) 15 °C Wassertemperatur

Virus- isolat	Mortalitäten			Überlebende Welse		
	Virusgenom- nachweis	Virus- reisolation	Virusgenom- nachweis (II)	Virusgenom- nachweis	Virus- reisolation	Virusgenom- nachweis (II)
EHNV	0 (6)	0 (6)	0 (6)	0 (10)	0 (10)	0 (10)
ESV	20 (20)	20 (20)	20 (20)	-	-	-
ECV	0 (4)	0 (4)	0 (4)	0 (10)	0 (10)	0 (10)
SERV	-	-	-	0 (10)	0 (10)	0 (10)
REV	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (10)	0 (10)	0 (10)
DFV	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (10)	0 (10)	0 (10)
GV6	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (10)	0 (10)	0 (10)
Kontrolle	-	-	-	0 (10)	0 (10)	0 (10)

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der positiv getesteten Proben, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der untersuchten Proben der jeweiligen Versuchsgruppe.

5.12.3.3 Kumulative Mortalität nach Ranavirus-Infektion bei 25 °C (TV 25/I)

Welse (*Silurus glanis*) mit einem Gewicht von ca. 17 g wurden mit einer Infektionsdosis von 10^4 TCID₅₀/ ml im Bad mit den Ranaviren ESV, SERV, REV, DFV und GV6 infiziert und über einen Zeitraum von 28 Tagen bei 25 °C gehalten.

Analog zur Infektion bei 15 °C wurden nach der Infektion der Welse mit den aufgelisteten Ranaviren bei einer Wassertemperatur von 25 °C ähnliche kumulative Mortalitäten beobachtet (Abb. 42 und Tab. 23). In den Versuchsgruppen, die mit SERV, REV und DFV infiziert wurden, traten vereinzelt Todesfälle auf. Krankheitssymptome, die auf eine systemische Virusinfektion hindeuteten, wurden nicht registriert. In der Kontrollgruppe, sowie in der mit GV6 infizierten Versuchsgruppe gab es keine Verluste während des 28 Tage dauernden Versuches.

Wie schon im Infektionsversuch bei 15 °C Wassertemperatur beobachtet, kam es auch nach Infektion der Welse mit ESV bei 25 °C Wassertemperatur zu einer signifikanten kumulativen Mortalität von 85,7 %.

Erste Krankheitssymptome und akute Mortalitäten wurden schon am Tag 4 nach Infektion festgestellt. Am Tag 6 - 7 p. i. erreichte das Infektionsgeschehen seinen Höhepunkt. Das Krankheitsgeschehen setzte also im Vergleich zum Versuch bei 15 °C Wassertemperatur erheblich früher ein.

Welse, die bis zum Tag 14 p. i. nicht verendet waren, überlebten den Versuch (14,3 %). Die zu beobachtenden Krankheitszeichen entsprachen den Symptomen einer akuten systemischen Virusinfektion mit sichtbaren Hämorrhagien (Abb. 43). Hierbei handelte es sich um diffuse Unterhautgewebeblutungen, welche vorrangig in der Unterkieferregion und in den Flossenansatzbereichen zu sehen waren. Das Krankheitsbild entspricht somit in seiner Ausprägung dem des in Kap. 5.9.3.1 beschriebenen Krankheitsbildes der bei 15 °C Wassertemperatur mit ESV infizierten Welse.

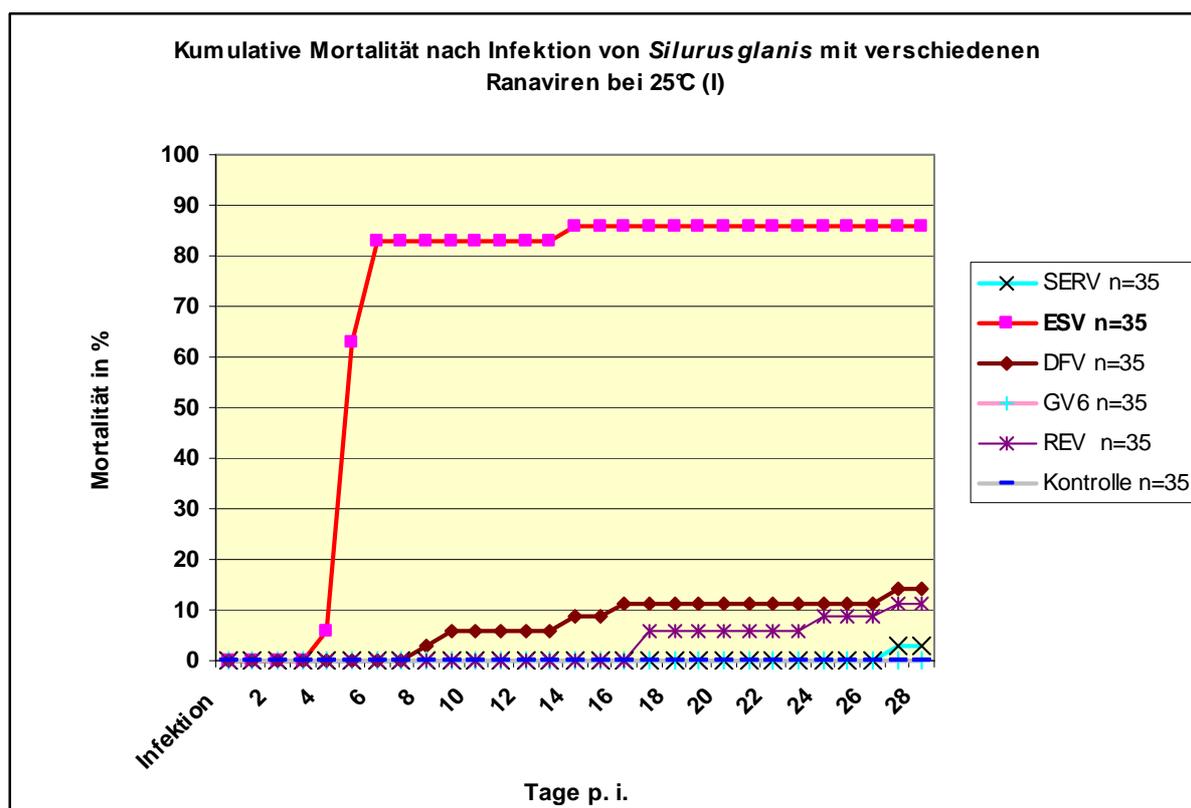


Abbildung 41: Kumulative Mortalität Wels (*Silurus glanis*) nach Ranavirusinfektion bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I)



Abbildung 42: Wels mit Hämorrhagien nach Infektion mit ESV bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I)

Tabelle 23: Kumulative Mortalität Welse (*Silurus glanis*) bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I)

Virusisolat	Anzahl Mortalitäten (Gesamtzahl Fische)	Kumulative Mortalität
ESV	30 (35)	85,7 %
SERV	1 (35)	2,8 %
REV	4 (35)	11,4 %
DFV	5 (35)	14,3 %
GV6	0 (35)	0 %
Kontrollgruppe	0 (35)	0 %

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der innerhalb des Versuchszeitraumes verendeten Fische, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der Fische der jeweiligen Versuchsgruppe.

5.12.3.4 Virus- und Genomnachweis nach Ranavirus Infektion bei 25°C (TV25/I)

Die Analysen der verendeten und überlebenden Welse des Infektionsversuches bei 25 °C (TV 25/I) wurden ebenfalls in Form von Stichproben durchgeführt.

Wie im Infektionsversuch bei 15 °C Wassertemperatur war es auch nach Infektion mit SERV, REV, DFV und GV6 bei 25 °C Wassertemperatur nicht möglich, Ranavirus aus dem Fischgewebe zu reisolieren bzw. Ranavirusgenom in der PCR nachzuweisen. Der Infektionsversuch zeigt deutlich, dass Welse (*Silurus glanis*) für ESV auch bei einer Wassertemperatur von 25 °C empfänglich sind. Die kumulative Mortalität in der mit ESV infizierten Versuchsgruppe betrug 85,7 %. Der Erreger verursachte entsprechende pathologische Veränderungen einer systemischen Virusinfektion. Die Organe Leber, Niere und Milz der nach Infektion mit ESV verendeten Welse wiesen petechiale Blutungen auf. Bei einigen Tieren wurde zusätzlich ein ausgeprägter Aszites beobachtet. Das Ranavirus ESV wurde bereits in der ersten Zellkulturpassage erfolgreich aus den verendeten Tieren reisoliert (Tab. 24). Positiv war in diesen Fällen auch der virale Genomnachweis. Dieser erfolgte durch Amplifikation des MCP-Gens direkt vom Organ- und Zellkulturmaterial nach Passage des ESV in Zellen der Linie CCLV Rie88. Nachgewiesen wurden weder der Erreger noch dessen Genom in Welsen, die die ESV Infektion überlebt hatten. Diese Tiere hatten auch keine Krankheitssymptome ausgeprägt.

Tabelle 24: Ergebnisse Infektionsversuche Wels (*Silurus glanis*) 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I)

Virusisolat	Mortalitäten			Überlebende Welse		
	Virusgenom- nachweis	Virus- reisolation	Virusgenom- nachweis (II)	Virusgenom- nachweis	Virus- reisolation	Virusgenom- nachweis (II)
ESV	10 (10)	10 (10)	10 (10)	0 (4)	0 (4)	0 (4)
SERV	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (5)	0 (5)	0 (5)
REV	0 (4)	0 (4)	0 (4)	0 (5)	0 (5)	0 (5)
DFV	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)
GV6	-	-	-	0 (5)	0 (5)	0 (5)
Kontrolle	-	-	-	0 (5)	0 (5)	0 (5)

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der positiv getesteten Proben, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der untersuchten Proben der jeweiligen Versuchsgruppe.

5.12.3.5 Kumulative Mortalität nach Ranavirus Infektion bei 25 °C (TV 25/II)

In einem weiteren Versuchsansatz wurden juvenile Welse (*Silurus glanis*) auf ihre Empfänglichkeit gegenüber den Ranaviren EHNV, ECV, ECV-24, ESV, BIV und FV3 untersucht.

Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen wurde für diesen Infektionsversuch eine andere Charge von Welsen (*Silurus glanis*) verwendet.

Während der Eingewöhnungsphase dieser Welse kam es vermutlich aufgrund erhöhter Stressbelastung während des Transportes und der Anpassung an die neuen Haltungsbedingungen zu massiven Verlusten. Die moribunden Tiere wurden pathologisch, virologisch und bakteriologisch untersucht. Pathologische Anzeichen für eine bakterielle, parasitäre oder virale Erkrankung waren nicht erkennbar.

Weder die Zellkultur- noch die PCR- bzw. RT-PCR-Analysen wiesen auf ein Ranavirus, Rhabdovirus IHNV bzw. VHSV oder Koi Herpesvirus als Ursache für diese Verluste hin. In bakteriologischen Untersuchungen wurde der fakultativ pathogene Wasserkeim *Aeromonas sobria* isoliert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die juvenilen Welse für 10 min mit 0.02 % Enrofloxacin behandelt. Nach einer Erholungsphase von zwei Wochen wurden keine weiteren Verluste mehr beobachtet.

Diese Welse besaßen bei der Infektion ein mittleres Gewicht von 0,5 g. Die Infektion erfolgte mit einer Dosis von 10^4 TCID₅₀/ ml im Bad. Die Tiere wurden während der Versuchsdauer bei 25 °C Wassertemperatur gehalten. In allen Versuchsgruppen sowie in der Kontrollgruppe war ein starker Rückgang der Tierzahlen sowie ein divergierendes Wachstumsverhalten der Welse zu beobachten. Ursache dieser Auffälligkeiten war ein zunehmend auftretender Kannibalismus. Die Verlustrate durch Kannibalismus betrug bis zu 86,7 % (Tab. 25, Abb. 44). Trotz reichlich vorhandenen Futters konnte das Jagen und Verspeisen kleinerer Artgenossen nicht unterbunden werden, so dass dieser Infektionsversuch (TV 25/II) bereits nach 12 Tagen abgebrochen wurde.

Die Auswertung der Infektion der juvenilen Welse bei 25 °C Wassertemperatur mit den Ranaviren EHNV, ECV, ECV-24, ESV, BIV und FV3 ist in den Abbildungen 44 und 46 sowie Tabelle 25 dokumentiert.

Ähnlich wie im Versuch TV 25/I traten in der mit ESV infizierten Welsgruppe bereits ab Tag 5 p. i. die ersten auffälligen Mortalitäten auf. Bis Tag 11 nach Infektion stieg die Zahl der verendeten Welse stetig an und erreichte ein Maximum von 84,4 %. Auch entsprechende Anzeichen einer ESV Erkrankung mit Hämorrhagien im Unterkiefer- und Flossenansatzbereich wurden wie im Versuch TV 25/I beobachtet.

Im Gegensatz zum Infektionsversuch bei 15 °C Wassertemperatur trat auch nach Infektion mit dem Ranavirus ECV eine erhöhte Mortalitätsrate auf. Zwischen Tag 3 und Tag 6 p. i. verendeten 54,5 % der Welse. Erste Symptome der Erkrankung traten an Tag 3 nach der Infektion auf. Die betroffenen Tiere verendeten innerhalb kürzester Zeit.

Die Infektion mit ECV-24 führte ebenfalls zu einer erhöhten Mortalität. Zwischen Tag 5 und Tag 10 nach der Infektion erreichte die kumulative Mortalität einen Maximalwert von 81,1 %. Damit induzierte ECV-24 eine ähnliche kumulative Mortalität wie ESV.

Die an ESV, ECV und ECV-24 erkrankten Welse zeigten neben den bereits beschriebenen Blutungen in Flossen- und Unterkieferregionen (Abb. 45) auch auffällige Verhaltensstörungen wie Desorientierung, ruckartige unkoordinierte Schwimmbewegungen zur Wasseroberfläche und das Schwimmen in kleinen Kreisen gegen den Uhrzeigersinn sowie spiralförmiges Drehen um die eigene Körperachse.

Nach Infektion der Welse mit SERV, REV, DFV und GV6 wurden keine Anzeichen einer Viruserkrankung registriert. Dennoch reduzierte sich die Zahl der Tiere in den Versuchsgruppen sowie in der Kontrollgruppe durch Kannibalismusv zunehmend. Verendete Fische wurden jedoch nicht beobachtet.

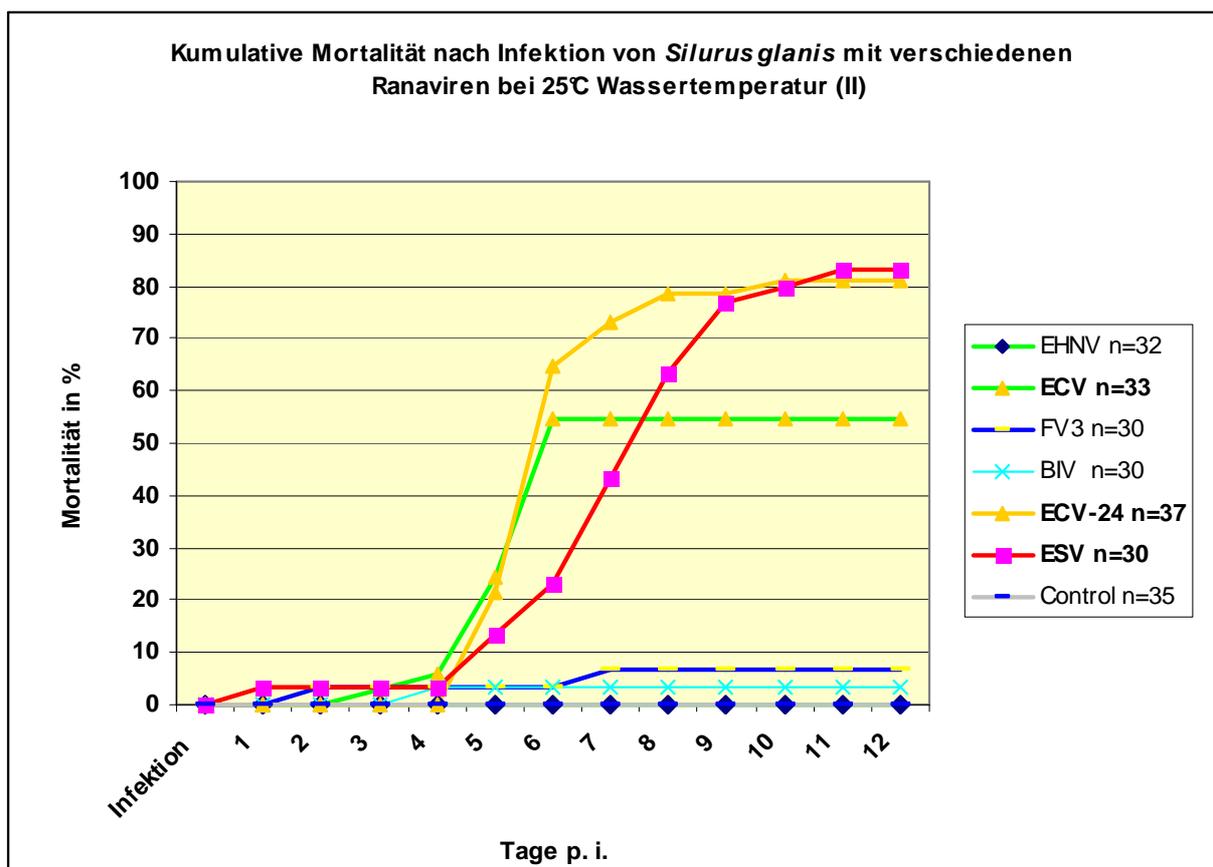


Abbildung 43: Kumulative Mortalität Wels (*Silurus glanis*) nach Infektion mit verschiedenen Ranaviren bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II)



Abbildung 44: Wels mit Hämorrhagien nach Infektion mit ESV bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II)

Tabelle 25: Kumulative Mortalität Welse (*Silurus glanis*) bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II)

Virusisolat	Anzahl Mortalitäten (Gesamtzahl Fische)	Kumulative Mortalität	Verluste durch Kannibalismus (Gesamtzahl Fische)	Verluste durch Kannibalismus (in %)
EHNV	0 (32)	0 %	27 (32)	84,4 %
ESV	25 (30)	84,4 %	3 (30)	10 %
ECV	18 (33)	54,5 %	2 (33)	6,1 %
ECV-24	30 (37)	81,1 %	5 (37)	13,5 %
BIV	1 (30)	3,3 %	26 (30)	86,7 %
FV3	2 (30)	6,7 %	16 (30)	53,3 %
Kontrollgruppe	0 (35)	0 %	25 (35)	71,4 %

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der innerhalb des Versuchszeitraumes verendeten Fische, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der Fische der jeweiligen Versuchsgruppe.

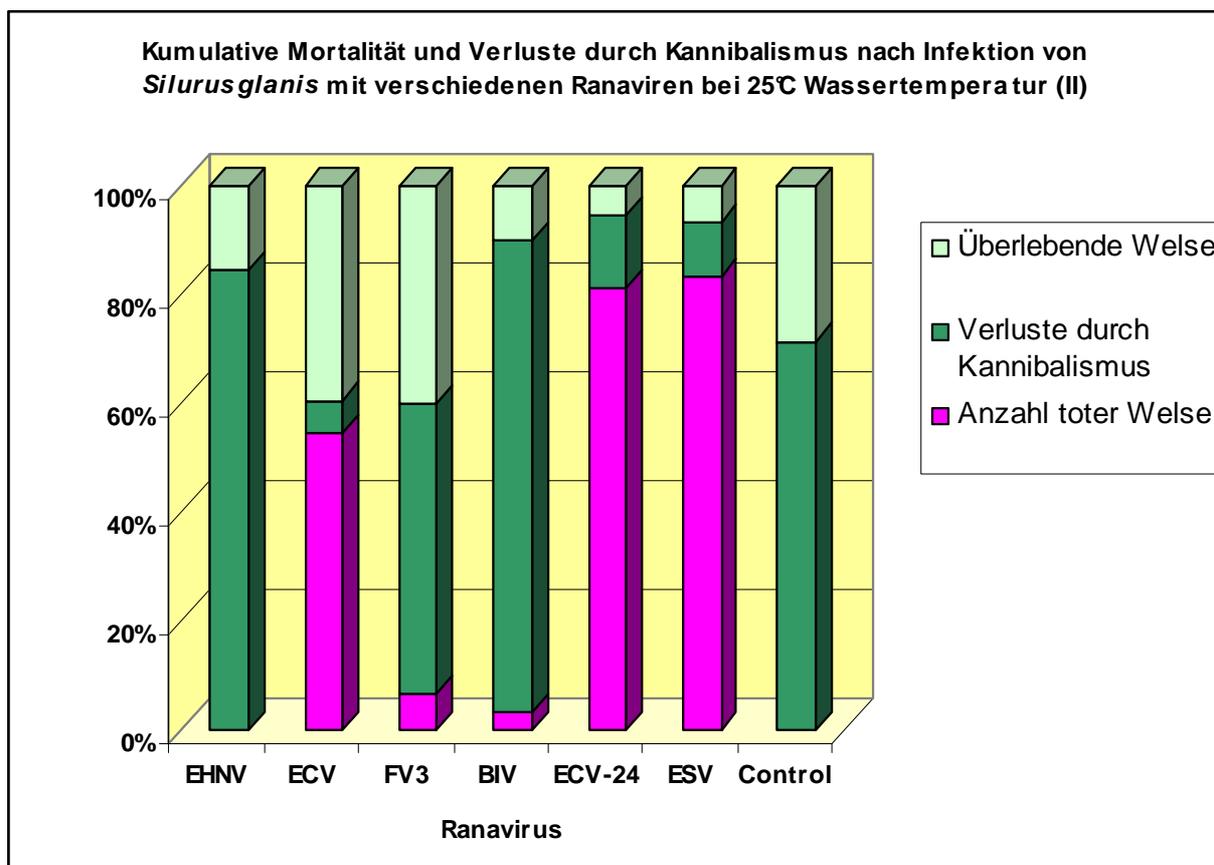


Abbildung 45: Kumulative Mortalität und Verluste durch Kannibalismus nach Infektion von *Silurus glanis* mit verschiedenen Ranaviren bei 25 °C (TV 25/II)

5.12.3.6 Virus- und Genomnachweis nach Ranavirus Infektion bei 25 °C (TV 25/II)

Der Virusnachweis aus Organmaterial der verendeten und überlebenden Welse der Kontrollgruppe und der mit EHNV, BIV und FV3 infizierten Versuchsgruppen war durchgehend negativ. Der Virusnachweis von ESV, ECV und ECV-24 aus entsprechend infizierten Welsen war hingegen erfolgreich. Die nach einer ESV-Infektion verendeten untersuchten Welse waren im Genomnachweis des Erregers aus Organmaterial durchgehend positiv (23/ 23), wobei die Virusisolation aus Organmaterial von 22 der 23 Welse gelang. Negativ war die Virusisolation im Falle eines am Tag 1 nach der Infektion verendeten Welses. Die Analyse der beiden bis Tag 12 nach der Infektion mit ESV überlebenden Welse ergab einen positiven Virusgenomnachweis für beide Fische, sowie die positive Virusreisolation für einen der beiden Fische. Diese Fische wiesen an Tag 12 nach Infektion noch keine Krankheitssymptome auf, ein mögliches Auftreten von Symptomen und Versterben zu einem späteren Zeitpunkt ist jedoch nicht auszuschließen, da der Versuch an Tag 12 nach der Infektion abgebrochen wurde.

Ähnlich sind die Ergebnisse der Analysen der mit ECV infizierten Welse. In dem Organmaterial der verendeten Welse wurde mittels PCR das MCP-Gen nachgewiesen. Der Erreger wurde mit Ausnahme eines Tieres, das am Tag 3 nach der Infektion verendete, aus allen verendeten Tieren erfolgreich reisoliert. Von den bis zum Versuchsende überlebenden 13 Welsen wurde das virale Genom direkt in der PCR aus dem Organmaterial von zehn Tieren nachgewiesen. Die Reisolierung des Erregers gelang jedoch nur von fünf dieser zehn Welse.

Wie in Tabelle 26 dargestellt, wurden die Ergebnisse der mit ECV infizierten Welse auch in der mit ECV-24 infizierten Versuchsgruppe bestätigt. Von den verendeten Welsen dieser Gruppe wurden sowohl der Erreger als auch dessen virales Genom nachgewiesen. Die beiden überlebenden Fische wurden ebenfalls auf das Vorhandensein des Erregers bzw. dessen Genoms untersucht. Obwohl das Ranavirus nicht reisoliert werden konnte, war der Genomnachweis des Erregers in der MCP 2A PCR und der PAN-RANA-MCP PCR positiv.

Virus- isolat	Mortalitäten			Überlebende Welse		
	Virusgenom- nachweis	Virus- reisolation	Virusgenom- nachweis (II)	Virus- reisolation	Virusgenom- nachweis	Virus- reisolation (II)
EHNV	-	-	-	0 (5)	0 (5)	0 (5)
ESV	23 (23)	22 (23)	22 (23)	2 (2)	1 (2)	1 (2)
ECV	16 (16)	15 (16)	15 (16)	10 (13)	5 (13)	5 (13)
ECV-24	28 (28)	28 (28)	28 (28)	2 (2)	0 (2)	0 (2)
BIV	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (3)	0 (3)	0 (3)
FV3	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (12)	0 (12)	0 (12)
Negativ- kontrolle	-	-	-	0 (10)	0 (10)	0 (10)

Tabelle 26: Ergebnisse Infektionsversuche Wels (*Silurus glanis*) 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II)

Die Zahl vor der Klammer entspricht der Anzahl der positiv getesteten Proben, die Zahl in Klammern entspricht der Gesamtzahl der untersuchten Proben der jeweiligen Versuchsgruppe.

In allen Infektionsversuchen wurde zur Bestätigung des CPE nach erfolgreicher Virusreisolierung in der Zellkultur eine anschließende PCR-Analyse aller Proben durchgeführt. Die Ergebnisse der PCR bestätigten die Resultate der entsprechenden Virusreisolierungen, d. h., aus infiziertem Zellkulturmaterial mit deutlich ausgeprägtem CPE wurde das MCP-Gen des jeweiligen Erregers eindeutig identifiziert.

Der Genomnachweis war jedoch negativ in Zellkulturproben, die nach Inokulation der aufgearbeiteten Organproben keine morphologischen virusinduzierten Veränderungen aufwiesen.

5.12.4 Zusammenfassung Infektionsversuche

Der Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) erwies sich bei 15 °C und 25 °C Wassertemperatur unter den angegebenen Versuchsbedingungen als nicht für EHNV, SERV, GV6, BIV und FV3 empfänglich. Ebenso besteht für den Flussbarsch bei 25 °C Wassertemperatur keine Empfänglichkeit für RTRV.

Im Gegensatz dazu zeigen die beschriebenen Ergebnisse, dass bei den getesteten Welsen (*Silurus glanis*), den Erwartungen entsprechend, eine signifikant erhöhte kumulative Mortalität nach Infektion mit dem Ranavirus ESV zu verzeichnen war. Dieses gilt sowohl für die Infektion bei 15 °C als auch 25 °C Wassertemperatur. Der Verlauf der Mortalitätskurve zeigt, dass die Wassertemperatur maßgeblichen Einfluss auf die Dauer der Inkubationszeit hat. Diese betrug für ESV bei 15 °C Wassertemperatur ca. 16 Tage. Bei 25 °C Wassertemperatur erkrankten die ersten Fische schon 4 Tage nach der Infektion. Während der Verlauf der Mortalitätskurve bei 15 °C Wassertemperatur einen gleichmäßigen Anstieg der Mortalitäten bis zur maximalen Verlustrate von 100 % anzeigt, verläuft die Mortalitätskurve bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I) sehr steil, d.h., über 80 % der mit ESV infizierten Welse starben innerhalb von zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Die kumulative Mortalität erreichte in TV I insgesamt jedoch nur 85,7 %.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass juvenile Welse bei einer Wassertemperatur von 25 °C nicht nur für ESV, sondern auch für ECV und ECV-24 eine deutliche Empfänglichkeit aufweisen. Die Infektion der älteren Welse mit ECV bei 15 °C Wassertemperatur hingegen zeigte keine Auswirkungen auf den Gesundheitszustand der Fische.

Eine Empfänglichkeit der Welse für die Ranaviren SERV, REV, DFV, GV6 (TV 25/I) sowie EHNV, FV3, BIV (TV 25/II) bei einer Wassertemperatur von 25 °C wurde nicht nachgewiesen. Ebenso zeigten die Welse bei einer Wassertemperatur von 15 °C keine Empfänglichkeit für die Erreger EHNV, SERV, REV, DFV und GV6.

5.12.5 Stabilität des MCP-Gens nach Infektion der Welse

Da der Barsch (*Perca fluviatilis*) unter den beschriebenen Bedingungen nicht empfänglich für die Ranaviren EHNV, ECV, ESV, SERV, REV, BIV, FV3, RTRV, DFV und GV6 und das Genom der entsprechenden Erreger nicht nachweisbar war, basieren die Aussagen zur Stabilität des MCP-Gens auf den Infektionsversuchen der Welse.

Für alle positiven Genomnachweise der Ranaviren in der PCR (ESV, ECV, ECV-24) wurde stichprobenartig die Virusidentität durch Sequenzierung des MCP-Gens verifiziert und die ermittelte Nukleotidsequenz auf mögliche Austausche untersucht. Hierzu wurden pro Versuchsgruppe mindestens drei Proben unabhängig voneinander analysiert. Untersucht wurde das gesamte MCP-Gen der entsprechenden Erreger nach Infektion der Welse, d. h., direkt aus Organmaterial und nach entsprechender Passage in CCLV Rie88 Zellen. Das MCP-Gen wurde entsprechend der etablierten Methode (Kap. 5.2.1) in drei sich überlappenden Fragmenten MCP 1A, MCP 2A und MCP 3 in der PCR amplifiziert und identifiziert.

Die ermittelten Nukleotidsequenzen wurden mit den Sequenzen der entsprechenden Ranaviren, die bereits vor der Infektion der Fische identifiziert worden waren, verglichen.

In den Sequenzanalysen wurden keine Nukleotidaustausche festgestellt. Die jeweils ermittelten MCP-Gensequenzen entsprachen zu 100 % der zuvor identifizierten bzw. bekannten Sequenz kodierend für das MCP-Gen des ESV, ECV bzw. ECV-24. Weiterhin bestätigen diese Ergebnisse die 100 %ige Identität der Ranaviren ESV, ECV und ECV-24 innerhalb ihrer Nukleotidsequenz des MCP-Gens auch nach erfolgter Infektion von Welsen bei 15 °C bzw. 25 °C Wassertemperatur und nach Zellkulturpassagen.

Damit wurde die Stabilität der Ranaviren ESV, ECV und ECV-24 innerhalb ihrer MCP-Gensequenz nicht nur nach Zellkulturpassagen, sondern auch nach wenigstens einem Infektionszyklus im Wels nachgewiesen.

6 Zusammenfassende Diskussion

6.1 Molekularbiologie

Das primäre Ziel dieser Dissertationsarbeit war die molekularbiologische Charakterisierung und Differenzierung der Ranaviren EHNV, ESV, ECV, FV3, BIV, REV, PPIV, SERV, RTRV, DFV, GV6 und LMBV. Hierzu wurde das MCP-Gen der Viren mittels bekannter und neu entwickelter Methoden amplifiziert, charakterisiert und identifiziert. Die vergleichende MCP-Gensequenzanalyse ermöglicht die eindeutige Zuordnung aller analysierten Erreger, wobei DFV und GV6 sowie ESV und ECV anhand der MCP-Nukleotidsequenz nicht zu unterscheiden sind.

Während EHNV, ESV, ECV, FV3, BIV, REV, PPIV und RTRV bezogen auf die MCP-Gensequenz mit Homologien von 97,1 - 100 % untereinander zu einer Gruppe zusammengefasst werden können, nimmt das SERV mit einer Sequenzhomologie von 93,9 - 95,7 % zu den genannten Ranaviren eine Sonderstellung ein. In der Ausprägung des CPE gleichen sich die genannten Viren.

Sehr deutlich grenzen sich die Santee-Cooper Ranaviren GV6, DFV und LMBV von den anderen Ranaviren ab. Eine Identifikation des MCP-Gens dieser Erreger war erst nach Durchführung einer Southernblot Analyse und Shotgun-Klonierung bzw. aufwendiger PCR-Analyse möglich. Die ermittelten MCP-Gensequenzen unterscheiden sich deutlich von den Sequenzen der restlichen Ranaviren. Die ermittelten Homologien erreichen nur Werte zwischen 77,9 und 78,5 %. Auch in der Ausprägung des CPE unterscheiden sich die Santee-Cooper Ranaviren von den anderen analysierten Ranaviren. Die abweichende Ausprägung des CPE ist ein Indiz für eine mögliche Zuordnung zu einem eigenen Genus innerhalb der Familie *Iridoviridae*.

Eine Zusammenfassung des DFV, GV6 und LMBV zur Gruppe der Santee-Cooper Ranaviren ist berechtigt, da das DFV und das GV6 in ihrer MCP-Gensequenz zu 100 % übereinstimmen und zu der MCP-Gensequenz des LMBV eine Homologie von 99,2 % aufweisen.

Betrachtet man die im Kapitel „Phylogenie Familie *Iridoviridae*“ (Kap. 5.6.3) beschriebenen genetischen Verwandtschaftsgrade der verschiedenen Genera *Ranavirus*, *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus* und *Megalocytivirus*, kann man bei den Santee-Cooper Ranaviren nicht zwangsläufig von einem eigenen Genus sprechen. Die Santee-Cooper Ranaviren stellen jedoch eine phylogenetisch deutlich abgegrenzte Gruppe innerhalb der Ranaviren dar. Bestätigt wird diese Ansicht von Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen durch Mao et al. (1997). Auch in Untersuchungen von Hyatt et al. (2000) deutet sich durch die fehlende Kreuzreaktivität mit einem gegen EHNV entwickelten Antiserum die Sonderstellung der Santee-Cooper Ranaviren an. Als kontrovers anzusehen sind jedoch die in der genannten Arbeit von Hyatt et al. (2000) ermittelten MCP-Gensequenzdaten des GV6 und DFV. Diese stehen in starkem Gegensatz zu den im Rahmen dieser Dissertation ermittelten Sequenzdaten der beiden Viren, sowie auch im Gegensatz zu den ELISA-Ergebnissen der genannten Autoren.

Molekularbiologisch eignet sich das PCR-Produkt MCP 2A zur zügigen Differenzierung der untersuchten Viren mittels Spalt- und Sequenzanalyse, jedoch werden mit dieser Methode die Santee-Cooper Ranaviren nicht erfasst. Zum Nachweis der Santee-Cooper Viren können neben der PAN-RANA-MCP PCR auch die PCR MCP DF sowie die PCR SCIV Anwendung finden. Letztere Methoden dienen lediglich der Amplifikation des MCP-Gens der Santee-Cooper Viren GV6, DFV und LMBV, die anderen Ranaviren können hiermit wiederum nicht nachgewiesen werden.

Letztendlich wurde eine neue, einheitliche PCR-Methode zum Nachweis aller analysierten Ranaviren inklusive der Santee-Cooper Ranaviren etabliert. Durch Anwendung der PAN-RANA-MCP PCR wird für alle untersuchten Viren ein 516 bp umfassendes DNA-Fragment des MCP-Gens amplifiziert. Durch Spaltanalysen des PCR-Produktes ist eine schnelle und einfache Identifizierung der Viren EHNV, FV3, RTRV, SERV sowie der Santee-Cooper Ranaviren möglich. Zur weiteren Differenzierung ist die nachfolgende Sequenzanalyse des MCP-Gens unerlässlich. Eine eindeutige Identifizierung aller Viren ist durch die Sequenzanalyse des PAN-RANA-MCP PCR-Produktes möglich.

Alternativ ist auch die Amplifikation eines weiteren Genbereichs zur Differenzierung der Ranaviren möglich. Holopainen et al. (2009) untersuchten das PCR-Produkt des DNA-Polymerase Gens, welches mit ähnlichen Homologiewerten wie beim MCP-Gen ebenfalls eine Identifikation von BIV, EHNV, FV3, SERV, PPIV und REV ermöglicht. Ebenso sind die Viren ESV und ECV sowie DFV und GV6 wie in der MCP-Sequenz auch in der DNA-Polymerase Gensequenz identisch, so dass auch hier eine Unterscheidung nicht möglich ist. Die Identifizierung des Neurofilament Triplet H1-Protein Gens (Holopainen et al., 2009) der Santee-Cooper Ranaviren GV6 und DFV gelang hingegen nicht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die PAN-RANA-MCP PCR zum Nachweis von Ranaviren und Santee-Cooper Ranaviren molekularbiologisch als neues Mittel der Wahl anzusehen ist. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass es sich jeweils lediglich um einen Genomnachweis, nicht jedoch um den Nachweis von vermehrungsfähigem Virus handelt. Hierzu ist stets auch eine Zellkulturanalyse notwendig.

Die Analyse der Stabilität des MCP-Gens durch Sequenzanalysen nach 75-facher Passagierung von ESV in der Zellkultur (CCLV Rie173) sowie nach Passagierung in verschiedenen Wirtsspezies bestätigt die Eignung des MCP-Gens als Mittel zur Identifizierung und Differenzierung der Ranaviren.

6.2 Infektionsversuche

Das zweite Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Einschätzung der Empfänglichkeit zweier europäischer Fischarten für eine Auswahl von Ranaviren. Hierzu wurden Welse (*Silurus glanis*) und Flussbarsche (*Perca fluviatilis*) im Rahmen von Infektionsversuchen bei zwei verschiedenen Wassertemperaturen (15 °C und 25 °C) mit den Ranaviren infiziert. Dazu wurden die Fische mit einer Infektionsdosis von 10^4 TCID₅₀/ ml im Infektionsbad für die Dauer einer Stunde den Erregern ausgesetzt. Die Fische wurden anschließend für eine Periode von 28 Tagen beobachtet und schließlich auf Ranaviren untersucht.

Die Flussbarsche mit einer Körperlänge von durchschnittlich 12 cm und einem mittleren Gewicht von 30 g wurden in Gruppen von jeweils 35 bzw. 40 Tieren bei 15 °C und 25 °C mit EHN, GV6, BIV, FV3 und SERV infiziert. Zusätzlich wurde eine Gruppe von Barschen bei 25 °C mit RTRV infiziert. Obwohl juvenile und adulte Flussbarsche als hochempfindlich für EHN gelten (Langdon et al., 1986; Langdon & Humphrey, 1987, Langdon, 1989), wurden in den mit EHN infizierten Gruppen bei beiden getesteten Temperaturen keine klinischen Auffälligkeiten oder Verhaltensänderungen festgestellt. Gleiches gilt für die mit den anderen genannten Ranaviren infizierten Versuchsgruppen. In keiner der Versuchsgruppen kam es zum Auftreten von Mortalitäten. Lediglich in der Kontrollgruppe bei 25 °C wurde eine kumulative Mortalität von 1 % registriert, welche im Rahmen der zu erwartenden Verlusten bei jungen Fischen lag.

Keines der getesteten Ranaviren konnte nach Abschluss des Versuches nach 28 Tagen aus Organmaterial der Barsche reisoliert werden. Untersucht wurden hierbei alle überlebenden Barsche mit Ausnahme je zweier Tiere, welche als Reserve für weitere Untersuchungen gelagert wurden. Auch die bei 25 °C 6 Tage p. i. entnommenen Barsche (2/ Versuchsgruppe) waren in der Virusreisolierung negativ. Die Ergebnisse der PCR-Analysen entsprachen den Virusreisolierungsergebnissen, keine der untersuchten Proben erbrachte ein positives Ergebnis.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass europäische Flussbarsche dieser Größenordnung unter den beschriebenen Bedingungen im Gegensatz zu australischen Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) für die genannten Ranaviren nicht empfänglich sind. Mögliche Erklärungen hierfür sind neben Alter und Konstitution mögliche genetische Unterschiede der Barsche. In natürlichen EHN-Ausbrüchen bei Barschen in Australien waren sowohl juvenile als auch adulte Tiere von Mortalitätsraten bis zu 100 % betroffen (Langdon & Humphrey, 1987). In experimentellen Infektionsversuchen mit australischen Flussbarschen konnte eine Empfänglichkeit dieser Art für EHN nachgewiesen werden (Langdon, 1989). Jedoch wiesen in den von Langdon beschriebenen Infektionsversuchen nur die juvenilen Flussbarsche nach Badinfektion mit EHN Mortalitäten auf. Die adulten Barsche zeigten keine Krankheitssymptome und die nachfolgende Virusreisolierung von den adulten Barschen war ebenfalls negativ. Lediglich bei intraperitoneal infizierten adulten Barschen stellten sich Krankheitssymptome mit erhöhten Mortalitätsraten ein (Langdon, 1989).

Die Infektionsversuche mit Welsen (*Silurus glanis*) wurden aus praktischen Gründen mit Fischen unterschiedlicher Altersklassen durchgeführt. Bei einer Wassertemperatur von 15 °C wurden Welse mit einer durchschnittlichen Körperlänge von 10 cm und einem Gewicht von ca. 17 g mit EHNV, ESV, ECV, SERV, REV, DFV und GV6 infiziert. Die Infektion erfolgte im Bad mit einer Viruskonzentration von 10^4 TCID₅₀/ml für die Dauer einer Stunde.

Eine signifikant erhöhte kumulative Mortalität wurde lediglich in der mit ESV infizierten Gruppe beobachtet. Die ersten Mortalitäten traten am Tag 16 p. i. auf. Nach 25 Tagen p. i. erreichte die kumulative Mortalität den Maximalwert von 100 %. PCR und Virusreisolierung waren von allen untersuchten Proben der mit ESV infizierten Welse positiv. Bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/I) wurden Welse der gleichen Altersklasse in Gruppen von jeweils 35 Tieren mit ESV, SERV, REV, DFV und GV6 infiziert. Zwischen Tag 4 und 14 nach der Infektion verendeten 85,7 % der mit ESV infizierten Welse, während in den anderen Gruppen keine signifikanten Mortalitäten verzeichnet wurden. Virus wurde nur von den mit ESV infizierten Welsen reisoliert. Die Wassertemperatur hatte maßgeblichen Einfluss auf die Inkubationszeit nach Infektion mit ESV. Das Virus vermehrte sich bei 25 °C im Wirt deutlich schneller und erste Mortalitäten traten erheblich früher auf als bei 15 °C Wassertemperatur. Die kumulative Mortalität war jedoch letztendlich bei 25 °C geringer als bei 15 °C Wassertemperatur.

Im zweiten Infektionsversuch bei 25 °C Wassertemperatur (TV 25/II) wurden juvenile Welse mit einer Größe von ca. 2 cm und einem durchschnittlichen Gewicht von 0,5 g mit EHNV, ESV, ECV, ECV-24, BIV und FV3 infiziert. Aufgrund massiver Verluste durch Kannibalismus in allen Versuchsgruppen einschließlich der Kontrollgruppe wurde dieser Versuch nach 12 Tagen beendet. Während der verkürzten Versuchsdauer von 12 Tagen p. i. wurde in den mit ESV, ECV und ECV-24 infizierten Versuchsgruppen eine erhöhte kumulative Mortalität beobachtet. Die kumulative Mortalität betrug nach Infektion mit ESV 84,4 %, bei ECV 54,4 % und bei ECV-24 81,1 %. Virusgenom aller drei Virusisolate wurde anschließend im Organmaterial verendeter wie auch bis zum Tag 12 p. i. überlebender Welse in der PCR nachgewiesen. Die Virusreisolierung des ESV, ECV und ECV-24 in der Zellkultur erbrachte ebenfalls entsprechend positive Ergebnisse. In den mit EHNV, BIV und FV3 infizierten Versuchsgruppen und in der Kontrollgruppe waren abgesehen von den Verlusten durch den ausgeprägten Kannibalismus der Welse keine signifikanten Mortalitäten zu verzeichnen. Weder Virusgenom des EHNV, BIV und FV3 noch replikationsfähiges Virus wurde in den entsprechenden Organmaterial-Proben nachgewiesen.

Aufgrund der durch Kannibalismus verursachten hohen Verlusten in allen Gruppen ist keine eindeutige Aussage hinsichtlich einer virusinduzierten kumulativen Mortalitäten zu treffen. Die Erreger ESV, ECV und ECV-24 wurden aus dem Organmaterial sowohl verendeter als auch überlebender Welse bis Tag 12 p. i. reisoliert. Von EHNV, BIV und FV3 infizierten Welsen waren sowohl der Virusnachweis (Reisolation des Erregers) als auch der virale Genomnachweis (PCR) negativ. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass juvenile Welse bei einer Wassertemperatur von 25 °C empfänglich sind für ESV, ECV und ECV-24, nicht jedoch für EHNV, BIV und FV3.

Das Auftreten signifikant erhöhter Mortalitätsraten nach Infektion mit ESV war in allen Wels-Versuchen zu erwarten, da es sich beim ESV um ein originäres Welsvirus handelt. In vergleichbaren Versuchen von Ogawa et al. (1990) hatte die Infektion von Welsbrut bei einer Wassertemperatur von 25 °C zu einer kumulativen Mortalität von 100 % geführt.

Die Empfänglichkeit der juvenilen Welse für ECV und ECV-24 unterstützt die Annahme, dass es sich bei ESV und ECV um verschiedene, möglicherweise temperaturadaptierte Isolate desselben Virus handelt, da diese Ranavirusisolate auch in ihrer MCP-Gensequenz identisch sind. Ursache für die erhöhte Empfänglichkeit der juvenilen Welse im Vergleich zu den adulten Welsen kann einerseits die erhöhte Wassertemperatur von 25 °C sein, andererseits kann in diesem Zusammenhang auch das Alter der Welse entscheidend sein.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Hauptstrukturprotein-Gen (MCP-Gen) der Ranaviren EHNV, ESV, ECV, FV3, BIV, REV, PPIV, SERV, RTRV, GV6, DFV und LMBV vergleichend analysiert. Im Gegensatz zu den restlichen analysierten Viren war die Amplifikation des MCP-Gens der Santee-Cooper Ranaviren GV6, DFV und LMBV mit bekannten Methoden (Hyatt et al., 2000) entgegen den Erwartungen nicht erfolgreich. Das MCP-Gen des GV6, DFV und LMBV wurde daraufhin mittels Southernblot-Analyse, Shotgun-Klonierung und PCR-Analysen identifiziert, vollständig sequenziert und charakterisiert.

Erstmals wurde eine neue PCR-Methode zum Nachweis von Ranavirusgenom aller analysierten Vertreter der Gruppen des Genus *Ranavirus* etabliert (PAN-RANA-MCP PCR). Diese Methode ermöglicht auch den zuverlässigen Nachweis der Santee-Cooper Ranaviren GV6, DFV und LMBV. Durch Restriktions- und Sequenzanalysen des PAN-RANA-MCP PCR-Produkts ist eine eindeutige Identifizierung aller analysierten Ranaviren möglich.

Die vergleichende Analyse der MCP-Nukleotidsequenz der genannten Ranaviren ermöglicht eine phylogenetische Eingruppierung. Die Ranaviren EHNV, ESV, ECV, FV3, BIV, REV, PPIV und RTRV weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie untereinander auf. Die Homologiewerte liegen jeweils zwischen 97,1 bis 100 % bezogen auf die MCP-Nukleotidsequenz (1392 nt). Die Isolate ESV und ECV sowie ECV-24 sind anhand ihrer zu 100 % identischen MCP-Gensequenz nicht zu unterscheiden. Das SERV unterscheidet sich in der MCP-Nukleotidsequenz mit Homologiewerten zwischen 93,9 und 95,7 % stärker von den genannten Ranaviren (publiziert in Holopainen et al., 2009).

Eine Sonderstellung nehmen die Santee-Cooper Ranaviren DFV, GV6 und LMBV ein, welche sich im Gegensatz zu den publizierten Sequenzdaten von Hyatt et al. (2000) deutlich von den anderen untersuchten Ranaviren unterscheiden. Die Homologie der MCP-Nukleotidsequenz erreicht im Vergleich mit den oben genannten Ranaviren nur Werte zwischen 77,9 und 78,5 %. GV6 und DFV sind in ihrer MCP-Gensequenz zu 100 % identisch. Ausgehend von der Annahme dass es sich bei Erregern mit einer Gensequenzhomologie von mindestens 95 % um Viren derselben Gruppe handelt (Chinchar et al., 2005), können die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Ranaviren zu zwei Gruppen zusammengefasst werden. Eine große Virusgruppe wird dabei von den Viren EHNV, ESV, ECV, FV3, BIV, REV, PPIV, RTRV und SERV gebildet, während es sich bei der zweiten Gruppe um die Santee-Cooper Ranaviren handelt. Der phylogenetische Vergleich mit weiteren in der GenBank verfügbaren Vertretern des Genus *Ranavirus* und der anderen Genera der Familie *Iridoviridae* bestätigt diese Einteilung in zwei Gruppen. Dabei erlauben alle weiteren verfügbaren Ranavirus-Sequenzdaten des MCP-Gens mit Ausnahme der Viren GIV und SGIV eine Zuordnung zu der ersten großen Hauptgruppe von Ranaviren. Die Viren GIV und SGIV hingegen bilden eine im Vergleich zu den Santee-Cooper Ranaviren noch stärker abweichende dritte Virusgruppe im Genus *Ranavirus*.

Die Betrachtung des morphologisch abweichenden CPE in der Zellkultur weist ebenfalls darauf hin, dass die Santee-Cooper Ranaviren eine Sonderstellung innerhalb des Genus *Ranavirus* einnehmen.

Das zweite Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Einschätzung des durch Ranaviren verkörperten Risikos für die Fischarten Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) und Wels (*Silurus glanis*). Hierzu wurden Infektionsversuche mit Welsen und Flussbarschen bei Wassertemperaturen von 15 °C und 25 °C mit verschiedenen Ranaviren durchgeführt.

Es wurde gezeigt, dass für europäische Flussbarsche mit einer Körperlänge von ca. 12 cm und einem durchschnittlichen Gewicht von 30 g bei 15 °C und 25 °C Wassertemperatur keine Empfänglichkeit für die getesteten Ranaviren EHNV, GV6, BIV, FV3, SERV und RTRV besteht. Es wurden weder klinische Symptome beobachtet noch konnte Virus aus Organmaterial reisoliert werden bzw. Virusgenom in der PCR nachgewiesen werden.

Adulte Welse mit einer durchschnittlichen Körpergröße von 10 cm und einem Gewicht von ca. 17 g erwiesen sich wie erwartet als hochempfindlich für ESV bei 15 °C und 25 °C Wassertemperatur. Unter den beschriebenen Bedingungen besteht jedoch keine Empfänglichkeit für die Ranaviren EHNV, SERV, REV, DFV und GV6. Obwohl ESV und ECV eine identische MCP-Gensequenz aufweisen, wurde eine unterschiedliche Empfänglichkeit der Welse für diese Erreger festgestellt. Im Gegensatz zu ESV waren die Welse bei einer Wassertemperatur von 15 °C für ECV nicht empfänglich. Der Einfluß der Temperatur und des Alters der Tiere auf die Empfänglichkeit der Welse für ECV wurden nach Infektion juveniler Welse mit einer Körperlänge von ca. 2 cm und einem Gewicht von ca. 0,5 g bei 25 °C Wassertemperatur bestätigt. Es wurden große Verluste nach Infektion dieser Tiere mit ESV, ECV und ECV-24 festgestellt. Ob es sich bei ESV, ECV und ECV-24 um Varianten desselben Virus handelt, muß in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

8 Summary

Within the framework of this dissertation, the major capsid protein gene (MCP gene) of the ranaviruses EHNV, ESV, ECV, FV3, BIV, REV, PPIV, SERV, RTRV, GV6, DFV und LMBV was analyzed by comparison. In contrast to the other ranaviruses and contrary to expectations, the amplification of the MCP gene of the Santee-Cooper ranaviruses GV6, DFV and LMBV was not successful applying published PCR methods (Hyatt et al., 2000). The MCP gene was thereupon identified, completely sequenced and characterized via southern blot analysis, shotgun cloning and PCR analysis.

For the first time a new PCR method for the detection of ranavirus genome of all analyzed representatives of the different groups in the genus *Ranavirus* was established (PAN-RANA-MCP PCR). The described method also allows the reliable detection of the Santee-Cooper ranaviruses GV6, DFV and LMBV. A definite identification of all analyzed ranaviruses is possible via restriction endonuclease - and sequence analyses of the PAN-RANA-MCP PCR product.

The comparative MCP nucleotide sequence analysis allows a phylogenetic grouping of the mentioned ranaviruses. The viruses EHNV, ESV, ECV, FV3, BIV, REV, PPIV und RTRV exhibit a very high sequence homology among each other. Homology values account to between 97.1 and 100 % regarding the MCP nucleotide sequence (1392 nt). The three isolates ESV, ECV and ECV-24 cannot be differentiated by their 100 % identical MCP gene sequence. The MCP gene sequence of the SERV differs from the other mentioned ranaviruses with sequence homology values between 93.9 and 95.7 % (published in Holopainen et al., 2009).

In contrast to published sequence data (Hyatt et al., 2000) the Santee-Cooper ranaviruses DFV, GV6 and LMBV gain an exceptional position since their MCP gene sequence differs considerably from the other investigated ranaviruses. Sequence MCP sequence homology values account to 77.9 and 78.5 % compared to the other ranaviruses. GV6 and DFV are 100 % identical in their MCP gene sequence. Taking into consideration that agents with sequence homology values of at least 95 % belong to the same virus group (Chinchar et al., 2005), the ranaviruses analyzed in this dissertation can be divided into two groups. Therefore the viruses EHNV, ESV, ECV, FV3, BIV, REV, PPIV, RTRV and SERV cluster together in one main group, whereas the second group consists of the Santee-Cooper ranaviruses GV6, DFV and LMBV. The phylogenetic comparison with further agents of the genus *Ranavirus* and the other genera of the family *Iridoviridae* available in GenBank confirms this division into two groups. Thus, all in GenBank available ranavirus sequence data of the MCP gene with the exception of the two viruses GIV and SGIV allow a classification to the first main group of ranaviruses. The viruses GIV and SGIV on the other hand represent a third group of ranaviruses diverging even stronger from the other ranaviruses than the Santee-Cooper ranaviruses.

Regarding the morphologically distinguishing CPE in cell culture, the exceptional position of the Santee-Cooper ranaviruses within the genus *Ranavirus* is approved.

The second aim of this dissertation was the estimation of the risk that ranaviruses pose to the European fish species perch (*Perca fluviatilis*) and sheatfish (*Silurus glanis*). Therefore, infection trials with perch and sheatfish at 15 °C and 25 °C water temperature were carried out with a panel of ranaviruses.

It was demonstrated that European perch with a body length of approximately 12 cm and an average weight of 30 g are not susceptible to the ranaviruses EHNV, GV6, BIV, FV3, SERV und RTRV at a water temperature of 15 °C and 25 °C. Neither were clinical symptoms observed nor was virus re-isolated from organ material or viral genome detected by PCR.

Adult sheatfish with an average body length of 10 cm and a weight of approximately 17 g were proven to be highly susceptible to infection with ESV at 15 °C and 25 °C water temperature. Under the described conditions no susceptibility to the viruses EHNV, SERV, REV, DFV und GV6 was observed. At a water temperature of 15 °C the sheatfish were also not susceptible to ECV which shares an identical MCP gene sequence with ESV.

An influence of water temperature and age of the animals on the susceptibility of the sheatfish was detected after infection of juvenile sheatfish with an average body length of 2 cm and a weight of approximately 0.5 g at 25 °C water temperature. High numbers of mortalities were observed after infection with ESV, ECV and ECV-24.

Whether ESV, ECV and ECV-24 are variants of the same virus isolate has to be confirmed in further investigations.

Abkürzungsverzeichnis

ALIV	African Lampeye Iridovirus
Anon.	Anonym
ATIV	Aedes Taeniorhynchus Iridescent Virus
ATP	Adenosintriphosphat
ATSV	Ambystoma Tigrinum Stebbensi Virus
ATV	Ambystoma Tigrinum Virus
ATV	„antibiotic-trypsin-verdene“ (Trypsin-Versen-Lösung)
BIV	Bohle Iridovirus
BPIV	Barramundi Perch Iridovirus
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCLV Rie88/173	„Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine“ der Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit Insel Riems/ Katalognummer
cDNA	komplementäre DNA
CIP	„Calf intestinal phosphatase“ (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CPE	„cytopathogenic effect“ (zytopathogener/ zytopathischer Effekt)
CPFIV	Common Ponyfish Iridovirus
C-terminal	Carboxy-terminal
CZIV	Costelytra Zealandica Iridescent Virus
°C	Grad Celsius
DFV	Doctor Fish Virus
DGIV	Dwarf Gourami Iridovirus
d. h.	das heißt
DNA	„desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpi	„days post infection“ (Tage nach der Infektion)
ECV	European Catfish Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
EGTA	Ethylenglycoly-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EHNV	Epizootisches Hämatopoietisches Nekrosevirus
engl.	englisch
ESV	European Sheatfish Virus
et al.	„et alii“ (und andere)
FKS	Fötale Kälberserum
for	„forward“
FV3	Frog Virus 3
g	Gramm
G+C Gehalt	Guanin und Cytosin Anteil an der Gesamtzahl der DNA-Basen
GIV	Grouper Iridovirus
GSDIV	Grouper Sleepy Disease Iridovirus
GSPIV	Giant Seaperch Iridovirus
GV6	Guppy Virus 6

h	Stunde
HRP	„horseradish peroxidase“ Meerrettich-Peroxidase
H ₂ O	Reinstwasser
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IHNV	Infectious Hematopoietic Necrosis Virus
Ins.IV	Insect Iridescent Virus
IIV 6	Invertebrate Iridescent Virus 6
ISKNV	Infectious Spleen and Kidney Necrosis
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
KFIV	Korean Flounder Iridovirus
KGIV	King Grouper Iridovirus
KHV	Koi Herpes Virus
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCDV	Lymphocystis Disease Virus
LMBV	Largemouth Bass Virus
LYCIV	Large Yellow Croaker Iridovirus
M	Molar
mAU	milliAnson Unit (milliAnson-Einheit)
MCIV	Murray Cod Iridovirus
MCP	„major capsid protein“
mg	Milligramm
min	Minute
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mMol	Millimolar
m.o.i.	„multiplicity of infection“
mRNA	„messenger“ RNA (Boten-RNA)
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
N-terminal	Amino-terminal
OFIV	Olive Flounder Iridovirus
OIE	„Office Internationale des Epizooties“ (Weltorganisation für Tiergesundheit)
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
pers. Komm.	persönliche Kommunikation/ Mitteilung
pH	„potentia hydrogenii“ (negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
pMol	Pikomolar
p. i.	„post infectionem“
PPIV	Pike-Perch Iridovirus
RANA	Risk Assessment of New and Emerging Systemic Iridoviral Diseases for European Fish and Aquatic Ecosystems
RBIV	Rock Bream Iridovirus
REV	Rana Esculenta Virus
rev	„reverse“
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)

RNase	Ribonuklease
RSIV	Red Sea Bream Iridovirus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RTRV	Rana Tigrina Ranavirus
s	Sekunde
s. Abb.	siehe Abbildung
SBIV	Sea Bass Iridovirus
SCIV	Santee-Cooper Iridovirus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDW	Steriles destilliertes Wasser
SERV	Shortfin Eel Virus
SGIV	Singapore Grouper Iridovirus
SSBIV	Silver Sea Bream Iridovirus
SSC	„standard saline citrate“ (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)
SSTIV	Soft-shelled Turtle Iridovirus
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCID ₅₀ / ml	„tissue culture infectious dose“
TFV	Tiger Frog Virus
TIF	Tipoula Iridescent Virus
TRBIV	Turbot Reddish Body Iridovirus
TV	Tierversuch
U	Unit (Einheit)
ü. N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VHSV	Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus
WIV	Wiseana Iridescent Virus
x	mal
z. B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
&	und
%	Prozent

Literaturverzeichnis

- AHNE W. und ESSBAUER S.: Globales Amphibiensterben: Sind Virus- (Iridovirose) und Pilzinfektionen (Chytridiomykosen) ursächlich beteiligt? *elaphe*. 2000, *8* (2), S.82-86,
- AHNE W., BEARZOTTI M., BREMONT M., ESSBAUER S.: Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1998, *45* (6), S.373-83,
- AHNE W., BREMONT M., HEDRICK R. P., HYATT A. D., WHITTINGTON R. J.: Special topic review: Iridoviruses associated with epizootic haematopoietic necrosis (EHN) in aquaculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1997, *13*, S.367-373,
- AHNE W., OGAWA M., SCHLOTFELDT H. J.: Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish (*Silurus glanis*). *Zentralbl Veterinarmed B.* 1990, *37* (3), S.187-90,
- AHNE W., SCHLOTFELDT H. J., THOMSEN I.: Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *Zentralbl Veterinarmed B.* 1989, *36* (5), S.333-6,
- Anon. : 2001/183/EC: Commission Decision of 22th Feb 2001 laying down the sampling plans and diagnostic methods for the detection and confirmation of certain fish diseases and repealing Decision 92/532/EEC. *Official Journal of the European Communities (L067, 0065-0076)*. 2001, *31*, S.436-442,
- AO J. und CHEN X.: Identification and characterization of a novel gene encoding an RGD-containing protein in large yellow croaker iridovirus. *Virology* 2006, *355* (2), 213-222
- BANG JENSEN B., KJAER ERSBOLL A., ARIEL E.: Susceptibility of pike *Esox lucius* to a panel of Ranavirus isolates. *Dis. Aquat. Org.* 2009, *83*, S.169-179,
- BLOCH B. und LARSEN J. L.: An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis. Aquat. Org.* 1993, *15*, S.235-240,
- BOVO G., COMUZI M., CESCIA G., GIORGETTI G. GIACOMETTI P., CAPPELLOZZA E.: Isolamento di un agente virale irido-like da pesce gatto (*Ictalurus melas*) dall'levamento. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*. 1993, *11*, S.3-10,
- BOVO G., GIACOMETTI P., MONTESI F., CAPPELLOZZA E., ORMELLI: Isolation of an iridovirus-like agent from New Zealand Eel. *Proceedings EAFP Rhodes*. 1999,
- CAMERON I.R.: Identification and characterization of the gene encoding the major structural protein of insect iridescent virus type 22. *Virology* 1990, *178* (1), 35-42
- CHEN Z., ZHENG J., JIANG Y.: A new iridobirus isolated from soft-shelled turtle. *Virus Research*. 1999, *63*, S.147-151,

- CHINCHAR V. G.: *Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers*. Arch Virol. [2002](#), *147*, S.[447-470](#),
- CHINCHAR V. G., ESSBAUER S., HE J. G., HYATT A., MIYAKI T., SELIGY V., WILLIAMS T.: *Iridoviridae*. Hrsg.: FAUQUET C. M., MAYO M. A., MANILOFF J., DESSELBERGER U., GALL L. A.: *Virus Taxonomy: 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of viruses*. London, Elsevier, [2005](#) S.[145-162](#),
- CULLEN B. R., OWENS L.: *Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans*. Dis. Aquat. Org. [2002](#), *49*, S.[83-92](#),
- CUNNINGHAM A. A., LANGTON T. E. S., BENNETT P. M., LEWIN J. F., DRURY S. E. N., GOUGH R. E., MACGREGOR S. K.: *Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. [1996](#), *351*, S.[1539-1557](#),
- DELHON G., TULMAN E.R., AFONSO C.L., LU Z., BECNEL J.J., MOSER B.A., KUTISH G.F., ROCK D.L.: *Genome of invertebrate iridescent virus type 3 (mosquito iridescent virus)*. J. Virol. [2006](#), *80 (17)*, [8439-8449](#)
- DELIUS H., DARAI G., FLUGEL R.M.: *DNA Analysis of Insect Iridescent Virus 6: Evidence for Circular Permutation and Terminal Redundancy*. J. Virol. [1984](#), *49 (2)*, [609-614](#)
- DO J. W., CHA S. J., KIM J. S., AN E. J., LEE N. S., CHOI H. J., LEE C. H., PARK M. S., KIM J. W., KIM Y. C., PARK J. W.: *Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea*. Dis. Aquat. Org. [2005](#), *64 (3)*, S.[193-200](#),
- DO J. W., CHA S.J., KIM J. S., AN E. J., PARK M. S., KIM J. W., KIM Y. C., PARK M. A., PARK J. W.: *Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses*. Arch Virol. [2005](#), *150 (2)*, S.[351-359](#),
- EATON B. T., HYATT A. D., HENGSTBERGER S.: *Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification*. Journal of Fish Diseases. [1991](#), *14*, S.[157-169](#),
- ESSBAUER S. und AHNE W.: *Review paper viruses of lower vertebrates* . J. Vet. Med. B. [2001](#), *48*, S.[403-475](#), 0931-1793.
- FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTIC I., ZWILLENBERG L. O., : *Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.)*. Vetrinarski Arhiv. [1991](#), *61 (3)*, S.[151-158](#),
- FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUGINIC D., ZWILLENBERG L. O., CHILMONCZYKI S., VAUTHEROT J. F., DE KINKELIN P.: *Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*)*. Ann. Virol. (Inst. Pasteur). [1983](#), *134*, S.[207-220](#),
- FOX S. F., GREER A. L., TORRES-CERVANTES R., COLLINS J. P.: *First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus**. Dis. Aquat. Organ. [2006](#), *72 (1)*, S.[87-92](#),

- GO J., LANCASTER M., DEECE K., DHUNGYEL O., WHITTINGTON R.: The molecular epidemiology of iridovirus in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) and dwarf gourami (*Colisa lalia*) from distant biogeographical regions suggests a link between trade in ornamental fish and emerging iridoviral diseases. *Mol. Cell. Probes*. [2006](#), *20* (3-4), S.[212-222](#),
- GOORHA R.: Family Iridoviridae. Hrsg.: MURPHY F. A., FAUQUET C. M., BISHOP D. H. L., GHABRIAL S. A., JARVIS A. W., MARTELLI G. P. et al. (Eds.): Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. [1995](#), *Arch. Virol. Suppl.* *10*, [1995](#) S.[95-99](#),
- GOULD A. R., HYATT A. D., HENGSTBERGER S. H., WHITTINGTON R. J., COUPAR B. E. H.: A polymerase chain reaction (PCR) to detect epizootic haematopoietic necrosis virus and Bohle iridovirus. *Dis. Aquat. Org.* [1995](#), *22*, S.[211-215](#),
- GRANOFF A., CAME P.E., KEEN A., RAFFERTY Jr.: The isolation and properties of viruses from *Rana pipiens*: their possible relationship to the renal adenocarcinoma of the leopard frog. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* [1965](#), *126*, S.[237-255](#),
- GRIZZLE J. M., ALTINOK I., FRASER W. A., FRANCIS-FLOYD R.: First isolation of largemouth bass virus. *Dis. Aquat. Organ.* [2002](#), *50*, S.[233-235](#),
- HE J.G., DENG M., WENG S.P., LI Z., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z., CHAN S.M.: Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology* [2001](#), *291* (1), [126-139](#)
- HE J. G., LÜ L., DENG M., HE H. H., WENG S. P., WANG X. H., ZHOU S. Y., LONG Q. X., WANG X. Z., CHAN S. M.: Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology*. [2002](#), *292*, S.[185-197](#),
- HEDRICK R. P. und MCDOWELL T.S.: Properties of iridoviruses from ornamental fish. *Vet. Res.* [1995](#), *26* (5-6), S.[423-427](#),
- HENGSTBERGER S. G., HYATT A. D., SPEARE R., COUPAR B. E. H.: Comparison of epizootic haematopoietic necrosis and Bohle iridoviruses, recently isolated Australian iridoviruses. *Dis. Aquat. Organ.* [1993](#), *15*, S.[93-107](#),
- HOLOPAINEN R., OHLEMEYER S., SCHÜTZE H., BERGMANN S. M., TAPIOVAARA H.: Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis Aquat Org.* [2009](#), *85*, S.[81-91](#),
- HYATT A. D., EATON B. T., HENGSTBERGER S., RUSSEL G.: Epizootic haematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immunohistochemistry and immunoelectronmicroscopy. *Journal of Fish Diseases*. [1991](#), *14*, S.[605-617](#),

- HYATT A. D., GOULD A. R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A. A., HENGSTBERGER S., WHITTINGTON R. J., KATTENBELT J. und COUPAR B. E. H.: Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch Virol.* 2000, *145*, S.301-331,
- HYATT A. D., WILLIAMSON M., COUPAR B. E. H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S., GOULD A. R., SELLECK P., WISE T. G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A. A., LEE J.: First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *Journal of Wildlife Diseases.* 2002, *38* (2), S.239-252,
- JANCOVICH J. K., MAO J., CHINCHAR V. G., WYATT C., CASE S. T., KUMAR S., VALENTE G., SUBRAMANIAN S., DAVIDSON E. W., COLLINS J. P., JACOBS B. L.: Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America. *Virology.* 2003, *316*, S.90-103,
- KANCHANAKHAN S., SADUAKDEE U., KREETHACHAT A., CHINABUT S.: Isolation of an FV3-like iridovirus from cutaneous ulceration and systemic inflammation with exuberant hematopoiesis or CSE disease of cultured frog, *Rana tigrina* Cantor, in Thailand. *Aahri Newsletter.* 1998, *7* (2), S.1-2,
- KÄRBER G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1931, *162* (4), S.480-483,
- KIM T.J., JUNG T.S., LEE J.I.: Expression and serological application of a capsid protein of an iridovirus isolated from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*(Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.* 2007, *30* (11), 691-699
- LANGDON J. S.: Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redbfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *Journal of Fish Diseases.* 1989, *12*, S.295-310,
- LANGDON J. S., HUMPHREY J. D.: Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redbfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia. *Journal of Fish Diseases.* 1987, *10*, S.289-297,
- LANGDON J. S., HUMPHREY J. D., WILLIAMS L. M.: First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redbfin perch, *Perca fluviatilis* L.. *Journal of Fish Diseases.* 1986, *9*, S.263-268,
- LANGDON J. S., HUMPHREY J. D., WILLIAMS L. M.: Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *Journal of Fish Diseases.* 1988, *11*, S.93-96,
- MAO J., GREEN D. E., FELLERS G., CHINCHAR V. G.: Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. *Virus Research.* 1999, *63*, S.45-52,
- MAO J., HEDRICK R. P., CHINCHAR V. G.: Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology.* 1997, *229*, S.212-220,
- MAO J., THAM T. N., GENTRY G. A., AUBERTIN A., CHINCHAR V. G.: Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology.* 1996, *216*, S.431-436,

- MAO J., WANG J., CHINCHAR G. D., CHINCHAR V. G.: Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Dis. Aquat. Organ.* 1999, *37* (2), S.107-114,
- MARSCHANG R. E., BECHER P., POSTHAUS H., WILD P., THIEL H. J., MÜLLER-DOBLIES U., KALETA E. F., BACCIARINI L. N.: Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Arch. Virol.* 1999, *144*, S.1909-1922,
- MARSH I. B., WHITTINGTON R. J., O'ROURKE B., HYATT A. D., CHISHOLM O.: Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Mol. Cell. Probes.* 2002, *16*, S.137-151,
- MCGROGAN D. G., OSTLAND V. E., BYRNE P. J., FERGUSON H. W.: Systemic disease involving an iridovirus-like agent in cultured tilapia, *Oreochromis niloticus* L., a case report. *Journal of Fish Diseases.* 1998, *21*, S.149-152,
- MILLER D.L., RAJEEV S., GRAY M.J., BALDWIN C.A.: Frog Virus 3 Infection, Cultured American Bullfrogs. *Emerging Infectious Diseases.* 2007, *13* (2),
- MOODY N. J. G. und OWENS L.: Experimental demonstration of the pathogenicity of a frog virus, Bohle iridovirus, for a fish species, barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.* 1994, *18*, S.95-102,
- MURTI K. G., GOORHA R., GRANOFF A.: An unusual replication strategy of an animal iridovirus. *Adv. Virus Res.* 1985, *30*, S.1-19,
- OGAWA M., AHNE W., FISCHER-SCHERL T., HOFFMANN R. W., SCHLOTFELDT H. J.: Pathomorphological alterations in sheatfish fry *Silurus glanis* experimentally infected with an iridovirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.* 1990, *9*, S.187-191,
- PALLISTER J., GOULD A., HARRISON D., HYATT A., JANCOVICH J., HEINE H.: Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *Journal of Fish Diseases.* 2007, *30*, S.427-438,
- PLUMB J. A. & ZILBERG D.: The lethal dose of largemouth bass virus in juvenile largemouth bass and the comparative susceptibility of striped bass. *Journal of Aquatic Animal Health.* 1999, *11*, S.246-252,
- PLUMB J. A., GRIZZLE J. M., YOUNG H. E., NOYES A. D.: An iridovirus isolated from wild largemouth bass. *J. Aq. Anim. Health.* 1996, *8*, S.265-270,
- PLUMB J. A., NOYES A. D., GRAZIANO S., WANG J., MAO J., CHINCHAR V. G.: Isolation and identification of viruses from adult largemouth bass during a 1997-1998 survey in the southeastern United States. *Journal of Aquatic Animal Health.* 99, *11*, S.391-399,
- POZET R., MORAND M., MOUSSA A., TORHY C., DE KINKELIN P.: Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish *Ictalurus melas*. *Dis. Aquat. Organ.* 1992, *14*, S.35-42,

- REDDACLIFF L. A. und WHITTINGTON R. J.: Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Path.* 1996, *115*, S.103-115,
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T.: *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- SHI C.Y., WANG Y.G., YANG S.L., HUANG J., WANG Q.Y.: The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture* 2004, *236*, 11-25
- SIWICKI A. K., POZET F., MORAND M., VOLATIER C., TERECH-MAJEWSKA E.: Effects of iridovirus-like agent on the cell mediated immunity in sheatfish (*Silurus glanis*)- an in vitro study. *Virus Research.* 1999, *63*, S.115-119,
- SONG W. J., QIN Q. W., QIU J., HUANG C. H., WANG F., HEW C. L.: Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis. *Journal of Virology.* 2004, *78* (22), S.12576-12590,
- SPEARE R. und SMITH J. R.: An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.* 1992, *14*, S.51-57,
- SPEARMAN C.: The method of right and wrong cases (constant stimuli) with Gauss formulae. *Br. J. Psychol.* 1908, *2*, S.227,
- STOHWASSER R., RAAB K., SCHNITZLER P., JANSSEN W., DARAI G.: Identification of the gene encoding the major capsid protein of insect iridescent virus type 6 by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 1993, *74* (PT 5), 873-879
- SUDTHONGKONG C., MIYATA M., MIYAZAKI T.: Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch Virol.* 2002, *147*(11): 2089-109.
- SUDTHONGKONG C., MIYATA M., MIYAZAKI T.: Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis Aquat Organ.* 2002, *5*;48(3):163-73.
- TAJBAKHSH S., LEE P.E., WATSON D.C., SELIGY V.L.: Molecular cloning, characterization, and expression of the *Tipula* iridescent virus capsid gene. *J. Virol.* 1990, *64* (1), 125-136
- TAN W. G. H., BARKMAN T. J., CHINCHAR V. G., ESSANI K.: Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus *Ranavirus* (family *Iridoviridae*). *Virology.* 2004, *323*, S.70-84,
- TAPIOVAARA H., OLESEN N., LINDEN J., RIMAILA-PÄRNÄMEN E., von BORNSDORFF C.: Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Dis. Aquat. Org.* 1998, *32*, S.185-193,
- TIDONA C.A., DARAI G.: The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. *Virology* 1997, *230* (2), 207-216

- TIDONA C. A., SCHNITZLER P., KEHM R., DARAI G.: Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? *Virus Genes*. [1998](#), *16 (1)*, S.[59-66](#),
- TSAI C. H., TING J. W., WU M. H., WU M. F., GUO I. C., CHANG C. Y.: Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. *Journal of Virology*. [2005](#), *79 (4)*, S.[2010-2023](#),
- TSAI C.T., LIN C. H., CHANG C. Y.: Analysis of codon usage bias and base compositional constraints in iridovirus genomes. *Virus Research*. [2007](#), *126*, S.[196-206](#),
- WANG C.S., CHAO S.Y., KU C.C., WEN C.M., SHIH H.H.: PCR amplification and sequence analysis of the major capsid protein gene of megalocytiviruses isolated in Taiwan. *J. Fish Dis*. [2009](#), *32 (6)*, [543-550](#)
- WEBBY R.J. und KALMAKOFF J.: Comparison of the major capsid protein genes, terminal redundancies, and DNA-DNA homologies of two New Zealand iridoviruses. *Virus Res*. [1999](#), *59 (2)*, [179-189](#)
- WEN C.M., LEE C.W., WANG C.S., CHENG Y.H., HUANG H.Y.: Development of two cell lines from *Epinephelus coioides* brain tissue for characterization of betanodavirus and megalocytivirus infectivity and propagation. *Aquaculture* [2008](#), *278 (1-4)*, [14-21](#)
- WENG S. P., HE J. G., WANG X. H., LÜ L., DENG M., CHAN S. M.: Outbreaks of an iridovirus disease in cultured tiger frog, *Rana tigrina rugulosa*, in southern China. *Journal of Fish Diseases*. [2002](#), *25*, S.[423-427](#),
- WHITTINGTON R. J. und REDDACLIFF G. L.: Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Australian Veterinary Journal*. [2008](#), *72*, S.[421-424](#),
- WHITTINGTON R. J., PHILBEY A., REDDACLIFF G. L., MACGOWN A. R.: Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *Journal of Fish Diseases*. [1994](#), *17*, S.[205-218](#),
- WOLF K. und MANN J. A.: Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro*. [1980](#), *16*, S.[168-179](#),
- WOODLAND J. E., BRUNNER C. J., NOYES A. D., GRIZZLE J. M.: Experimental oral transmission of largemouth bass virus. *Journal of Fish Diseases*. [2002](#), *25*, S.[669-672](#),
- ZHAO Z., TENG Y., LIU H., LIN X., WANG K., JIANG Y., CHEN H.: Characterization of a late gene encoding for MCP in soft-shelled turtle iridovirus (STIV). *Virus Res*. [2007](#), *129 (2)*, [135-144](#)
- ZUPANOVIC Z., LOPEZ G., HYATT A. D., GREEN B., BARTRAN G., PARKES H., WHITTINGTON R. J., SPEARE R.: Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against ranaviruses. *Dis. Aquat. Org*. [1998](#), *32*, S.[1-8](#),

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C. L., HYATT A. D., HENGSTBERGER S.,
ROBINSON A. J.: Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in
Venezuela. *Dis. Aquat. Org.* 1998, 33, S.1-9,

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. T. C. Mettenleiter, Präsident des Bundesforschungsinstitutes für Tiergesundheit, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. M. El-Matbouli für die Ermöglichung meiner Dissertationsarbeit.

Herrn Dr. med. vet. habil. V. Kaden und PD Dr. Dr. med. vet. T. W. Vahlenkamp danke ich für die anregenden Diskussionen und die freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. S. M. Bergmann danke ich für die Vorgabe des Themas, die Ermöglichung meiner Dissertationsarbeit und die Hilfe bei der Durchführung und Planung der Infektionsversuche.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. H. Schütze für die freundliche Aufnahme im Labor, die tatkräftige geduldige Unterstützung, das unermüdliche Engagement und die kritische Durchsicht und Diskussion der Manuskripte.

Frau S. Franz danke ich für ihre tatkräftige fleißige Unterstützung und die vielen fröhlichen Stunden im Labor.

Herrn Dr. med. vet. D. Fichtner danke ich für die bereitwillige Hilfe bei der Durchführung der Infektionsversuche.

Außerdem danke ich Frau I. Werner für ihre technische Unterstützung im Labor, Herrn Dr. rer. nat. habil. H. Granzow für seine Hilfe und die Bereitstellung der Abbildungen, Herrn G. Strebelow und Frau Biebl für die Durchführung der Sequenzierungsarbeiten und Herrn G. Kotterba für die Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen, sowie den Tierpflegern für ihr Engagement.

Mein herzlicher Dank gilt zudem den Partnern des EU-Projektes Rana (Risk Assessment of New and Emerging Systemic Iridoviral Diseases for European Fish and Aquatic Ecosystems", Projekt-Nr. SSPE-CT-2005-006459) für die vielen anregenden Diskussionen und die Bereitstellung der Virusisolate und die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank an dieser Stelle gilt Frau R. Holopainen, Frau Dr. H. Tapiovaara und Frau B. Bang-Jensen.

Mein wärmster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir stets geduldig zur Seite gestanden haben.

Anhang 1: Puffer und Reagenzien

Agarose (Electrophoresis grade)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	RdH, Seelze, Deutschland
Restriktionspuffer A	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Restriktionspuffer B, H	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA Laboratories Pasching, Österreich
Baytril 10% Enrofloxacin	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (50%)	Amersham, Little Chalfont, UK
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tris	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dodecylsulfat Natriumsalz LAB (SDS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 / 24 / 1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextrose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Xylencyanolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland

Agarosegel 1%

Agarose	0,7g
TAE (50x)	1,4 ml
Ethidiumbromid (10mg/ml in H ₂ O)	2 µl
SDW	ad 70 ml

Agarosegel 2%

Agarose	1,4 g
TAE (50x)	1,4 ml
Ethidiumbromid	2 µl
SDW	ad 70 ml

TAE Puffer 50x

Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA (0,5 M pH 8,0)	100 ml
SDW	ad 1l

PBS Puffer 1x

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
SDW	ad 1 l
HCl	ad pH 7,4

Trypsinlösung (ATV)

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
Dextrose	1,0 g
NaHCO ₃	0,58 g
Trypsin	0,5 g
EDTA	0,2 g
Reinstwasser	ad 1 l
pH	7,1-7,3

DNA Ladepuffer blau

Bromphenolblau	40 µg
Xylencyanolblau	40 µg
Glycerol	500 µl
EDTA (0,5 M pH 8,0)	20 µl
SDW	ad 1 ml

DNA Ladepuffer klar

Glycerin	500 µl
EDTA (0,5 M pH 8,0)	20 µl
SDW	ad 1 ml

Enzyme

Enzym	Firma
Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche, Mannheim, Deutschland
HotStarTaq Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
T4 DNA Ligase (1 U / μ l)	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinase K (20 mg / ml; 600mAU / ml)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase A	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	
Kpn I	Promega, Madison, WI, USA
Hind III, Eco R I	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BamH I, Pst I, Afl III	New England Biolabs, Ipswich, MA USA
Hae II	USB, Staufen, Deutschland
Sal I, Xho I	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Marker

Als Standardmarker für DNA Fragmente mit einer Größe zwischen 500 bp und 12 kb im Elektrophoresegele wurden 0,5 μ g des 1 Kb DNA Ladder der Firma Invitrogen verwendet (1 μ g/ μ l).

Anhang 2: Material und Laborausrüstung

Kits

HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiagen Plasmid Buffer Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Big Dye Terminator v.1.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Post-Reaction Clean-Up Columns	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ECL 3'oligolabelling system	Amersham, Little Chalfont, UK
ECL detection system	Amersham, Little Chalfont, UK

Vektoren

pGEM-T easy Vector System I	Promega, Madison, WI, USA
pUC 18 Vector	Amersham, Little Chalfont, UK

Bakterien

Für Klonierungen wurden kompetente *Escherichia coli* Bakterien (MAX Efficiency DH10B Competent Cells, Invitrogen) verwendet.

Laborgeräte

Horizontales Gelelektrophoresesystem wide mini sub cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Genetic Analyzer 3130	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Fluoreszenzmikroskop IX51	Olympus, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop TMS	Nikon Instruments, Amstelveen, Niederlande
Spannungsgerät PowerPac 300	BioRad, Hercules, CA, USA
Spannungsgerät PowerPac Universal	BioRad, Hercules, CA, USA
Sterilbank LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	Framo, Eisenbach, Deutschland
Röntgenkassetten	Gerlinde Kisker, Mühlhausen, Deutschland
Spectrophotometer DU640	Beckmann, Fullerton, CA, USA
Tischzentrifuge Pico 21	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischkühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischwaage	Sartorius Göttingen, Deutschland
UV Transilluminator	Herolab, Wiesloch, Deutschland
UV Transilluminator	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
UV Transilluminator FLX – 20M	Serva, Heidelberg, Deutschland
UV Licht Kamera E.A.S.Y. 429 K	Herolab, Wiesloch, Deutschland
UV Licht Kamera Pieper FK7512 IQIR	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
UV Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, Waldbronn, Deutschland
Vortexer Zx ³	Uni Equip, München, Deutschland
Video – Printer P93E	Mitsubishi, Hatfield, UK
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Begasungsbrutschrank Autoflow IR CO ₂ Inkubator	NuAire, Plymouth, MN, USA
Brutschrank	Bachofer, Reutlingen, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Chromatographiepapier 3MM	Whatman, Kent, UK
Multiwell Platte 96well Costar	Corning Inc., Corning, NY, USA
Multiwell Platte 24well Costar	Corning Inc., Corning, NY, USA
Nitrocellulose – Transfer – Membran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S. 100 – 5000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Ultratip 100 - 1000 µl	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen Natural Pipette Tips, 1 - 200 µl	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1 – 10 µl	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Reagiergefäße SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße Natural Flat Cap Tubeone 2,0 ml	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Reagiergefäße Safe – Lock 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäße Safe – Lock 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilme Hyperfilm MP	Amersham, Little Chalfont, UK
Thermalpapier für Mitsubishi Video – Printer	Mitsubishi, Hatfield, UK

Anhang 3: Sequenzdaten Phylogenese

Verwendete MCP-Gensequenzdaten der Ranaviren

Abkürzung	Virus	GenBank Nummer	Referenz
ATV	Ambystoma Tigrinum Virus	NC_005832	Jancovich et al. 2003
ATSV*	Ambystoma Tigrinum Stebbensi Virus	AY150217	Jancovich et al. 2003
BIV	Bohle Iridovirus	AY187046 <i>FJ358613</i>	Marsh et al. 2002 <i>Holopainen et al. 2009</i>
DFV	Doctor Fish Virus	<i>unveröffent- licht</i>	
EHNV	Epizootisches Hämato-poetisches Nekrose Virus	AY187045	Marsh et al. 2002
ESV	European Sheatfish Virus	<i>FJ358609</i>	<i>Holopainen et al. 2009</i>
ECV	European Catfish Virus	<i>FJ358608</i>	<i>Holopainen et al. 2009</i>
FV3	Frog Virus 3	NC_005946 <i>FJ459783</i>	Tan et al. 2004 <i>Holopainen et al. 2009</i>
GIV	Grouper Iridovirus	AY666015	Tsai et al. 2005
GV6	Guppy Virus 6	<i>unveröf- fentlicht</i>	
LMBV	Largemouth Bass Virus	<i>unveröf- fentlicht</i>	
PPIV	Pike-Perch Iridovirus	<i>FJ358610</i>	<i>Holopainen et al. 2009</i>
REV	Rana Esculenta Virus Isolat Italy 282/ I02	<i>FJ358611</i>	<i>Holopainen et al. 2009</i>
RTRV	Rana Tigrina Ranavirus	AY033630	Mao et al. 2001
SERV	Shortfin Eel Virus	<i>FJ358612</i>	<i>Holopainen et al. 2009</i>
SGIV	Singapore Grouper Iridovirus	AY521625	Song et al. 2004
STIV	Soft-shelled Turtle Iridovirus	DQ335253	Zhao et al. 2007
TFV	Tiger Frog Virus	AF389451	He et al. 2002

GenBank Nummern der in den phylogenetischen Untersuchungen verwendeten MCP-Sequenzdaten
Genus *Megalocytivirus*

Abkürzung	Virus	GenBank Nummer	Referenz
ALIV*	African Lampeye Iridovirus	AY285745	Sudthongkong et al. 2002
BPIV*	Barramundi Perch Iridovirus	EU847418 EU847417	Wang et al. 2009
CPFIV*	Common Ponyfish Iridovirus	EU847420	Wang et al. 2009
DGIV*	Dwarf Gourami Iridovirus	AY285744	Sudthongkong et al. 2002
GSDIV*	Grouper Sleepy Disease Iridovirus	AY285746	Sudthongkong et al. 2002
GSPIV*	Giant Seaperch Iridovirus	EU315313	Wen et al. 2008
ISKNV	Infectious spleen and kidney necrosis virus	AF371960	He et al. 2001
KFIV*	Korean Flounder Iridovirus	AY633985 AY633986 AY633984 AY633992 AY633983 AY633982 AY633989 AY633988 AY633991 AY633990 AY633987 AY633980 AY633981	Do et al. 2005
KGIV*	King Grouper Iridovirus	EU847415 EU847414	Wang et al. 2009
LYCIV*	Large Yellow Croaker Iridovirus	AY779031	Ao & Chen 2006
MCIV*	Murray Cod iridovirus	AY936203	Go et al. 2006
OFIV*	Olive Flounder Iridovirus	DQ198145	Kim & Lee 2005
	Olive Flounder Iridovirus	AY661546	Kim et al. 2004
	Olive Flounder Iridovirus	EU276417	Jeong et al. 2007
RSIV*	Red Sea Bream Iridovirus	AY310918	Sudthongkong et al. 2002

RBIV*	Rock Bream Iridovirus	AY532611 AY532613 AY532612 AY532614 AY532610 AY532607 AY532608 AY532609 AY533035	Do et al. 2005
	Rock Bream Iridovirus	AY532606	Do et al. 2004
	Rock Bream Iridovirus	AY849394 AY849393	Kim et al. 2007
SBIV*	Sea Bass Iridovirus	AY310917	Sudthongkong et al. 2002
SSBIV*	Silver Sea Bream Iridovirus	EU847419	Wang et al. 2009
TRBIV*	Turbot Reddish Body Iridovirus	AY590687	Shi et al. 2004

GenBank Nummern der in den phylogenetischen Untersuchungen verwendeten MCP-Sequenzdaten
Genus *Iridovirus*

Abkürzung	Virus	GenBank Nummer	Referenz
CZIV*	Costelytra Zealandica Iridescent Virus	AF025775	Webby & Kalmakoff 1999
Ins.IV*	Insect Iridescent Virus	M32799	Cameron 1990
IIV 6	Invertebrate Iridescent Virus 6	M99395	Stohwasser et al. 1993
	Invertebrate Iridescent Virus 6	AF303741	Delius et al. 1984, 2001
TIV*	Tipoula Iridescent Virus	M33542	Tajbakhsh et al. 1990
WIV*	Wiseana Iridescent Virus	AF025774	Webby & Kalmakoff 1999

GenBank Nummern der in den phylogenetischen Untersuchungen verwendeten MCP-Sequenzdaten
Genus *Lymphocystivirus*

Abkürzung	Virus	GenBank Nummer	Referenz
LCDV*	Lymphocystis Disease Virus	AY849391	Kim & Lee 2005
	Lymphocystis Disease Virus	AY297741	Kim & Park 2003
	Lymphocystis Disease Virus	EF103188	Fu et al. 2006
	Lymphocystis Disease Virus	EF378607	Wang et al. 2007
	Lymphocystis Disease Virus	AY823414	Kim & Lee 2007
	Lymphocystis Disease Virus	NC_001824	Tidona & Darai 1997

GenBank Nummern der in den phylogenetischen Untersuchungen verwendeten MCP-Sequenzdaten
Genus *Chloriridovirus*

Abkürzung	Virus	GenBank Nummer	Referenz
ATIV*	Aedes Taeniorhynchus Iridescent Virus	DQ643392	Delhon et al. 2006

*: Die mit * markierten Abkürzungen wurden zur Vereinfachung der Abbildungen 23 und 24 herangezogen, es handelt sich hierbei nicht um offizielle Abkürzungen.