

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

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

**PCR Untersuchung von Abluftstäuben auf murine
Noroviren und murine Hepatitis Viren zur Verbesserung
des Hygienemonitorings von SPF Mäusen in IVC Haltung**

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

von
Christine Maria Moll
aus Rheinbach

München, 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Aigner
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Sutter

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	INHALTSVERZEICHNIS	3
II.	EINLEITUNG	8
	Fragestellung	9
III.	LITERATUR.....	12
1.	Maushaltung in IVCs.....	12
2.	Hygieneüberwachung von Mäusen.....	12
	Hygieneüberwachung in IVC Haltung	16
3.	Murine Noroviren	17
3.1.	Klassifikation und Übertragungswege.....	17
3.2.	Bedeutung von MNV in Maushaltungen und Auswirkungen auf Forschungsergebnisse	17
3.3.	MNV Eliminationsstrategien	18
3.4.	Umweltstabilität.....	18
3.5.	MNV Hygienemonitoring in IVCs	18
3.6.	MNV Nachweis im Abluftstaub	19
4.	Murine Hepatitis Viren.....	19
4.1.	MHV Klassifikation und Übertragungswege	20
4.2.	Bedeutung von MHV in Maushaltungen und Auswirkungen auf Forschungsergebnisse	20
4.3.	MHV Eliminationsstrategien	21
4.4.	Umweltstabilität.....	22
4.5.	Länge der Ausscheidungsphase und Übertragung von MHV auf Einstreusentinels in IVCs.....	22
4.6.	MHV Immunität	22
4.7.	MHV Hygienemonitoring in IVCs mit Luftsentinels	23
4.8.	MHV Nachweis im Abluftstaub	23

IV.	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	Material.....	25
1.1.	Chemikalien	25
1.2.	Auswertesoftware	25
1.3.	Geräte.....	26
1.4.	Kits.....	26
1.5.	Einwegmaterial	26
1.6.	Zellkultur und künstliche Infektion	26
1.7.	Maushaltung.....	27
1.8.	Maushaltung im Kleintierhaus.....	27
2.	Gewinnung und Extraktion viraler RNA	34
2.1.	RNA Extraktion aus Kot.....	34
2.2.	Gewinnung von Staubproben und RNA Extraktion	35
2.3.	RNA Extraktion aus Zellkulturüberstand	38
3.	RT- PCR Nachweis von MNV und MHV	38
3.1.	Konventionelle RT-PCR.....	38
3.1.	Konventionelle RT- PCR für MNV.....	40
3.2.	Konventionelle RT-PCR für MHV	41
3.3.	RT-qPCR mit Fam-Dabcyl Hydrolyse Sonde	42
4.	Virusvermehrung in der Zellkultur	48
5.	Serologische Untersuchung	49
5.1.	Blutentnahmetechnik	49
5.2.	Probenbearbeitung und Versand.....	50
6.	Sequenzierung eines MNV Virusisolates	51
6.1.	Herkunft	51
6.2.	Primerwalking.....	52
6.3.	Generierung der Gesamtsequenz	52

V.	ERGEBNISSE.....	53
1.	Hygienemonitoring von Mäusekolonien in offenen Käfigen.....	53
1.1.	Historische Serologie Daten der Einstreusentinel.....	53
1.2.	Übertragung von MNV und MHV auf Einstreusentinel in offener Haltung.....	54
1.3.	Untersuchung von Abluftstäuben aus Tierräumen mit offenen Käfigen auf MHV und MNV.....	56
2.	Hygienemonitoring von Mäusekolonien in IVCs	57
2.1.	Einstreusentinel in IVCs.....	58
2.2.	Übertragung von MNV und MHV auf Einstreusentinel in IVCs	59
2.3.	Hygienemonitoring durch PCR Untersuchung von IVC Abluftstaub	61
2.4.	Raumluftüberwachung in Tierräumen mit IVCs durch Untersuchung von IVC Zuluftfiltern und Luftsentinel.....	66
3.	Veränderung der MHV und MNV Seroprävalenz in der Mauskolonie	68
3.1.	MNV Seroprävalenz in der Kolonie	69
3.2.	MHV Seroprävalenz in der Kolonie	70
4.	Entwicklung der MHV und MNV Seroprävalenz bei 12-16 Wochen alten Mäusen eines Tierraumes nach der Umstellung von offener auf IVC Haltung	70
4.1.	Seroprävalenz für MHV in Raum 6114.....	70
4.2.	Seroprävalenz für MNV in Raum 6114.....	72
5.	Validierung des Nachweises von MNV im IVC Abluftstaub versus Einstreusentinel im Infektionsexperiment.....	73
5.1.	Versuchsaufbau und Ablauf.....	73
5.2.	Ergebnisse.....	76
6.	Sequenzierung und phylogenetische Einordnung eines MNV Virusisolates aus der Tierhaltung.....	79

VI.	DISKUSSION.....	81
1.	Übertragung und Infektionsdynamik von MNV und MHV bei Einstreusentinels nach Umstellung von offener auf IVC Haltung	81
1.1.	MNV	81
1.2.	MHV	82
2.	Einfluss von IVC Haltung auf die MNV/MHV Seroprävalenz in der Mauspopulation.....	84
2.1.	MNV	84
2.2.	MHV	85
3.	Nutzen der Untersuchung von IVC Abluft auf MNV und MHV im Vergleich zur Standardmethode Einstreusentinel und Veränderung der Infektionsprävalenz in der Mauskolonie durch die Haltungsumstellung	87
3.1.	Staubsammelmethoden	87
3.2.	MNV in der Feldstudie und MNV Infektionsexperiment.....	87
3.3.	MHV in der Feldstudie	90
4.	MNV/MHV Hygienemonitoring durch Raumlufüberwachung: Luftsentinels versus Untersuchung von IVC Zuluft Filtern	93
4.1.	PCR Untersuchung von IVC Zuluftfiltern auf MNV	94
4.2.	PCR Untersuchung von IVC Zuluftfiltern auf MHV	95
4.3.	Raumlufsentinels	96
5.	Empfehlung zur Durchführung der MNV Überwachung in Mauskolonien mit IVC Haltung	97
5.1.	Untersuchung von Einstreusentinels mittels Serologie und Kot PCR	97
5.2.	Untersuchung von IVC Zu- und Abluftvorfiltern mittels PCR	98
6.	Empfehlung zur Durchführung der MHV Überwachung in Mauskolonien mit IVC Haltung	98
6.1.	Untersuchung von Einstreusentinels mittels Serologie und Kot PCR	98
6.2.	Untersuchung von IVC Zu- und Abluftvorfiltern mittels PCR	99
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
VIII.	ANHANG.....	104

1.	Abkürzungsverzeichnis	104
2.	Zusammenfassung MNV und MHV Infektionsdynamik bei Einstreusentinels	105
3.	Zusammenfassung der MNV und MHV Feldstudie	107
4.	Sequenz MNV Neuherberg U1.....	109
5.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	111
6.	Gesundheitszeugnisse für das Kleintierhaus (KTH) und die SPF Stammzucht (Container)	114
IX.	ZUSAMMENFASSUNG	116
X.	SUMMARY	118
XI.	DANKSAGUNG.....	120

II. EINLEITUNG

Mäuse sind die mit Abstand wichtigsten Versuchstiere in der biomedizinischen Forschung. 2009 stellen die alleine in Deutschland ca. 1,9 Millionen eingesetzten Mäuse mit 67% die größte Gruppe der zu Versuchszwecken eingesetzten Wirbeltiere dar [1]. Es ist bekannt, dass Infektionen Versuchsergebnisse beeinflussen können. Das trifft vor allem auf genetisch modifizierte, immuninkompetente Mausmutanten zu [2].

Murine Noroviren (MNV) und murine Hepatitis Viren (MHV) stehen weltweit auf den ersten beiden Rängen der am häufigsten nachgewiesenen Infektionserreger bei Versuchsmäusen. So waren in der Studie eines Untersuchungslabors zwischen 2007 und 2008 31,8% der untersuchten Mausseren aus 100 verschiedenen Versuchstierhaltungen in Westeuropa positiv für MNV, gefolgt von MHV mit 5,5% [3]. In der Studie eines großen nordamerikanischen Diagnostiklabors aus dem Jahr 2009 wurden Antikörper gegen murine Noroviren in 32,4% der dort untersuchten Serumproben gefolgt von murinen Parvoviren (1,9%) und murinen Hepatitis Viren (1,6%) gefunden [4].

Um der guten wissenschaftlichen Praxis und den Anforderungen des Tierschutzes nach gesunden, hygienisch definierten Tieren gerecht zu werden, gewinnt die Haltung von spezifiziert pathogen freien (SPF) Mäusen zunehmend an Bedeutung. Diese Mäuse werden häufig in individuell belüfteten Käfigsystemen (IVCs) gehalten.

In diesem Haltungssystem ist jeder Käfig mit einem abgedichteten Deckel verschlossen. Die Raumluft wird von einer Lüftungsanlage angesaugt und nach HEPA (*high efficiency particle absorbance*) Filterung durch das im Regal integrierte Luftsystem in die Käfige geleitet. Nach der Käfigpassage wird die gemeinsame Abluft aller Käfige eines Regals nach erneuter HEPA Filterung in die Raumentlüftung abgegeben. Jeder Käfig bildet eine hygienische Einheit, es gibt keinen Austausch von Luft zwischen Käfigen und auch nicht zwischen Käfigen und Raumluft (Biocontainment) [5].

Damit ermöglichen IVCs Quarantäne auf Käfigebene, sowie den Schutz von Personal und Tieren vor Allergenen und Pathogenen, sofern Käfigmaterial autoklaviert wird und sämtliche Manipulationen am offenen Käfig in Umsetzstationen, die wie Sicherheitswerkbänke ausgeführt sind, durchgeführt

werden [6, 7]. Gleichzeitig wird aber durch fehlende Luftübertragung von Pathogenen auf Wächtertiere (Sentinels) die Überwachung des SPF-Status erschwert. Einstreusentinels stellen momentan den „*state of the art*“ dar. Unklare Übertragungswahrscheinlichkeiten vor allem von ausschließlich aerogen übertragenen Erregern auf Sentinels lassen den Nutzen dieser Methode in IVCs fraglich erscheinen. Die Diagnostik viraler Infektionen erfolgt über serologische Untersuchung. Hier gibt es einen Zeitverzug, da Antikörper je nach Erreger erst einige Tage bis Wochen nach der Infektion nachweisbar sind (diagnostisches Fenster).

Die Untersuchung des gemeinsamen Abluftstaubes von IVCs auf Pathogene mittels PCR ist ein neuer Ansatz um diesen Nachteilen in der Hygieneüberwachung von Versuchsmäusen in IVC Haltung zu begegnen, da hier ein direkter Erregernachweis aus der Mauskolonie ohne Umweg über Sentinels möglich ist.

Fragestellung

In der Versuchstierhaltung des Helmholtz Zentrum München (HMGU) werden, neben Zebrafischen, Hamstern, Ratten und Kaninchen, derzeit ungefähr 52000 Mäuse gehalten, die von circa 400 Wissenschaftlern aus verschiedenen Instituten genutzt werden. Die Maushaltung gliedert sich in neun Barrieren und einen Quarantäne-Bereich in dem importierte Mauslinien gehalten werden, bis sie per Embryotransfer über den SPF-Stammzuchtbereich in die Barrieren eingebracht werden. Der Hygienestatus wird mit Einstreusentinels überwacht, die vierteljährlich (im SPF Stammzuchtbereich alle sechs Wochen) untersucht werden. Im Jahr werden ca. 1000 Sentineluntersuchungen durch ein externes akkreditiertes Diagnostiklabor durchgeführt.

Das „Kleintierhaus“ ist eine bislang noch nicht hygienisch sanierte Barriere in der HMGU Maushaltung mit hoher MHV und MNV Prävalenz. Es steht fünf verschiedenen Nutzergruppen zur Zucht und zu Versuchszwecken zur Verfügung. Zwischen Juni und November 2010 wurde das Haltungssystem ohne Zuchtunterbrechung und Rederivierung der Mauspopulation von offener Haltung auf IVCs umgestellt. Die hygienische Sanierung erfolgt hier, im Gegensatz zu den übrigen Barrieren raumweise. Das bis dahin verwendete Hygienemonitoringkonzept mit Einstreusentinels wurde unverändert

übernommen.

Aus dieser veränderten Situation ergaben sich neue Fragen bezüglich des Hygienemonitorings und der Entwicklung der Infektionsprävalenz in der Mauskolonie.

Ziele dieser Arbeit sind:

1. Die Effektivität von Einstreusentinelns zur MHV/ MNV Hygieneüberwachung in IVCs zu überprüfen und die Untersuchung des gemeinsamen Abluftstaubes von IVCs als neue Methode zu entwickeln und zu validieren und mit der bisherigen Methode bezüglich Sensitivität und Nachweisgeschwindigkeit zu vergleichen.

Dazu wurden verschiedene Möglichkeiten zur Staubsammlung aus dem IVC Abluftsystem getestet, um einen quantitativen Nachweis viraler RNA (MHV und MNV) mittels real-time PCR durchzuführen. Im ersten Schritt wurden in einem Feldexperiment IVC Abluftvorfilter aus allen Räumen der Barriere über mindestens 6 Monate auf MHV und MNV mittels PCR untersucht und mit den laufenden Ergebnissen des Einstreusentinel Hygienemonitoringprogrammes verglichen. Zu mehreren Zeitpunkten in der Beobachtungsperiode wurde die Seroprävalenz in der Kolonie ermittelt.

In einer weiteren Studie wurde die Einschleppung einer MNV Infektion in ein MNV-freies IVC Regal simuliert, indem eine bekannte Anzahl MNV infizierter Mäuse in ein IVC Regal mit ansonsten negativen Mäusen eingesetzt wurden. Die Mauspopulation im Regal wurde über Einstreusentinelns und IVC Abluftstaub PCR überwacht. Damit wurde die Sensitivität der Methodik „IVC Abluftstaub PCR Untersuchung“ im Vergleich zu Einstreusentinelns am Beispiel MNV getestet und ermittelt, wie schnell und mit welcher Sensitivität der Pathogennachweis gelingt.

2. Den Einfluss der Haltungssysteme offene Haltung und IVC auf die Übertragungswahrscheinlichkeit von MHV und MNV über gebrauchte Einstreu auf Sentinels zu ermitteln.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Einstreusentinelns zunächst in offener Haltung und dann nach der Umstellung auf IVC Haltung über die zwölfwöchige Monitoringperiode wöchentlich auf Virusausscheidung im Kot und Serokonversion untersucht.

3. Den Nutzen der Raumluftüberwachung zur MHV/MNV Hygieneüberwachung in Tierräumen zu ermitteln, in denen mit gebrauchtem Käfigmaterial außerhalb der Umsetzstationen umgegangen wird und potenziell Viruspartikel in die Raumluft gelangen können.

Hier wurden an zwei Zeitpunkten alle IVC Zuluftvorfilter aus der Barriere, welche im Routinebetrieb nach unterschiedlich langen Expositionszeiten ausgetauscht wurden, auf MHV/MNV RNA getestet.

Des Weiteren wurden in einigen Räumen Luftsentinels über 16 Wochen in offenen Käfigen vor der Raumentlüftungsöffnung positioniert und regelmäßig auf Virusausscheidung im Kot und MHV/MNV Serokonversion untersucht.

4. Die Frage zu beantworten, ob das Haltungssystem IVC die Prävalenz von MHV und MNV in der Mauspopulation beeinflusst.

Dazu wurden zwei Monate nach der Umstellung auf IVC Haltung, alle Mäuse eines Tierraumes im Alter von 12-16 Wochen serologisch auf MHV untersucht. Dieser Test wurde über mehrere Monate wiederholt. Sechs Monate nach der Umstellung wurden sie zusätzlich auf MNV Serokonversion getestet.

5. Zu beobachten, ob ein einzelner per Embryotransfer hygienisch sanierter Mausraum mit IVCs in einer ansonsten MHV und MNV positiven Barriere über einen längeren Zeitraum frei von MHV und MNV bleibt.

Dieser Tierraum wurde analog zu 1.) mituntersucht.

III. LITERATUR

1. Maushaltung in IVCs

Individuell belüftete Käfigsysteme (IVCs) werden zunehmend mehr in Versuchstierhaltungen eingesetzt. Der Anteil von IVCs gegenüber konventioneller Käfigausstattung beträgt in den USA und Europa 60%. In Asien und Südamerika liegt der Anteil bei 40%. (Quelle: Gespräch mit Frau Gabriele Dorner, Tecniplast Deutschland im September 2011). Durch Luftwechselraten von 25-100 Luftwechseln pro Stunde bleiben CO₂ und Ammoniakkonzentration, sowie Luftfeuchtigkeit auf Käfigebene niedrig. Käfigwechselintervalle können gegenüber konventioneller Haltung verlängert werden. Nach 14 bis 17 Tagen liegen die Ammoniakwerte im IVC noch unterhalb des Grenzwertes, wenn genügend saugfähiges Einstreumaterial verwendet wird [8, 9]. Zudem wird das Personal effizient vor Allergenen und Pathogenen geschützt [6]. Nachteilig ist die erhöhte ergonomische Belastung im Umgang mit IVCs [10]. IVCs sind keine hermetisch abgeschlossenen Isolatoren. Der größte Teil der durchströmenden Luft wird durch die Belüftungseinheit gefiltert und in das System gepumpt. Abhängig vom eingestellten Druckmodus strömt ein geringer Teil an Luft aus dem System heraus (positiver Druck) und schützt die Mäuse so vor Pathogenen in der Umgebung. Bei negativem Druck ist der Luftdruck im System niedriger als in der Umgebung. Jetzt strömt Raumluft in das IVC System. Die Umgebung ist hierbei vor von den Mäusen ausgehenden Gefahren (Pathogene, Allergene) geschützt. Die Einstellung des Druckmodus hängt von den dort gehaltenen Mäusen und der Art des Experiments (z.B. Infektionsexperiment) ab.

2. Hygieneüberwachung von Mäusen

Eine Vielzahl von Berichten beschreibt den Einfluss von Infektionen mit Mikroorganismen und Parasiten auf das Ergebnis von Forschungsprojekten [2, 11].

Es sollte jedem Experimentator bewusst sein, dass die Infektion des Versuchstiers, auch wenn sie keine klinischen Symptome verursacht, eine unsichere Variable im Tierversuch ist. Diese führt zu unsicheren Ergebnissen und damit höherem

Tierverbrauch. Für die bessere Nachvollziehbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen sollte deshalb der hygienische Status der verwendeten Tiere in wissenschaftlichen Publikationen stets angegeben werden.

Aus diesem Grund ist es essentiell, dass der hygienische Status von Versuchstieren systematisch und kontinuierlich überwacht wird. Es gibt kein allgemeingültiges optimales Schema für die Durchführung eines guten Hygienemonitoring Programmes, vielmehr muss das Programm auf die jeweilige Versuchstierhaltung zugeschnitten sein.

Eine Empfehlung zur Durchführung von Hygienemonitoring Programmen in Nagerkolonien, nach der sich die Mehrzahl der europäischen Versuchstierhaltungen richtet, gibt die Arbeitsgruppe für Hygiene der europäischen Gesellschaft für Versuchstierkunde (FELASA) heraus. Die aktuelle Version der Empfehlung stammt aus dem Jahr 2002 [12]. Zunächst sollte danach die mikrobiologische Einheit definiert werden, welche sinnvollerweise gemeinsam untersucht wird. Eine hygienische Einheit definiert sich üblicherweise als „in sich abgeschlossene, mikrobiologische Gesamtheit“ [12]. Das kann je nach baulichen Gegebenheiten, Haltungsform, Personal- und Tierverkehr und evtl. vorhandenen Barrieremaßnahmen eine komplette Tierhaltungseinrichtung, eine Gruppe von Räumen, ein einzelner Raum oder aber auch nur ein einzelner IVC Käfig sein. Hier wird erkennbar, dass die Definition der hygienischen Einheit auf IVC Haltungen schwer anzuwenden ist. Kolonien sollten mindestens vierteljährlich untersucht werden. Die Testfrequenz sollte aber bei besonders wertvollen Kolonien, z.B Stammzuchten erhöht werden.

Optimalerweise werden stichprobenartig Tiere aus der Kolonie untersucht. Hier eignen sich besonders alte Zuchttiere, welche durch ihre lange Verweildauer im Bestand und ihre abnehmende Immunkompetenz das größte Erregerspektrum aufweisen [13].

Eine Übersicht über die notwendige Stichprobengröße zur Detektion von mindestens einem infizierten Tier in Abhängigkeit von der Pathogenprävalenzrate in Kolonien über 100 Individuen gibt Abbildung 1. Vorausgesetzt wird, dass sich das Pathogen ungehindert ausbreiten kann. Wenn 10 Tiere pro mikrobiologischer Einheit die insgesamt mehr als 100 Tiere umfasst untersucht werden, wird eine Infektion mit einer Prävalenzrate von 30% mit 95%iger Sicherheit detektiert. Theoretisch kann bei vier Untersuchungen pro Jahr eine Infektion mit einer

Prävalenz von 10% mit 99%iger Sicherheit festgestellt werden [13, 14].

Da in vielen Fällen keine ausreichende Anzahl an Kolonietieren zur Verfügung steht oder die Tiere nicht geeignet sind (z.B. immundefiziente Mäuse) verwendet man Wächtertiere (Sentinels). Diese müssen in der Regel immunkompetent, aber unbedingt initial frei von und empfänglich für das zu überwachende Pathogen sein. Häufig werden junge etwa sechs bis acht Wochen alte Auszuchtmäuse (z.B.: CRL:CD1(ICR) Mäuse) verwendet, da diese preiswert, robust und für ein breites Keimspektrum empfänglich sind, allerdings häufig keine Symptome einer klinischen Erkrankung zeigen. Inzuchtstämme sind unterschiedlich empfänglich für Infektionen. Beispielsweise sind C57BL/6 Mäuse nicht zur Detektion von murinen Parvoviren geeignet [15]. Bei bestimmten Fragestellungen, z.B. dem Nachweis bestimmter Opportunisten wie *Pneumocystis spp.* [13] ist auch der Einsatz immundefizienter Sentinels möglich. Jedoch ist zu beachten, dass serologische Untersuchungen hier keine Aussagekraft besitzen und diese Tiere häufig einen Dauerausscheiderstatus entwickeln, welcher als „Verstärker“ wirkt und den Hygienestatus der zu überwachenden Population gefährden kann.

Der Sentinel wird möglichst intensiv der in der überwachten Population vorhandenen Keimflora ausgesetzt. Dazu gehört, die Haltung im offenen Käfig und Gabe gebrauchter Einstreu von Kolonietieren über einen Zeitraum von mindestens 6 Wochen, evtl. Kontakt zu Kolonietieren (Kontaktsentinels) und/oder gebrauchtem Futter, Wasser. Hier ist zu beachten, dass einige Erreger schlecht bis gar nicht über gebrauchte Einstreu übertragen werden. Beispiel sind die Ektoparasiten *Myobia musculi* und *Myocoptes musculinus* auf CRL:CD1(ICR) Mäuse [16] und *Pasteurella pneumotropica* auf NMRI Mäuse [17]

Zusätzlich sollte die mikrobiologische und parasitologische Untersuchung kranker und gestorbener Tiere Teil des Routinehygienemonitorings sein.

Diseases with an infection rate of 50% or more (Sendai, MHV) require far fewer animals to detect their presence than diseases with low infection rates.

Assumptions

1. Both sexes are infected at the same rate
2. Population size > 100 animals
3. Random sampling
4. Random distribution of infection

The sample size is calculated from the following formula:

$$\frac{\log 0.05}{\log N} = \text{Sample size}$$

N = percentage of non-infected animals

0.05 = 95% confidence level

Relation of sample size to prevalence rate

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

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

Abbildung 1: Kalkulation der erforderlichen Stichprobengröße bei offener Haltung aus Kolonien > 100 Individuen zur Detektion von Pathogenen abhängig von der Prävalenzrate für unterschiedliche Konfidenzlevel (aus [12] Tabelle 1)

Welche Pathogene genau überwacht werden sollten, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Empfehlung der FELASA ([12], Anhang 2) gibt eine Übersicht über Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten, die die Gesundheit der Tiere und Versuchsergebnisse beeinträchtigen können. Diese Liste ist nicht als statisch und abschließend zu betrachten. Es kommen neue Erreger hinzu und einige verlieren an Bedeutung. Das Murine Norovirus beispielweise ist darin noch nicht enthalten, weil es bei der Herausgabe der Empfehlung noch nicht bekannt war. Es wurde in einer weiteren Publikation der GV-SOLAS im Jahr 2007 in die Liste der relevanten Erreger aufgenommen [18]. Welche Pathogene unbedingt von der jeweiligen Versuchstierkolonie ausgeschlossen werden müssen, ist in einem engen Dialog des für das Hygienemonitoring zuständigen Experten mit dem das Versuchstier nutzenden Wissenschaftler abzuklären, da es nicht immer möglich ist, alle Erreger zu eliminieren. Eventuell ist es auch notwendig, die Diagnostik für besonders relevante Erreger zu intensivieren [12].

Das Ergebnis des Hygienemonitorings ist ein Gesundheitszeugnis, welches den hygienischen Status der Tierpopulation wieder gibt. Dieses sollte in sämtlichen

wissenschaftlichen Publikationen als Bestandteil der Tierspezifikation angegeben werden.

Das Gesundheitszeugnis nach FELASA Empfehlung [12] sollte folgende Angaben enthalten:

1. Beschreibung der untersuchten hygienischen Einheit mit Angaben zum Haltungssystem und zur in der Einheit gehaltenen Spezies
2. Datum und Gültigkeitszeitraum des Zeugnisses
3. Übersicht über untersuchte Pathogene (möglichst alle Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten aus der FELASA Liste), Testmethoden und Anzahl der untersuchten Tiere
4. Historische Untersuchungsergebnisse. Erst wenn ein Pathogen über 18 Monate (mind. sechs vierteljährliche Untersuchungen) nicht nachgewiesen wurde gilt es als eliminiert
5. Ergebnisse der mikrobiologischen und pathologischen Untersuchung auffälliger und verendeter Tiere aus der Kolonie

Hygieneüberwachung in IVC Haltung

In IVC Haltung ist jeder Käfig bei adäquatem Umgang mit dem System [19] eine hygienische Einheit für sich. Das bedeutet, dass theoretisch jeder Käfig wegen fehlender Übertragung zwischen den Käfigen, einzeln untersucht werden müsste, was praktisch nicht realisierbar ist. Stichprobenartige Untersuchung von Einzeltieren beinhaltet ein hohes Fehlerrisiko. Ein gut funktionierendes Sentinelprogramm, in dem Sentinels gezielt gebrauchter Einstreu, Futter und Wasser von möglichst vielen Individuen der zu überwachenden Kolonie ausgesetzt werden ist hier unerlässlich. „Die Sentineltiere bekommen über 10-12 Wochen Einstreuproben [...] und die letzte Hygieneuntersuchung der Sentinels erfolgt erst 4-6 Wochen nach der letzten Einstreugabe. Sinnvoll ist dabei ein System, bei dem eine größere Gruppe von Sentineltieren max. 6 Monate gehalten wird und eine gestaffelte Entnahme aus dieser Sentinelgruppe erfolgt“ [13]. Weitere Möglichkeiten sind der Einsatz von Kontaktsentinels und die PCR-Untersuchung von Abluftfiltern und Käfigoberflächen [12]. Abluftsentinels bei denen die Abluft eines IVC Systems durch den Käfig geleitet wird, eignen sich in

Verbindung mit Gabe von gebrauchter Einstreu zur Detektion von MHV, MPV, intestinalen Flagellaten und Syphacien [5].

3. Murine Noroviren

Murine Noroviren aus der Familie der *Caliciviridae*, sind unbehüllte Einzel(+)-Strang RNA Viren (Größe 27-35nm). Das Genom ist ca. 7,5kb groß und in 4 sich teilweise überlappende ORFs (ORF 1-4) unterteilt. ORF 1 kodiert für ein Polyprotein, welches in sechs Nicht-Strukturproteine unterteilt ist. ORF2 für das Hauptcapsidprotein (VP1), welches aus den zwei Hauptdomänen der hochkonservierten Shell-Domäne („*shell*“ für Hülle) und der gering konservierten Protruding-Domäne („*Protruding*“ für hervorstehend) besteht. ORF 3 kodiert für das in der Stabilisierung des Viruscapsids bedeutende kleine Basisprotein. ORF 4 liegt mit einem verschobenen Leseraster innerhalb von ORF 2. Über seine Funktion ist noch wenig bekannt [20].

3.1. Klassifikation und Übertragungswege

Die Gruppe der Noroviren lässt sich aufgrund einer phylogenetischen Analyse des Hauptcapsidproteins in fünf Genogruppen einteilen (G1-G5). Murine Noroviren sind der G5 zuzuordnen [21]. Infizierter Kot stellt in Maushaltungen die Hauptinfektionsquelle dar.

3.2. Bedeutung von MNV in Maushaltungen und Auswirkungen auf Forschungsergebnisse

Eine Infektion mit murinen Noroviren führt bei immunkompetenten Mäusen zu keiner klinischen Erkrankung. MNV-1 wurde erstmals im Jahr 2003 bei immunsupprimierten *Rag2^{-/-}Stat1^{-/-}* Mäusen isoliert und beschrieben. Dieser Knock-out Mausstamm zeichnet sich durch einen SCID Phänotyp aus (*severe combined immuno deficient*), welcher das völlige Fehlen, des adaptiven und angeborenen Immunantwort beinhaltet (keine Reifung von B- und T-Lymphozyten, sowie keine Immunantwort auf Interferon γ durch fehlende STAT1 Stimulation). Das Virus wurde intracerebral passagiert und führte sporadisch zu einem letalen Infektionsverlauf mit Enzephalitis, Vaskulitis der zerebralen Gefäße, Meningitis, Hepatitis und Pneumonie. Größere Virulenz wurde bei *IFN $\alpha\beta$ R^{-/-}* Mäusen beobachtet, denen der Interferon α β und der Interferon γ Rezeptor fehlt [22].

Eine orale Infektion des immunkompetenten Inzuchtmausstammes 129S6/SvEvTac führte zu inflammatorischen histopathologischen Veränderungen in Darm und Milz und viraler Dissemination in Milz, Leber, Lunge und Lymphknoten [23].

Eine Infektion mit MNV-4 bei FVB.129P2-*Abcb1at*^{m1Bor}N7(Mdr1a^(-/-) Mäusen, einem genetisch modifizierten Mausstamm, welcher *inflammatory bowel disease* (IBD) entwickelt, deren Symptomatik durch gezielte Infektion mit *Helicobacter bilis* verstärkt wird, führte zu höheren Gewichtsverlusten und schwerer Kolitis. Monoinfektion mit MNV-4 führte zu verstärkter Interferon γ Bildung in durch dendritische Zellen induzierten T-Lymphozyten, am Tag zwei nach der Infektion [24].

MNV4 Infektion verursachte bei einem häufig verwendeten C57BL/6 Mausmodell, das durch stark fettreiche Fütterung Obesitas und Insulin Resistenz entwickelt, eine reaktiver Hyperplasie der Mesenteriallymphknoten [25].

Infektionen mit MNV verändern Forschungsergebnisse vor allem bei immunsupprimierten Mäusen. Bislang gibt es nur wenige Studien über den Einfluss auf verschiedene Mausmodelle.

3.3. MNV Eliminationsstrategien

„*cross-fostering*“ eignet sich zur Elimination von MNV, wenn die Übertragung der Jungen auf die Amme innerhalb der ersten 24 Lebensstunden erfolgt und die Einstreu der Mutter um den Geburtszeitpunkt herum gewechselt wird [26].

In Kot und Mesenteriallymphknoten PCR positive Spendermäuse wurden für Embryotransfer und *in vitro Fertilisation* genutzt. Die Reproduktionsorgane (Ovarien und Nebenhoden) waren durchweg negativ, sodass der Embryotransfer als sichere MNV Eliminierungsmethode einzuschätzen ist [27].

3.4. Umweltstabilität

MNV war mindestens 2 Wochen in Kotproben die bei Raumtemperatur gelagert wurden mit PCR nachweisbar [28].

3.5. MNV Hygienemonitoring in IVCs

MNV-4 wird auf Einstreusentinelns bei Haltung in Filtertopkäftigen übertragen. Nach 12 Wochen waren 4 von 5 untersuchten Sentinelpaaren (Hsd:ICR(CD1)) seropositiv und schieden Virus im Kot aus. Die Einstreudosis hatte keinen

Einfluss auf den Übertragungserfolg. Virusausscheidung im Kot persistierte für mindestens 6 Monate. 4-8 Wochen alte Tiere waren empfänglicher als 12 Wochen alte Tiere. Wurden bei Sammelkotproben aus infizierten Mausekäfigen ein infiziertes Kotpellet mit neun nicht infizierten gepoolt, wurde die Infektion mit der RT-PCR nicht detektiert [28].

Tac:SW Sentinels zeigten milde, auf eine MNV Feldinfektion zurückzuführende, histologisch entzündliche Veränderungen in der Leber [29].

Nach 4 Tagen war MNV im Kot von ICR und C.B-17-*Prkdc^{scid}* Kontaktsentinelns nachzuweisen. Untersuchung von Kotproben eignet sich gut um MNV Infektionen zu detektieren [30].

MNV wird zuverlässig über in gebrauchter Einstreu enthaltenem Kot auf Sentinels übertragen. Die Ausscheidungsphase im Kot persistiert über mehrere Wochen. Serokonversion führt nicht zur Elimination der Virusausscheidung.

3.6. MNV Nachweis im Abluftstaub

Über den Nachweis von MNV im Abluftstaub ist bislang keine Literatur vorhanden.

4. Murine Hepatitis Viren

Das murine Hepatitis Virus (MHV) aus der Familie der *Coronaviridae*, ist ein behülltes Einzel(+)-Strang RNA Virus (Größe 80-169nm) mit unsegmentiertem Genom und 4-5 Strukturproteinen. Das Genom ist 27-31kb groß und ist damit das größte aller positiv-strängigen RNA Viren. Die Virus RNA hat wie eine messenger RNA eine Cap-Struktur am 5' Terminus und ist am 3' Terminus polyadenyliert. Sie ist auch ohne Virusproteine infektiös. ORF 1a und ORF 1b kodieren für die viruseigene RNA abhängige RNA Polymerase und nehmen fast zwei Drittel des gesamten Genoms ein [31]. ORF 1b weist bei allen Coronaviren den höchsten Konservierungsgrad auf. Für eine möglichst große diagnostische Breite zur Detektion von Coronaviren sollten PCR-Produkte in diesem Bereich lokalisiert sein [32].

Das N-Protein bildet zusammen mit der RNA das helikale Nukleocapsid. Es wird von der Virushülle umgeben die aus drei oder vier Glyko-proteinen besteht. Das M-Glykoprotein verbindet Nukleocapsid und Hülle miteinander und weist bei allen MHV Stämmen die größte Antigen- Konservierung auf.

Das S-Glykoprotein erfüllt wichtige Aufgaben bei der Interaktion des Virus mit der Umwelt, wie den Zelltropismus und Adhäsion durch Interaktion mit zelltypischen Oberflächenrezeptoren. Außerdem bildet es die typische keulenförmige Oberflächenstruktur die der Gruppe der Coronaviren ihren Namen gegeben hat (lat. *corona* = Krone).

Das E-Protein scheint einen katalytischen Effekt beim „*Uncoating*“ also dem intrazellulären Abbau der virusumhüllenden Proteine nach der Penetration der Wirtszelle zu haben.

MHV-DVIM ist der einzige bekannte MHV Stamm, bei dem das bei vielen Coronaviren vorhandene Haemagglutinin/Esterase-Glykoprotein aktiv ist [33].

4.1. MHV Klassifikation und Übertragungswege

Die Einteilung der MHV Stämme erfolgt nach deren Gewebstropismus in enterotrope und respiratorische (polytrope) Stämme. Werden empfängliche immunkompetente Mäuse intranasal mit enterotropen und respiratorischen MHV Stämmen infiziert, findet man Virusantigene der respiratorischen Stämme (MHV1, 3, A59, JHM, S, Tettngang, wt-1) in Lunge und Nase sowie weit disseminiert in Organen entlang des Blutstroms. Antigene enterotroper Stämme (MHV-Y, wt-2) sind vorrangig in der Darmmukosa, weniger in weiteren abdominalen Organen und nicht im Respirationstrakt nachzuweisen [34]. Wegen des weniger ausgeprägten Organtropismus respiratorischer Stämme werden diese heute als polytrope Stämme bezeichnet.

Heute sind vor allem enterotrope Stämme, die über infizierten Kot übertragen werden, in Maushaltungen relevant. Die verschiedenen Biotypen lassen sich nicht durch Antigen- oder genetische Merkmale unterscheiden [35].

4.2. Bedeutung von MHV in Maushaltungen und Auswirkungen auf Forschungsergebnisse

Infektionen mit MHV verlaufen weitgehend subklinisch. Das vormals häufig beobachtete „*wasting syndrom*“, charakterisiert durch Durchfall und hohe Verluste bei Jungtieren, tritt bei immunkompetenten Mausstämmen heute kaum noch auf. Mäuse, die mit klinische Symptome verursachenden MHV Stämmen infiziert waren, wurden in der Vergangenheit leicht erkannt und aus dem Mausbestand eliminiert. Das führte über die Zeit zu einer Selektion von Virusvarianten mit subklinischem Infektionsverlauf, die heute in den

Tierhaltungen vorwiegend präsent sind (Quelle: Gespräch mit Werner Nicklas, Buggiate Italien, November 2010).

Bei immunsupprimierten Mausstämmen, zum Beispiel Hsd:Athymic nude-*nu* führen MHV Infektionen nach wie vor zu klinischen Erkrankungen und hohen Tierverlusten [36].

Eine Vielzahl von Publikationen belegt den Einfluss von MHV Infektionen auf Forschungsergebnisse [2]. Beispielweise führt eine Infektion von SCID Mäusen mit MHV-S zu hoher Mortalität, erhöhten Serumenzym- und Bilirubinwerten, sowie histologischen Veränderungen in der Leber [37]. Eine Infektion von BALB/c Mäusen mit MHV A59 führt zu verminderter Proliferation lymphoider Zellen in der Milz nach T-Zellstimulation [38]. Zudem führen MHV Infektionen zu erhöhter Resistenz gegenüber *Salmonella typhimurium* Infektionen bei BALB/cAnNCr Mäusen [39] und erhöhter Inzidenz von Typ I Diabetes bei NOD (*non-obese-diabetes*) Mäusen [40].

Außerdem spielen Koinfektionen eine wichtige Rolle bei der Übertragung und dem Krankheitsverlauf. So führt eine Koinfektion von MHV G und *Helicobacter hepaticus* bei IFN- γ KO Mäusen zu einer Verminderung des „wasting syndroms“ mit Peritonitis und Pleuritis, die bei einer Monoinfektion mit MHV auftreten würde [41, 42].

4.3. MHV Eliminationsstrategien

Wird eine MHV Infektion in einen immunkompetenten Mausbestand mit offener Käfighaltung eingeschleppt, infizieren sich bis zu 100% der Tiere innerhalb weniger Wochen und serokonvertieren. Kommen keine neuen empfänglichen Mäuse durch Zucht oder Import hinzu, „brennt“ die Infektion aus. Auch bei immunsupprimierten Mäusen kann Zuchtunterbrechung zur Elimination von MHV führen. So brachte eine Zuchtunterbrechung über 15 Wochen in einer geschlossenen C.B.-17^{scid/+} Mauspopulation in Isolatorhaltung seronegative Nachkommen in der F2 Generation nach Ende der maternalen Immunität [43].

Beim „*cross fostering*“ werden neugeborene Mäuse einer infizierten Mutter von einer nicht infizierten Amme aufgezogen. Die Nachkommen bleiben MHV frei, wenn das „*cross fostering*“ innerhalb der ersten 24h nach der Geburt erfolgt [26, 44].

In utero Übertragung von MHV während aller drei Trächtigkeitstrimester konnte experimentell gezeigt werden, kommt aber unter natürlichen Bedingungen bei

immunkompetenten Mäusen äußerst selten vor [45]. Embryonen sind bei intakter *Zona pellucida* vor MHV Infektionen geschützt [46]. Eizellen infizierter Spendertiere bergen ein Übertragungsrisiko; Spermien infizierter Männchen, welche bei der *in vitro Fertilization* eingesetzt werden allerdings nicht [47].

Biologisches Material, wie embryonale Stammzellen, die zur Erstellung genetisch modifizierter Mauslinien häufig verwendet werden, können ebenfalls MHV replizieren und stellen eine bedeutende Einschleppungsquelle dar [48].

4.4. Umweltstabilität

MHV ist relativ umweltlabil. Wahrscheinlich sind die Viruspartikel wie das Ratten Coronavirus mindestens 7 Tage auf Plastikoberflächen stabil [49]. Auf Abluftfiltern ist es ebenfalls 7 Tage und in IVC-Käfigdeckelfiltern aus Käfigen MHV ausscheidender Mäuse 4 Wochen lang mit PCR nachweisbar [50].

4.5. Länge der Ausscheidungsphase und Übertragung von MHV auf Einstreusentinels in IVCs

Die Länge der Ausscheidungsphase variiert abhängig von Mausstamm und Immunstatus. Beispielsweise scheiden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 über 2 Wochen, BALB/c Mäuse 4 Wochen lang, und immunsupprimierte bzw. transgene Tiere zum Teil für mehrere Monate bis zu 2 Jahren Virus im Kot aus [51-54]. Bei immunkompetenten Tieren endet die Ausscheidung mit der Serokonversion. Die MHV Infektion persistiert nicht in adulten Mäusen [55]. Die Übertragung des enterotropen MHV-Y über Einstreu auf Swiss Webster Sentinelmäuse (Tac:SW) in Filtertop Käfigen gelang nur in der akuten Ausscheidungsphase von Tag 2 bis 5 nach Infektion, was mit der geringen Umweltstabilität von MHV zu erklären ist [56]. Werden die Sentinels in IVCs gehalten, gelingt die Übertragung zuverlässig bis Woche 2. In diesem Experiment wurden je 2 Sentinels an Tag 3, Woche 1 und Woche 2 nach künstlicher Infektion der Einstreuspender entweder 25, 50, oder 100ml gebrauchter Einstreu ausgesetzt und auf MHV Serokonversion untersucht [15]. Die schlechtere Übertragung in Filtertopkäfigen ist vielleicht mit der dort vorherrschenden höheren Ammoniakkonzentration zu erklären, welche zur Virusinaktivierung führt [57].

4.6. MHV Immunität

Immunkompetente Mäuse entwickeln eine robuste Immunität gegen MHV

Reinfektion nach überstandener Infektion. Diese Immunität ist virusstammspezifisch [58]. BALB/cByJ Mausjunge sind nach Aufnahme von Milch seropositiver Ammen innerhalb der ersten zwei Lebenswochen vor dem MHV bedingten „*wasting syndrome*“ geschützt [59]. Diese passive Immunität hält bis zum Alter von 10 Wochen an [60].

4.7. MHV Hygienemonitoring in IVCs mit Luftsentinelns

Neben dem Einsatz von Einstreusentinelns gibt es weitere Ansätze zur Hygieneüberwachung von Mauskolonien in IVCs. Beim „*Bioscreen*TM“ System werden Sentinelns einem Teil der gemeinsamen Abluft der IVCs ausgesetzt. MHV aus einer infizierten Mauspopulation mit unbekannter Prävalenz wird nach 42 Tagen zuverlässig auf Luftsentinelns, Einstreusentinelns und kombinierte Luft/Einstreusentinelns übertragen. Die Methode ist grundsätzlich zur Detektion von MHV geeignet [5].

In einer weiteren Studie wurden unterschiedliche Luftsentinelns, über 2 Wochen (Woche 0-2, 2-4, etc., Kurzzeit- Luftsentinel) oder über den gesamten 12 wöchigen Studienverlauf (Langzeit- Luftsentinel) der Abluft MHV infizierter Mäuse ausgesetzt. Das IVC Regal wurde bei einem Durchgang auf positiven und beim zweiten Durchgang auf negativen Druck eingestellt. Die Kurzzeit-Luftsentinelns in Woche 0-2 und Woche 2-4 serokonvertieren im Positivdruckexperiment, alle anderen nicht. Im Negativdruckexperiment hingegen bleiben alle negativ. Die Langzeit- Luftsentinelns zeigen unter beiden Druckverhältnissen eine Serokonversion ab Woche 4 [50].

4.8. MHV Nachweis im Abluftstaub

In der im vorigen Abschnitt beschriebenen Studie wurden weiterhin ebenfalls die Abluftstäube mittels auf dem IVC Abluftfilter platzierten sterilen Gazestücken, unter positiven und negativen Druckverhältnissen, mit PCR auf MHV untersucht. Sechs Gazestücke wurden zu Beginn des Experiments auf den Abluftfilter platziert und sollten nach 2, 4, 6, 8 und 10 Wochen auf MHV RNA untersucht werden. Ein weiteres Set Gazestücke sollte an den betreffenden Zeitpunkten für 24 Stunden der Abluft ausgesetzt werden. Im zuerst durchgeführten Positivdruckexperiment wurden alle Gazestücke versehentlich in Woche 2 entfernt. Diese wurden in Woche 4 ersetzt und dann in Woche 6, 8, 10, 12 untersucht. Außerdem wurde der Vorfilter nicht gewechselt, sodass eine

Rückkontamination des Gazefilters auf den Vorfilter nicht auszuschließen ist. Im Negativdruckexperiment wurde jede Woche ein neuer, autoklavierter Vorfilter eingesetzt, aber nur bis Woche 6 untersucht, obwohl es immer noch Index Mäuse gab. die Ausscheider waren.

MHV RNA konnte in beiden Experimenten bei Kurz- und Langzeitexposition der Gazestücke auf IVC Abluftfiltern mindestens sechs Wochen nach Einsetzen infizierter Mäuse in das IVC System nachgewiesen werden. Die Methode scheint grundsätzlich zum Nachweis von MHV geeignet zu sein [50].

Oyanagi et al., 2004 gelang die Detektion von MHV mit einer nested PCR in Raumabluftstäuben aus Abluftrohren der Raumentlüftung in einem MHV infizierten Mausbestand in offener Käfighaltung [61].

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Chemikalien

Tabelle 1: TBE Puffer: pH 8,3

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

Tabelle 2: TE-Puffer: pH 7,4

Tris Cl	0,1 M
EDTA	10 mM

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

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland)

6x DNA loading dye (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

GeneRuler™100bp Plus DNA ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

Primer und Sonden: Konz: 100µM, HPLC gereinigt, lyophilisiert (Metabion international, Martinsried, Deutschland)

SP6 RNA Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)

MilliQ Wasseraufbereitung, reverse Osmose (Milli-Q PLUS UF, Millipore, Billerica, MA, USA)

Dekontamination

Pursept A Xpress (Merz Hygiene; Frankfurt/Main, Deutschland)

Mucasept A (Merz Hygiene; Frankfurt/Main, Deutschland)

DNA Exitus (Applichem, Darmstadt, Deutschland)

1.2. Auswertesoftware

Primer express® software Version 2.0.0, (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)

NCBI blast (Primer blast, nucleotide blast, vecscreen)

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

Sci ed central clone manager 5 for windows 95 Version 5.02

1.3. Geräte

T1 Thermocycler 96, (Biometra, Göttingen, Deutschland)

Real-Time PCR Gerät (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)

Photospektrometer (SmartSpec™Plus, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)

1.4. Kits

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAGEN®OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

TOPO® TA cloning kit, Vektor pcrII, Top 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

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

MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

NucleoBond® PC20/100 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

1.5. Einwegmaterial

15 und 50ml konische Röhren BD Falcon (BD Bioscience, Canaan, USA)

Sterile Wattestäbchen, einzeln verpackt (Heinz Herenz, Hamburg, Deutschland)

1,3ml Mikro-Serumgefäß mit Z-Gel (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)

Medipoint animal lancet 5mm (Medipoint, Mineola, USA)

1ml Einwegspritze (Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland)

24Gx1“ Kanüle (Sterican® Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland)

ES Kompressen, steril in Folienbeuteln (Hartmann, Heidenheim, Deutschland)

1.6. Zellkultur und künstliche Infektion

Virusstocks: MHV A59 (VR 764), MNV Neuherberg U1

Zelllinien MHV:NCTC 1469CL (CCL-9.1), L929 (CCL-1)

Zelllinien MNV: RAW264.7 (TIB-71)

DMEM Flüssigmedium ohne Na-Pyruvat, mit stabilisiertem Glutamin

mit 3,7 g/l NaHCO₃, mit 4,5 g/l D-Glukose (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Fetales Kälberserum (verschiedene Chargen und Hersteller)

1.7. Maushaltung

Typ II Makrolon® und Polysulfon Käfige (verschiedene Hersteller)

Fichtenholzfaserestreue (Lignocel 3/4 S, Rettenmeier, Rosenberg, Deutschland)

Mausdiät (Typ 1314, Altromin Spezialfutter, Lage, Deutschland)

IVCs (IVC sealsafe Plus mouse, 2 GM 63 Tecniplast, Varese, Italien)

Wandmontierte IVC Lüftereinheit („Remotouch“, Tecniplast, Varese, Italien)

IVC Vorfilter: Remy Filter

HEPA Filter: Typ H14 Abscheidungsrate 99,999%

Käfigwechselstation („Allergard“ Modell: NU617500E, Nuair, Plymouth, USA)

1.8. Maushaltung im Kleintierhaus

Das Kleintierhaus ist eine Barrierehaltung mit 13 Tierräumen, welche von fünf (im Folgenden mit A-E bezeichneten) verschiedenen Arbeitsgruppen für Zucht, Haltung und Experimente genutzt wird (Abbildung 2). Das im Bereich beschäftigte Personal muss den Bereich über eine Luftdusche mit autoklavierter Bereichskleidung, Haube und Mundschutz sowie Einweghandschuhen betreten. Materialien werden entweder über den Autoklaven, ein Desinfektionsmitteltauchbecken, oder in jedem Raum vorhandene Sprühdesinfektionsmittelschleusen eingebracht.

Die Temperatur liegt zwischen 20 und 24°C, die Luftfeuchte beträgt 50-60% bei 15 Luftwechseln pro Stunde und einem 12/12h Hell-Dunkel Intervall. Die Mäuse erhalten eine spezielle Mausdiät (Altromin Typ 1314) und filtriertes (Porengröße 0,2µm) Leitungswasser aus autoklavierten Trinkflaschen *ad libitum*. Das aktuelle Gesundheitszeugnis (Stand September 2011) befindet sich im Anhang (VIII.6).

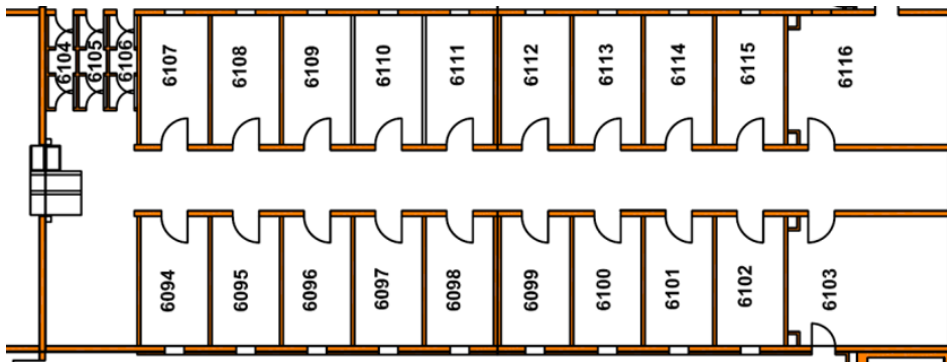


Abbildung 2: Raumplan Kleintierhaus

1.8.1. Maushaltung in offenen Käfigen

Zu Beginn dieser Untersuchung wurden alle Tiere in offenen Typ II Käfigen gehalten (Abbildung 3). Die Käfige wurden wöchentlich gewechselt. Zwischen Juni und November 2010 wurden alle Tierräume auf IVC Haltung umgestellt. Eine Übersicht über die Umrüstungszeitpunkte gibt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der untersuchten Tierräume und Umrüstungszeitpunkte auf IVC Haltung

Raum	IVC Start	Nutzer	Raum	IVC Start	Nutzer
6114	09.06.	E	6095	23.09.	A
6115	14.06.	E	6096	28.09.	A
6113*	14.07.	E	6098	19.10.	B
6112	17.08.	C	6100	21.10.	B
6111	19.08.	C	6101	03.11.	B
6097	19.08.	D	6099	08.11.	B
6094	21.09.	A			

* durch Embryotransfer rederivierte Mäuse



Abbildung 3: Maushaltung in offenen Käfigen

1.8.2. Maushaltung in IVCs

Alle Mäuse im Kleintierhaus wurden nach der Umrüstung in 2 GM 63 IVC Regalen (Tecniplast) gehalten. Ein Regal beherbergte insgesamt 63 Typ GM 500 Käfige mit jeweils 501cm^2 Grundfläche. Gemäß der europäischen Richtlinie 2010/63/EU [62], die bis zum Jahr 2013 in nationales Recht umgesetzt werden muss, dürfen in jedem Käfig maximal fünf Mäuse über 30g Körpergewicht gehalten werden.

Jeder Käfig ist mit einer Silikondichtung im Deckel abgedichtet. Ein Notfallfilter im Deckel (Porengröße $0,2\mu\text{m}$), bewahrt die Tiere vor dem Ersticken, im Falle dass die Lüftereinheit ausfällt oder der Käfig nicht korrekt in das Regal eingeklinkt ist. Die Luftgeschwindigkeit beträgt auf Mausebene maximal $0,05\text{m/sec}$ und entspricht damit den Empfehlungen von Baumans et al., 2002 [63](Abbildung 4). Die Luftwechselrate im Gesamtsystem beträgt 60 Luftwechsel/ Stunde.

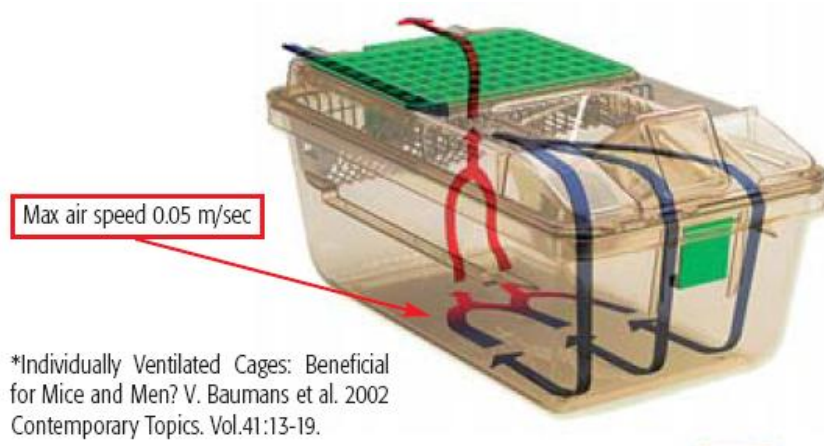


Abbildung 4: Luftgeschwindigkeit und Strömungsrichtung in „GM 500“ Mausekäfigen (Tecniplast) [64]

Jede wandmontierte Lüftereinheit entnimmt dem Tierraum 190m³ Raumluft/ Stunde.



Abbildung 5: Luftstrom im IVC System,

gelbe Pfeile: Raumluft,

blaue Pfeile: HEPA-gefilterte sterile Zuluft,

rote Pfeile: Abluft der Mäuse,

violetter Pfeil: HEPA gefilterte Abluft, die in das Raumentlüftungssystem abgegeben wird.

Einen Überblick über den Weg der Luft im IVC gibt Abbildung 5. Raumluft wird zunächst durch die Lüfter Einheit angesaugt, durch Zuluftvorfilter von groben Partikeln gereinigt und dann *HEPA* gefiltert (gelbe Pfeile). Sterile Luft strömt nun durch den kurzen Zuluftschlauch und das horizontale Zuluftsammelrohr, um dann über die schmalen, vertikalen Zuluftrohre, die jeweils eine Spalte des IVC

Regals mit Frischluft versorgen, über Käfiganschlussadapter in die Mausekäfige zu gelangen (blaue Pfeile). Nach der Käfigpassage (Abbildung 4) strömt die staubhaltige, potenziell mit Pathogenen belastete Abluft durch die ebenfalls spaltenweise vorhandenen schmalen, vertikalen Abluftrohre in das untere horizontale Abluftsammelrohr. Dort vereinigt sich die Abluft aller Käfige eines IVC Regals. Die Abluft strömt weiter durch den langen Abluftschlauch (rote Pfeile), um nach Passage des Abluftvorfilters und Abluft *HEPA* Filters in der Lüfter Einheit, durch den Entlüftungsschlauch in die Raumentlüftung abgegeben zu werden (violetter Pfeil).

1.8.3. Mäuse

In Infektionsversuchen und als Sentinels wurden Auszuchtmäuse Crl:CD1(Icr)/Dcm (Dcm = *Department of Comparative Medicine*) aus der versuchstierhaltungseigenen SPF Stammzucht verwendet.

Die Negativgruppe im Sensitivitätsexperiment besteht aus genetisch modifizierten Stämmen auf C57BL/6 Hintergrund, die über Embryotransfer in den SPF Container in die Barriere eingebracht wurden und dort in IVCs gehalten werden.

Die Kolonieserumproben stammen von verschiedenen genetisch modifizierten und Wildtypmäusen unterschiedlicher Stämme.

Einstreusentinels

Das Hygienemonitoring mit Einstreusentinels findet vierteljährlich, im Bereich der Stammzuchten alle 6 Wochen statt.

In jedem Tierraum werden zwei männliche, circa 8 Wochen alte Crl:CD1(Icr)/Dcm Mäuse aus der hausinternen SPF Stammzucht (Container) in Einzelkäfigen eingesetzt. Das Gesundheitszeugnis vom September 2011 (Anhang VIII.6) enthält die historischen Sentineluntersuchungsergebnisse der letzten 18 Monate, also für den gesamten Zeitraum der Untersuchungen. Bei der offenen Käfighaltung gibt es 8 Regale mit insgesamt 280 Typ II Mausekäfigen, bei IVC Haltung 5 Regale mit insgesamt 315 Typ GM 500 Mausekäfigen pro Tierraum. Wöchentlich wird aus jedem Käfig zweier Regale (offene Haltung) oder eines Regals (IVC) ca. 5cm³ gebrauchte Einstreu gesammelt und in den Sentinelkäfigen mit dergleichen Menge sauberer, steriler Einstreu gemischt. So haben die Einstreusentinels am Ende der zwölfwöchigen Überwachungsperiode aus jedem Käfig im Tierraum mindestens zweimal gebrauchte Einstreu erhalten.

Die Hygieneuntersuchung wird durch ein externes Diagnostiklabor gemäß der Empfehlung der FELASA zur Gesundheitsüberwachung von Labornagern [12] mit folgenden Ergänzungen durchgeführt:

Serologie: *Leptospira* Serogruppen *ballum*, *canicola*, *hebdomadis* und *icterohaemorrhagiae*, K Virus, Laktat Dehydrogenase Virus, Polyoma Virus, Maus Thymus Virus, Hantavirus und murines Norovirus.

Bakterien, Mykoplasmen und Pilze: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

Parasiten: *Aspicularis sp.*, *Syphacia sp.*, Coccidien, *Giardia spp.*, *Spironucleus muris*, *Trichomonas*, *Protozoan flagellates* (z.B. *Enteromonas*) und Arthropoden.

Bei der bakteriologischen Untersuchung werden Abstriche aus Organproben auf einer Schafblutagarplatte für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ aerob bebrütet. Es werden alle relevanten Bakterienkolonien untersucht und spezifiziert, die unter diesen Bedingungen wachsen.

1.8.4. Raumlufsentinels

Raumlufsentinels bekommen keine gebrauchte, sondern nur frische Einstreu und werden im offenen Käfig in der Nähe der Raumluftaustrittöffnung im zu überwachenden Tierraum gehalten (Abbildung 6). Anhand von Raumlufsentinels lässt sich überprüfen, ob die durch den Umgang mit gebrauchten Käfigen außerhalb der Käfigwechselstationen im Tierraum freigesetzte Virusmenge ausreicht, um eine Infektion im empfänglichen Tier auszulösen.

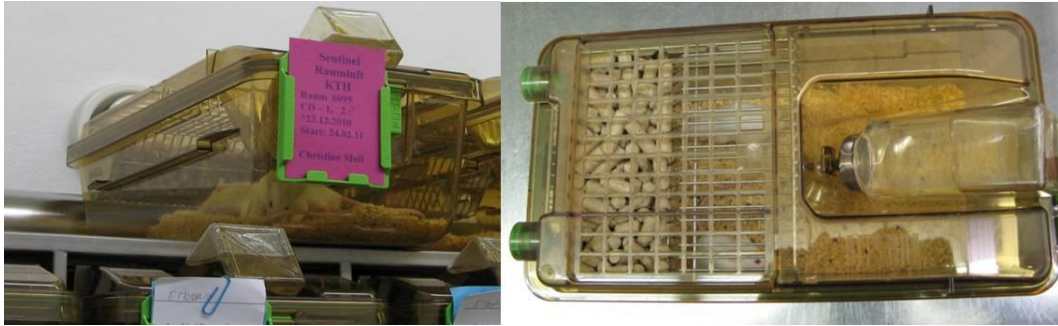


Abbildung 6: Raumlufsentinels

2. Gewinnung und Extraktion viraler RNA

2.1. RNA Extraktion aus Kot

Kotproben wurden mit sterilen Einwegpinzetten in sterilen 1,5 oder 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Eine Sammelkotprobe aus dem Mausekäfig enthält 10 Kotpellets. Diese Menge wurde in Anlehnung an Manuel et al. 2004 [28] gewählt, weil in dieser Menge ein infiziertes Kotpellet zwischen ansonsten nicht infizierten Kotpellets noch zuverlässig detektiert werden kann.

Einzelkotproben bestehen aus 3 Kotpellets und wurden entweder direkt aus dem Anus der Maus gewonnen oder aus dem Käfig, nachdem die Maus auf frische Einstreu gesetzt wurde.

Einzelkotproben wurden in 500 μl , Sammelkotproben in 1000 μl MilliQ gefiltertem Wasser ca. 30 min bis zum Auflösen der Kotpelletstruktur auf dem Schüttler (1400 rpm) eingeweicht.

Anschließend wurden die Proben 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert und 140 μl des Überstandes mit dem Lysis Puffer (AVL) des QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) 10 min inkubiert. Die weitere Verarbeitung erfolgt nach Herstelleranweisung.

Die Methodik der RNA Isolierung beruht auf dem Prinzip der

Affinitätschromatographie. Das Viruscapsid wird zunächst durch den denaturierenden Lysispuffer (AVL Puffer) zerstört und die virale RNA freigesetzt. Dem Puffer wird zur Erhöhung der Ausbeute und zum Schutz der zu isolierenden RNA *carrier RNA* (Poly A) in einer Konzentration von 0,56 µg/560 µl Ansatz zugesetzt. Nach der Nukleinsäurefällung durch Zugabe von Ethanol werden Nukleinsäuren an einer Silicagelmembran gebunden. Die Bindung erfolgt bei einem pH Wert $\leq 7,5$ und hohen Salzkonzentrationen. Zwei Waschpuffer (AW1 und 2) die wie der Lysispuffer eine hohe Salzkonzentration und niedrigen pH Wert besitzen, entfernen der Probe anhaftende Kontaminanten, welche die Membran passieren.

Anschließend werden die Nukleinsäuren durch Zugabe von RNase freiem Wasser mit Zusatz von 0,04% Natriumacetat durch pH Wert Verschiebung über 8 eluiert.

2.2. Gewinnung von Staubproben und RNA Extraktion

2.2.1. Loser Staub aus dem unteren Abluftrohr

Staubproben, die nicht auf einem Trägermaterial vorliegen, wurden mit dem Staubkratzer gewonnen und je nach Menge in unterschiedlich großen Sammelgefäßen gelagert. Der Staubkratzer besteht aus einem Teleskopzeigestock, welcher mit dem desinfizierbaren, halbierten Boden einer 250ml Kunststoffflasche versehen ist (Abbildung 7).



Abbildung 7: Abluftstaubgewinnung aus dem unteren Abluftrohr mit dem Staubkratzer

Zur RNA Isolierung hat sich eine Einwaagemenge von max. 500 mg bewährt. Die Verarbeitung erfolgt wie bei den Luftvorfiltern.

2.2.2. Staub aus IVC Zu- und Abluftvorfiltern

Die Filter wurden aus der Lüfter Einheit entnommen und in einem verschlossenen Plastikbeutel gelagert und transportiert. Zum Schutz vor im Filter enthaltenen Allergenen wurden die weiteren Arbeiten unter einem Chemikalienabzug durchgeführt. Der Beutel wurde geöffnet und es wurde mit steriler Pinzette und Schere ein ca. 3x3cm großes Stück aus einem sichtbar verschmutzten Bereich des Filters herausgeschnitten (Abbildung 8). Dieser wurde sofort in ein 15ml Reaktionsgefäß gegeben und verschlossen.

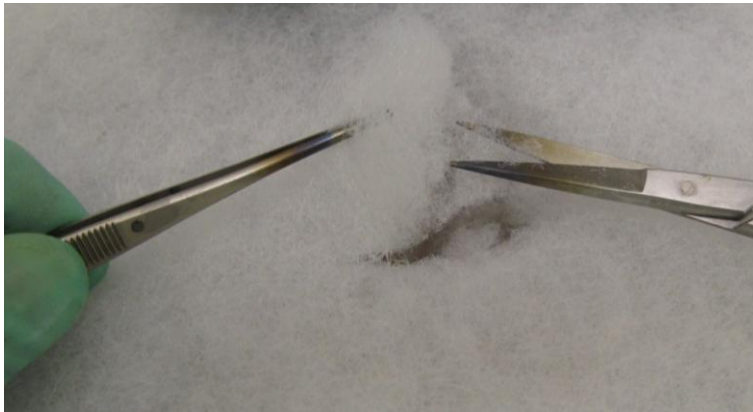


Abbildung 8: Probennahme aus IVC Luftvorfiltern

Anschließend wurde das Filterstück mit 2ml MilliQ gefiltertem Wasser ca. 30min auf dem Schüttler inkubiert und zwischendurch auf dem Schüttler gemischt. Nun wurden die Proben 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit befand sich nun unter dem Filterstück. Von dieser wurden ebenfalls 140 µl zur RNA Isolierung mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt.

Staub aus Gazefiltern auf den Luftvorfiltern

Auf einen neuen Luftvorfilter wurden mit einer Stecknadel circa 2,5x2,5 cm große Gazestücke aus sterilen ES- Kompressen auf Höhe des, der Lüfter Einheit zuführenden Abfußschlauches bzw. der Zuluft einlassöffnung mit einer sterilen Einwegpinzette befestigt (Abbildung 9).

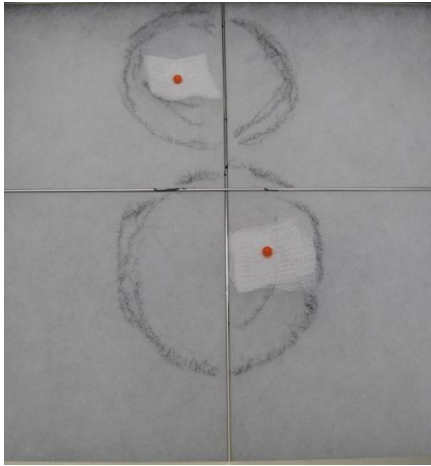


Abbildung 9: IVC Luftvorfilter mit Gazestücken

Zum Zeitpunkt der Probenahme wurde das Gazestück mit der Stecknadel ebenfalls mit einer sterilen Einwegpinzette vom Filter abgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nun wurden 1120 μ l AVL Puffer (doppelter Ansatz nach Herstellerangaben) aus dem Qiamp viral RNA mini Kit dazu gegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit auf dem Schüttler wurde das Gazestück entfernt. Die weitere Verarbeitung erfolgte analog zu den Kot- und Staubproben.

2.2.3. Staub aus Wattetupferabstrichen aus dem Schwerkraftstaubsammler

Im Experiment „Nachweissensitivität von MNV im Abluftstaub“ wurde ein in Kooperation mit dem IVC Hersteller Tecniplast SPA, Italien entwickelter Staubsammelprototyp auf seine Funktionsfähigkeit getestet (Abbildung 10).

IVC Abluft strömt aus dem langen Abluftschlauch von unten in das Gerät. Der Durchmesser des Strömungsweges vergrößert sich, dadurch wird die Luftgeschwindigkeit um das 10 fache reduziert. Partikel in der Abluft beginnen aufgrund ihrer Trägheit abzusinken. Ursprünglich sollte ein 50ml Sammelgefäß die herabsinkenden Partikel auffangen.

Es stellte sich allerdings sehr schnell heraus, dass die innerhalb des interessierenden Staubsammelzeitfensters von 2-4 Wochen im Gefäß gesammelte Staubmenge nicht ausreicht. Daher wurden Wattetupferabstriche von der Innenseite des Staubsammlers untersucht.



Abbildung 10: Schwerkraftstaubsammler an der IVC Lüfter Einheit

Nachdem die Wischprobe genommen wurde, wurde der Holzstiel abgebrochen und der Watteteil des Tupfers analog zu den Gazestücken bearbeitet.

2.3. RNA Extraktion aus Zellkulturüberstand

140 µl Zellkulturüberstand wurden mit 560 µl Lysis Puffer (AVL) des QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen,) 10 min inkubiert. Weiter wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren.

3. RT- PCR Nachweis von MNV und MHV

3.1. Konventionelle RT-PCR

Sämtliche Untersuchungen wurden mit dem T1 Thermocycler 96, (Biometra, Göttingen, Deutschland) unter Verwendung des QIAGEN®OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) in einem jeweils 25µl Reaktionsansatz durchgeführt. Bei jedem RT-PCR Lauf wurden Kontaminationskontrollen mitgeführt. Zum einen „Wasserproben“, um die Reinheit der zur RNA Isolierung verwendeten Reagenzien sicherzustellen, zum anderen „no template“ Kontrollen, um Kontaminationen beim PCR Setup detektieren zu können.

Zusätzlich wurden DNA Positivkontrollen (pCR®II-TOPO+PCR Produkt) mit untersucht.

3.1.1. Mastermix allgemein

Die Zusammensetzung des Mastermixes für die konventionelle one step RT –PCR ist in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Mastermix der konventionelle RT-PCR

	Einsatz pro 25µl Reaktionsansatz (µl)
5x RT-PCR Puffer	5
dNTP (10 mM each)	1
Primermix (10 µm)	2
RT-PCR Enzymmix	1
RNAse freies H ₂ O	14
Probe	2

3.1.2. Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1% Agarosegels wurde 1 g DNA Agarose (Biozym) abgewogen und in einem Erlenmeyerkolben mit TBE Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Diese Mischung wird in der Mikrowelle bei 800 Watt 2-3 min erhitzt, bis eine klare, schlierenfreie Lösung entstanden ist. Verdunstete Flüssigkeit wurde mit voll entsalztem Wasser ersetzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C werden 15µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, 0,1 µg/ml) zugesetzt und durch Schwenken des Kolbens vermischt. Das Gel wurde in einen Gelschlitten mit Kämmen zur Taschenbildung gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Kämmen entfernt und das Gel wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt. Nun wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt mit 5 µl Loading buffer (MBI Fermentas) vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde die DNA Leiter *GeneRuler™100bp Plus DNA ladder* mitgeführt. An die Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 120 V für 60 min angelegt. Anschließend wurde das Gel im Dokumentationsgerät mit UV Licht beleuchtet und fotografiert.

3.1. Konventionelle RT- PCR für MNV

Die Primer für die konventionelle RT- PCR für MNV wurden aus der Literatur übernommen [65] (Tabelle 5). Das PCR Produkt ist 187 bp groß (Tabelle 6).

Tabelle 5: Primer MNV konventionelle RT-PCR

Name	Sequenz	Schmelz Temp.
Primer 1	5'-CAGATCACATGCTTCCCAC-3'	50°C
Primer 2	5'-AGACCACAAAAGACTCATCAC-3'	50°C

Tabelle 6: MNV PCR Produkt (187bp)

5'CAGATCACATGCTTCCCACATGTCATGTGTGATGTGCGCACCCCTGGA
 GCCCATTCAACTCCCTCTTCTTGATGTGCGTCGAGTTCTTTGGCATGCT
 ACCCAGGATCAGGAGGAATCTATGCGCCTGGTCTGCATGCTGTACACG
 CCACTCCGCACAAACAGCCCGGGTGATGAGTCTTTTGTGGTCT 3'

Thermocyclerprotokoll MNV

Tabelle 7: Temperaturprotokoll konventionelle RT-PCR MNV

Anzahl Zyklen	Zeit (min:sec)	Temperatur	Phase
1	30:00	50°C	Reverse Transkription
1	15:00	95°C	Initiale Denaturierung
40	0:30	94°C	Denaturierung
40	0:30	60°C	Annealing
40	0:30	72°C	Extension
1	10:00	72°C	Finale Extension
		10°C	Ende

3.2. Konventionelle RT-PCR für MHV

Das PCR Produkt ist 534bp groß (Tabelle 9). Die Primer für die konventionelle RT-PCR für MHV wurden aus der Literatur übernommen (Tabelle 8) [50].

Tabelle 8: Primer MHV konventionelle RT-PCR

Name	Sequenz	Schmelz Temp.
Primer 1	5'-GTCATGAGGCTATTCCTACTA-3'	48°C
Primer 2	5'-ATACACATCTTTGGTGGG-3'	46°C

Tabelle 9: MHV PCR Produkt (534bp)

5'GTCATGAGGCTATTCCTACTAGGTTTGCGCCCGGCACGGTATTGCCT CAGGGCTTTTATGTTGAAGGCTCTGGAAGGTCTGCACCTGCTAGCCGA TCTGGTTCGCGGTCACAATCCCGTGGGCCAAATAATCGCGCTAGAAGC AGTTCCAACCAGCGCCAGCCTGCCTCTACTGTAAAACCTGATATGGCC GAAGAAATTGCTGCTCTTGT TTTGGCTAAGCTCGGTAAAGATGCCGGC CAGCCCAAGCAAGTAACGAAGCAAAGTGCCAAAGAAGTCAGGCAGAA AATTTTAAACAAGCCTCGCCAAAAGAGGACTCCAAACAAGCAGTGCC CAGTGCAGCAGTGTTTTGGAAAGAGAGGCCCAATCAGAATTTTGGAG GCTCTGAAATGTTAAAACCTTGGAAGTGTGATCCACAGTTCCCCATTCT TGCAGAGTTGGCTCCAACAGTTGGTGCCTTCTTCTTTGGATCTAAATTA GAATTGGTCAAAAAGAATTCTGGTGGTGTGCTGATGAACCCACCAAAGAT GTGTAT 3'
--

Thermocyclerprotokoll MHV

Tabelle 10: Temperaturprotokoll konventionelle RT-PCR MHV

Anzahl Zyklen	Zeit (min:sec)	Temperatur	Phase
1	20:00	50°C	Reverse Transkription
1	15:00	95°C	Initiale Denaturierung
40	0:45	94°C	Denaturierung
40	0:30	56°C	Annealing
40	1:30	72°C	Extension
1	10:00	72°C	Finale Extension
		10°C	Ende

3.3. RT-qPCR mit Fam-Dabcyl Hydrolyse Sonde

Da in der PCR nur DNA amplifiziert werden kann, wird durch reverse Transkription unter Einsatz des Enzyms *Reverse Transkriptase* eine *copy* DNA (cDNA) Vorlage aus der viralen RNA erstellt.

Im Unterschied zur konventionellen PCR, bei der das Endprodukt der exponentiellen Vermehrung des PCR Produktes durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird, erhält man bei der qPCR nach jedem PCR Zyklus Angaben zur vorhandenen Menge an PCR Produkt (deshalb auch *real-time PCR* genannt). Bei der Methode mit Hydrolysesonden wird zusätzlich zu den Primern eine templatespezifische FRET-Sonde (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) in den Ansatz gegeben. Die Sonde ist am 5` Ende mit einem Reporterfarbstoff (hier: 6`Fluorescein FAM), am 3` Ende mit einem Reporterfarbstoff (hier: dem nicht fluoreszierenden Farbstoff Dabcyl (dark quencher)) markiert, welcher wenn die Sonde intakt ist, die Fluoreszenz unterdrückt. In der Annealingphase hybridisieren Primer, Sonde und freie Nukleotide mit dem DNA Template. In der nun folgenden Elongationsphase wird die DNA Taq-Polymerase aktiv und knüpft einen neuen DNA Strang. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde zerstört, der dark quencher entfernt sich vom Reporter und es entsteht ein Fluoreszenzsignal, dass umso stärker wird, je mehr PCR Produkt entstanden ist. Dieses Signal wird am Ende jedes PCR Zyklus vom real-time PCR Gerät gemessen. Das Ergebnis ist eine Amplifikationskurve.

3.3.1. Quantifizierung von PCR Produkten

Jede Amplifikationskurve besteht aus vier Phasen. In der exponentiellen Amplifikationsphase tritt das Signal aus dem Grundrauschen (Basislinie) hervor. In der linearen Phase nimmt die Menge an PCR Produkt kontinuierlich zu, um schließlich in der Plateauphase zu stagnieren (Abbildung 11).

Zur Auswertung wird ein Schwellenwert innerhalb der exponentiellen Phase gesetzt. Der PCR Zyklus, in dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert überschreitet, wird als Quantifizierungszyklus (C_q) bezeichnet.

Um Aussagen zur Menge des Ausgangstemplates zu machen, wird bei jedem PCR Lauf eine Verdünnungsreihe mit bekannter Template Kopienzahl über mindestens fünf exponentielle Stufen mit aufgetragen [66]. Die C_q Werte der Proben werden mit denen des Standards verglichen und die Kopienzahl in der Probe berechnet.

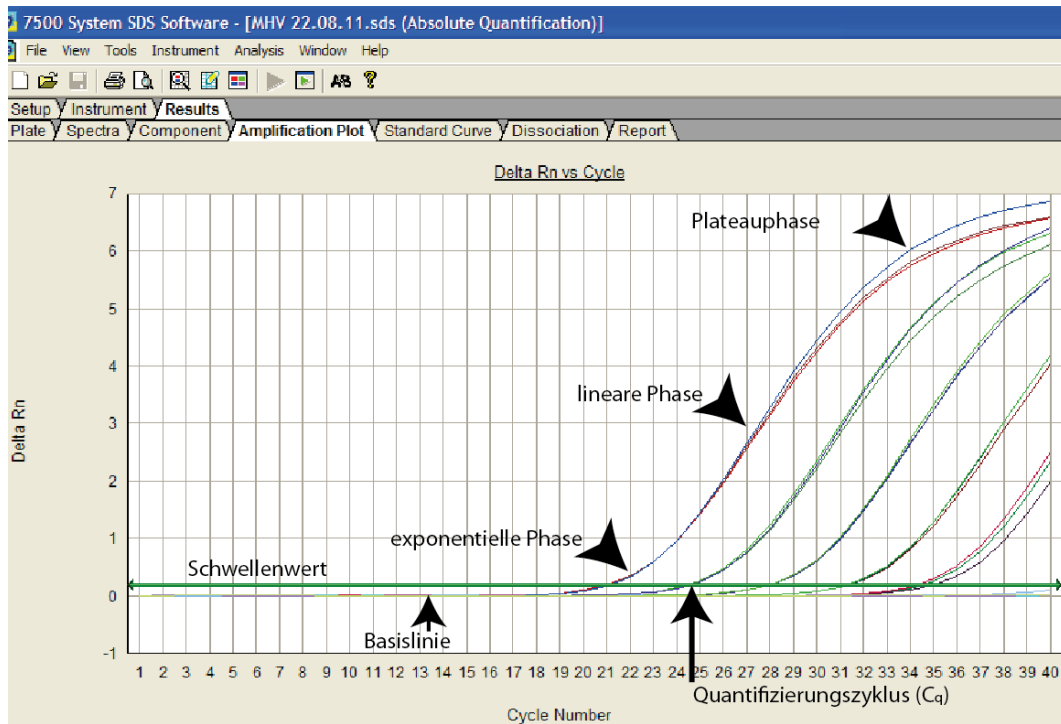


Abbildung 11: Quantifizierung in der RT-qPCR am Beispiel des MHV RT-qPCR assays. Auf der y-Achse ist die normalisierte Fluoreszenz (Delta Rn) linear angegeben. Die fünf Kurven von links nach rechts sind jeweils Triplikate des RNA Standards von 3×10^6 bis 3×10^2 Kopien/Ansatz. Der Schwellenwert wurde für sämtliche Auswertungen auf 0,2 gesetzt.

3.3.1.1. Herstellung des DNA-Standards

Um einen stabilen und gut quantifizierbaren Standard für die Quantifizierung der PCR Produkte zu erhalten wurden PCR Produkte mit dem QIAGEN®OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) generiert und mit dem TOPO® TA cloning kit (invitrogen) in ein Plasmid (pcrII) kloniert.

Taq-Polymerase erzeugt einen 3' Desoxyadenosin Überhang am PCR Produkt. Der linearisierte pcrII-Vektor hat einen 3' Thymidin Überhang. Die am Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I wird aktiviert und das PCR Produkt in den Vektor ligiert.

Der Vektor wurde über eine Hitzeschock Reaktion in chemisch kompetente E.coli (TOP 10) transformiert.

3.3.1.1.1. Auswahl des Plasmides

Die Selektion der Bakterienkolonien nach 8h erfolgte zum einen über die im Vektor kodierte Kanamycinresistenz, zum anderen über *blue-white screening*. Ist das β -Galaktosidasegen auf dem Plasmid durch den Einbau des PCR Produktes zerstört, können die Bakterien den im Nähragar enthaltenen Zucker x-gal nicht

verstoffwechseln und erscheinen weiß.

So selektierte Bakterienkolonien wurden in kanamycinhaltigem LB-Medium bei 37°C unter Schütteln ca. 8h inkubiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet durch Zentrifugation gewonnen und die Plasmide mit dem NucleoBond® PC20/100 Kit (Macherey-Nagel) isoliert und in TE Puffer gelöst.

Zur weiteren Überprüfung, ob das richtige Plasmid ausgewählt wurde, wurden folgende Methoden angewendet:

1. Verwendung von Restriktionsenzymen, die eine Schnittstelle im Plasmid und eine weitere im PCR Produkt haben und anschließende Gelelektrophorese (Abbildung 12: MNV DNA Standard (4162bp)).
2. PCR mit den Primern, die zur Generierung des Inserts verwendet wurden.
3. Als letzter Schritt zur Auswahl wurde das Insert sequenziert.

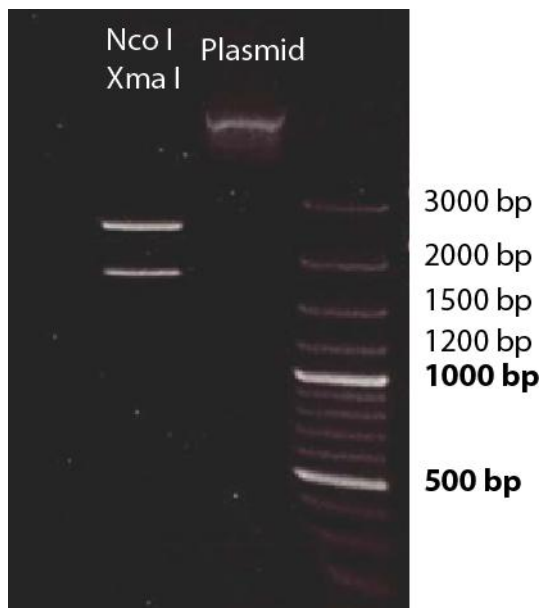


Abbildung 12: MNV DNA Standard (4162bp) +NcoI, XmaI ergibt 2 Fragmente (1751bp, 2409bp) GeneRuler™100bp plus DNA Ladder

3.3.1.1.2. Quantifizierung

Nachdem das gewünschte Plasmid eindeutig identifiziert war, wurden Reinheit und Ausbeute der Präparation mittels photospektrometrischer Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm (OD₂₆₀) und 280nm (OD₂₈₀) bestimmt. Es wurden nur Proben weiter verwendet, deren OD₂₆₀ Wert über 0,1 und

OD260:OD280 Verhältnis zwischen 1,97 und 2,0 liegen, weil die Quantifizierungsmethode nur in diesem Bereich zuverlässige Ergebnisse liefert. Der Umrechnungsfaktor für doppelsträngige DNA liegt bei 50 µg/ml pro OD260 Einheit [67].

Die Messung wurde in einer Küvette in 1:10 Verdünnung mit TE-Puffer mit dem Photospektrometer (SmartSpec™Plus) in Triplikaten durchgeführt. Jede Messung wurde dreimal wiederholt und der arithmetische Mittelwert aus den 9 Messungen für die Quantifizierung verwendet.

3.3.1.1.3. Berechnung der Kopienzahl

Die Masse eines Plasmidmoleküles in Gramm (m) berechnet sich wie folgt:

$$m = \frac{n \text{ bp} \times 660 \text{ g} \times \text{mol}^{-1} \times \text{bp}^{-1}}{6,023 \times 10^{23}}$$
$$m = n \times (1,096 \times 10e^{-21} \frac{\text{g}}{\text{bp}})$$

Formel 1: Berechnung Plasmidmasse (m) aus [68], n= Anzahl Basenpaare

Da in der RT-qPCR nicht 1µl, sondern 5µl Probe bzw. Standard eingesetzt werden, muss die Konzentration der Plasmidmasse (m) in 1µl in der PCR eingesetztem Standard 1/5 der berechneten Menge betragen, um in der PCR die Kopienzahl(k) einzusetzen.

$$mx = \frac{k \times m}{5}$$

Formel 2: Berechnung der Masse einer beliebigen Kopienzahl (k) bei 5µl Einsatz in der qPCR (mx)

3.3.1.1.4. Verdünnung und Lagerung des DNA Standards

Der DNA Standard wurde mittels Verdünnung in TE Puffer auf die erforderliche Ausgangskopienzahl eingestellt, aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die Verdünnungsreihe für die RT-qPCR über 5log Stufen wird vor jedem Lauf frisch erzeugt um Abweichungen durch Degradation der DNA zu verhindern.

3.3.1.2. Herstellung des RNA-Standards

Da das Ausgangsmaterial für die RT-qPCR virale RNA ist, wird sie durch den DNA Standard unzureichend nachgebildet. Es fehlt die Kontrolle für die reverse Transkription des Templates. Aus diesem Grund wurde durch *in vitro* Transkription ein RNA Standard erstellt.

3.3.1.2.1. *In vitro* Transkription

Als Vorlage dient der DNA Standard, da das verwendete Plasmid (pcrII) eine SP6 und T7 Bindungsstelle für RNA Polymerasen enthält. Zunächst wurde der Vektor entweder mit HindIII (T7) oder XbaI (SP6) linearisiert.

Anschließend wurden Restriktionsenzyme und deren Puffer mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) entfernt. Die *in vitro* Transkription erfolgt mit der SP6 oder T7 RNA Polymerase (Roche Diagnostics) mit 1 µg DNA Einsatz nach dem „cold assay“ Protokoll (Abbildung 13).



Abbildung 13: RNA Standard nach DNase Verdau und Gelelektrophorese (0,8% Agarose)

3.3.1.2.2. Quantifizierung

Die Qualitätskontrolle und Quantifizierung wurde analog zum DNA Standard durchgeführt. Bei einzelsträngiger RNA beträgt der Umrechnungsfaktor 40 µg/ml pro OD260 [69].

3.3.1.2.3. Verdünnung und Lagerung

Der RNA Standard wurde nach der Quantifizierung in DEPC behandeltem MilliQ gefiltertem Wasser verdünnt, welches zum Schutz der RNA mit mit 20 µg/ml

carrier RNA (Qiagen) versetzt wurde und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

3.3.2. Mastermix RT-qPCR allgemein

Beide PCRs wurden auf einem 7500 Real time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Ein 25µl Reaktionsansatz besteht aus 20µl Mastermix und 5µl Probeneinsatz (Tabelle 11).

Tabelle 11: Mastermix RT-qPCR (Agpath-ID™ One-Step RT-PCR Kit, Ambion)

	Einsatz pro 25µl Reaktionsansatz (µl)	Finale Konz. in der qPCR (nM)
2x RT-PCR Puffer	12,5	-
Primermix (6,4 µm)	6,3	Je 800
Taqman-Sonde (20 µm)	0,15	120
25x RT-PCR Enzymmix	1	-
Probe	5	-

3.3.3. Temperaturprotokoll RT-qPCR allgemein

Tabelle 12: Temperaturprotokoll RT-qPCR

Anzahl Zyklen	Zeit (min:sec)	Temperatur	Phase
1	30:00	50°C	Reverse Transkription
1	10:00	95°C	Initiale Denaturierung
40 (MHV) 42 (MNV)	00:15	95°C	Denaturierung
40 (MHV) 42 (MNV)	1 :00	60°C	Primer Hybridisierung & Elongation

3.3.3.1. RT-qPCR für MNV

Das PCR Produkt ist 92bp lang und liegt innerhalb des PCR Produktes für die

konventionelle PCR. Primer und Sonde wurden aus der Literatur übernommen (Tabelle 13) [70]. Alle PCR Läufe wurden mit einem Schwellenwert von 0,1 ausgewertet.

Tabelle 13: Primer & Sonde MNV RT-qPCR

Name	Sequenz	Schmelz Temp.
Primer 1	5`-AGAGGAATCTATGCGCCTGG-3`	53°C
Primer 2	5`-GGAGGCGGCCAGAGACCA-3`	57°C
FRET-Sonde	5`-Fam-CGCCACTCCGCACAAACAGCCC-Dabcyl-3`	63°C

Tabelle 14: MNV RT-qPCR Produkt (92bp)

5`AGAGGAATCTATGCGCCTGGTTTGCATGCTGTACACGCCACTCCGCACAAAC AGCCCGGGTGATGAGTCTTTTGTGGTCTCTGGCCGCCTTC 3`

3.3.3.2. RT-qPCR für MHV

Das PCR Produkt ist 63bp lang (Tabelle 16) und liegt in einer konservierten Region des Coronavirus Genoms dem ORF 1b, welcher für Teile der viruseigenen RNA Polymerase kodiert [32], um ein möglichst breites Spektrum verschiedener MHV Stämme erfassen zu können. Primer und Sonde wurden mit der Software „Primer Express“ erstellt (Tabelle 15). Alle Läufe wurden mit einem Schwellenwert von 0,2 ausgewertet.

Tabelle 15: Primer & Sonde MHV RT-qPCR

Name	Sequenz	Schmelz Temp.
Primer 1	5`-AGCCTTGAACCGAGCCATT-3`	58°C
Primer 2	5`-ATCACCCACGCGATTACCA-3`	58°C
FRET Sonde	5`-Fam-CCGGAGCCCACAAGGTAATCCGG-Dabcyl-3`	70°C

Tabelle 16: MHV RT-qPCR Produkt (63bp)

5`AGCCTTGAACCGAGCCATTACCGGAGCCCACAAGGTAATCCGGGTGGTAA TCGCGTGGGTGAT 3`
--

4. Virusvermehrung in der Zellkultur

MHV A59 wurde auf NCTC 1469 Zellen vermehrt und auf L929 Zellen zur Bestimmung der TCID₅₀ titriert.

MNV Neuherberg U1 wurde auf RAW 264.7 Zellen vermehrt und titriert.

Alle Zellen wurden in DMEM Flüssigmedium ohne Na-Pyruvat, mit stabilem Glutamin mit 3,7 g/l NaHCO₃, mit 4,5 g/l D-Glukose unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum kultiviert.

5. Serologische Untersuchung

Alle serologischen Untersuchungen auf MHV/MNV Antikörper wurden von zwei kommerziellen Diagnostiklaboren durchgeführt. Bei Labor A werden Serumproben zunächst mit einem ELISA untersucht. Positive Ergebnisse werden durch das Referenzlabor Labor B mittels IFA nachgetestet. Serumproben, die direkt an Labor B gesendet wurden, wurden direkt mit IFA untersucht und bei unspezifischen Reaktionen mit ELISA im Labor B selbst nachgetestet.

5.1. Blutentnahmetechnik

Serumproben wurden entweder durch Punktion der Schwanzvene, Punktion der *vena facialis* oder final durch Kardiozentese nach CO₂ Tötung gewonnen. Techniken und Volumina folgten den Empfehlungen der GV-SOLAS zur Blutentnahme bei kleinen Versuchstieren [71].

5.1.1. Punktion der Vena facialis

Die Maus wurde durch einen Nackengriff fixiert. Dabei ist es wichtig die Gesichtshaut möglichst straff nach kaudal zu ziehen um eine Stauung der Venen im Kopfbereich zu bewirken („*facelift*“). Dann wurde die *vena facialis* mit einer Medipoint *animal lancet* 3-4mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer punktiert. Die Blutung stoppt unmittelbar nach Auflösen der Stauung. Die Vene wurde frühestens nach einer Ruhezeit von 2 Wochen wieder punktiert. Mit dieser Methode können kleine bis mittlere Blutvolumina entnommen werden.

5.1.2. Punktion der Schwanzvene

Zur Hyperämisierung der Schwanzvene wurde die Maus in einem Käfig ohne Deckel für 1-2 Minuten unter einer Infrarotwärmelampe positioniert und anschließend in einen Restrainer gesetzt. Der Schwanz wurde gestreckt und im hinteren Drittel über den Zeigefinger gelegt. Punktiert wurde eine der lateralen Schwanzvenen im mittleren Drittel mit einer 24G Kanüle, bei der der Konus vorher abgebrochen wurde. Diese Methode eignet sich für kleinere Blutvolumina

und bei häufiger Punktion desselben Tieres.

5.1.3. Kardiozentese

Die Maus wurde zunächst mit CO₂ getötet. Nachdem der Eintritt des Todes festgestellt wurde, wurde der Brustkorb und das Herz eröffnet. Blut sammelt sich in der Brusthöhle. Dieses wurde nun mit einer 1 ml Spritze herausgesaugt und in ein Serumgefäß gegeben. Diese Methode eignet sich nur für die finale Entnahme großer Blutvolumina.

5.2. Probenbearbeitung und Versand

Blutproben werden in 1,3 ml Mikro-Serumgefäßen mit Z-gel (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) gewonnen, nach 30 min Gerinnungszeit bei Raumtemperatur 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Der Versand erfolgt gekühlt in einer Styroporbox.

6. Sequenzierung eines MNV Virusisolates

6.1. Herkunft

In einem Maushaltungsbereich mit offenen Käfigen wurden mittels Kot PCR Virusausscheider identifiziert und RAW 264.7 Zellen mit dem abzentrifugierten, steril filtrierten (0,2µm Spritzenfilter) Eluat aus in DMEM eingeweichten Kotproben infiziert [27]. Im Folgenden wurde das Virusisolat zur weiteren Charakterisierung mittels „Primer walking“ sequenziert (Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Primer zur Sequenzierung des MNV Isolates

Primer	Sequenz	Start	Stop	Größe	Sequ.
1F*	GTGAAATGAGGATGGCAACGC	1	21	1145	pcrII
10R*	TCCACCAACTCGGCCCT	1145	1128		
11F	GGCTGAGTTGAGGAAGTG	593	610	672	pcrII
11R	ATGACAGCTTGCTCCATGTTG	1264	1243		
8F	GGGCGTAAGCTCGCCTCCAC	1113	1132	195	pcrII
8R	ACGGCCTCTCTTGTTCCCTGCT	2646	2464		
12F	CAACATGGAGCAAGCTGTCAT	1244	1264	966	pcrII
12R	GCTGCCATCTTGTACCA	2209	2193		
2F*	CTATGACTTTGATGCTGGCAA	2192	2212	2304	pcrII
2R*	CTTCGACGACGATCTTGTAG	4432	4413		
20F	TCCAAGGGCGGCAAGTACTC	2720	2739		2F/R
3F (mod)	GCGGAGAGGGCCAAGCTTAGC	2853	2873	1608	pcrII
3R (mod)	GGTGCAAGGGCAACCAGACG	4460	4441		
6F	TGGTGCGCCTCTCCCCTGAG	4368	4388	1422	PCR Produkt
6R	GCCAACGAGCGTGCGTGC	5771	5754		
9F	AGCCGGCAGCTGATTTCAA	5680	5696	319	PCR Produkt
9R	CCATCCTGCTCAATCATGGTGA	5998	5977		
5F	CTGTGCACGCACGCTCGTTG	5790	5810	1117	PCR Produkt
5R	CACCTGGGCGCCAAGCATCT	6906	6886		
4F*	GCCAACCTTTTCAAGCA	6883	6899	501	PCR

4R*	AAAATGCATCTAAATACTAC	7383	7364		Produkt
-----	----------------------	------	------	--	---------

* übernommen aus Kim et al. 2010 [72]. Start und Stop beziehen sich auf *murine norovirus* GV/CR6/2005/USA, complete genome (EU004676.1). Der Primer 20F liegt innerhalb von 2 F/R.

6.2. Primerwalking

Der Reaktionsansatz erfolgte nach dem Standardprotokoll (Tabelle 4: Mastermix der konventionelle RT-PCR und dem folgenden Temperaturprotokoll (Tabelle 18). In Tabelle 17 findet sich eine Übersicht über die verwendeten Primerpaare und PCR Produkte. Nach der Kontrolle durch Gelelektrophorese wurde das PCR Produkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) aufgereinigt und an eine externe Firma zur Sequenzierung gesendet. Bei geringer Ausbeute wurde das PCR Produkt wie bereits beschrieben (3.3.1.1) in einen pcrII Vektor kloniert in Top10 Bakterien vermehrt und über die SP6 oder T7 Primerbindungsstelle auf dem Vektor sequenziert.

Tabelle 18 : Temperaturprotokoll für lange PCR Produkte zur Sequenzierung

Anzahl Zyklen	Zeit (min:sec)	Temperatur	Phase
1	30:00	45°C	Reverse Transkription
1	15:00	95°C	Initiale Denaturierung
35	00:10	94°C	Denaturierung
35	01:00	56°C	Primer Hybridisierung
35	02:30	68°C	Extension
1	10:00	68°C	Finale Extension
		10°C	Ende

6.3. Generierung der Gesamtsequenz

Die Sequenzierungsprodukte wurden mit NCBI blastn (discontiguous megablast) nach Entfernung von Vektorkontamination (vecscreen) gegen die Sequenz von Murine norovirus GV/CR6/2005/USA (Genbank: EU004676.1) verglichen, und die Gesamtsequenz wurde mit Hilfe des Programmes: Sci ed central clone manager 5 for windows 95 Version 5.02 manuell zusammengefügt.

V. ERGEBNISSE

1. Hygienemonitoring von Mäusekolonien in offenen Käfigen

1.1. Historische Serologie Daten der Einstreusentinelns

Um Rückschlüsse auf die Prävalenz von MNV und MHV im KTH zu ziehen, wurden die historischen Ergebnisse der zur Gesundheitsüberwachung eingesetzten Einstreusentinelns betrachtet (Tabelle 19). In jedem Tierraum wurden zwei Sentinelns in Einzelkäfigen eingesetzt. Zwischen September 2008 und Juni 2010 waren in 10 von 13 Tierräumen MNV seropositive Ergebnisse zu finden (Tabelle 20). Alle Räume wiesen fast durchgängig MHV seropositive Sentinelbefunde auf (Tabelle 21).

Tabelle 19: Legende Sentinelserologie

pos/pos	beide Sentinelns seropositiv
pos/neg	ein von zwei Sentinelns seropositiv
pos	nur ein Sentinel vorhanden; seropositiv
neg	nur ein Sentinel vorhanden; seronegativ
neg/neg	beide Sentinelns seronegativ

Tabelle 20: Historische Einstreusentinelnergebnisse für MNV in offenen Käfigen zwischen September 2008 und Juni 2010 (Serologie, ELISA)

Raum	Nutzer	09/08	12/08	03/09	06/09	09/09	12/09	03/10	06/10
6094	A	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6095	A	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	pos/pos	neg/neg	neg/neg
6096	A	pos/neg	neg/neg	neg/neg	pos/pos	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6097	D	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6098	B	neg/neg	pos/pos	pos/pos	neg/neg	neg/neg	pos/neg	pos/neg	neg/neg
6099	B	pos/neg	pos/pos	neg/neg	pos/pos	neg/neg	neg/neg	pos/neg	pos/pos
6100	B	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	neg/neg	neg/neg	pos/pos	pos/pos
6101	B	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	neg/neg	neg/neg	pos/pos	pos/neg
6111	C	neg/neg	neg/neg	pos/pos	pos/pos	neg/neg	pos/neg	pos/pos	neg/neg
6112	C	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6113	E	pos/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	pos/pos	pos/pos	pos/neg
6114	E	neg/neg	neg/neg	pos/pos	neg/neg	neg/neg	pos/neg	pos/pos	neg/neg
6115	E	pos/pos	pos/pos	neg/neg	neg/neg	pos/pos	pos/pos	neg/neg	pos/neg

Tabelle 21: Historische Einstreusentinelsergebnisse für MHV in offenen Käfigen zwischen September 2008 und Juni 2010 (Serologie, ELISA)

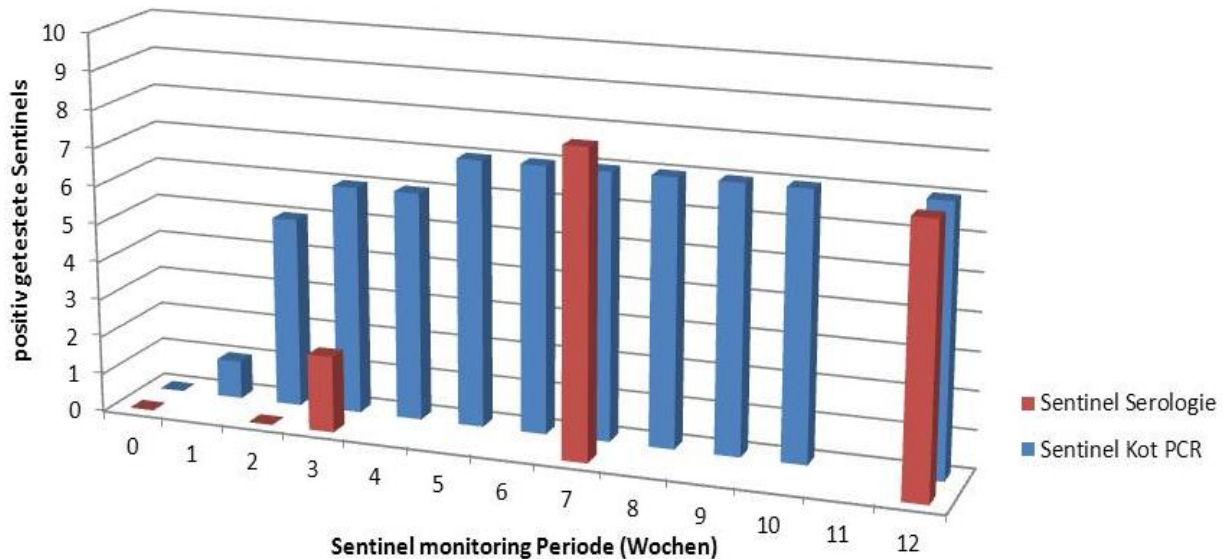
Raum	Nutzer	09/08	12/08	03/09	06/09	09/09	12/09	03/10	06/10
6094	A	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6095	A	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6096	A	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6097	D	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6098	B	neg/neg	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6099	B	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6100	B	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6101	B	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6111	C	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6112	C	neg/neg	pos/pos	neg/neg	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6113	E	neg/neg	pos/pos	pos/pos	neg/neg	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6114	E	pos/pos	pos/pos	neg/neg	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos
6115	E	neg/neg	neg/neg	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/pos	pos/neg

1.2. Übertragung von MNV und MHV auf Einstreusentinelns in offener Haltung

Um einen Eindruck über die Infektionsdynamik der Feldvirusinfektion mit MNV und MHV zu bekommen wurden Einstreusentinelns in offener Haltung während der zwölfwöchigen Monitoring Periode auf Virusausscheidung im Kot und Serokonversion untersucht.

1.2.1. MNV

In offener Haltung begannen einige Sentinels in Woche 1 MNV im Kot auszuscheiden. Sieben von zehn Sentinels schieden im Laufe der Monitoring Periode kontinuierlich Virus im Kot aus und serokonvertierten ein bis zwei Wochen nach Beginn der Ausscheidung. Drei Sentinels blieben über den gesamten Zeitraum in Kot und Serum negativ (Abbildung 14). Eine detaillierte Übersicht über sämtliche Ergebnisse der MNV Sentineluntersuchung findet sich in Tabelle 34 im Anhang.



Raum	Sentinel	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6
6099	257	-	+	+	+	+	+	+

Abbildung 14: MNV Übertragung auf Einstreusentinels in fünf Tierräumen mit offenen Käfigen; n=10, 2 Sentinels pro Tierraum

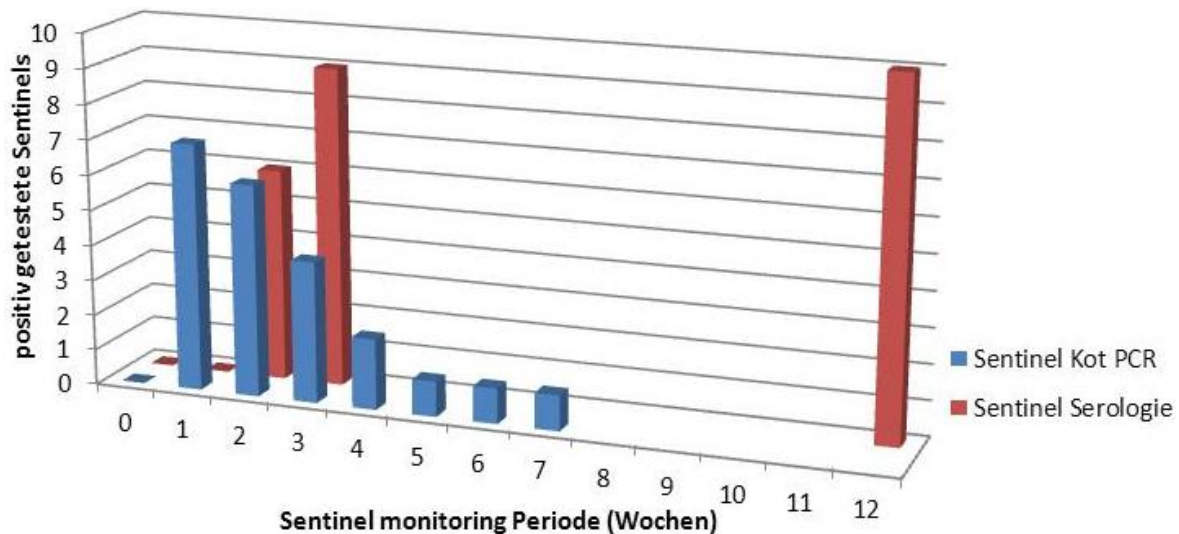
Darunter: typischer MNV Infektionsverlauf am Beispiel von Sentinel 257. Virus wird über Wochen im Kot ausgeschieden. Die Serokonversion folgt ein bis zwei Wochen später. Nach der Serokonversion dauert die Ausscheidungsphase an.

+/- = Ergebnis der Sentinelkot PCR; Farbkodierung = Serologie (dunkelgrau: negativ, hellgrau: positiv, weiß: keine serologische Untersuchung durchgeführt)

1.2.2. MHV

In offenen Käfigen begannen die Sentinels bereits in den ersten ein bis zwei Wochen Virus im Kot auszuscheiden, gefolgt von Serokonversion 1-2 Wochen später. Mit der Serokonversion endete die Virusausscheidung. Am Ende der zwölfwöchigen Monitoring Periode waren alle Sentinels seropositiv (Abbildung 15). Ist ein Tier einmal seropositiv, kann

man davon ausgehen, dass es über einen längeren Zeitraum seropositiv bleibt, weshalb eine erneute Testung nicht nötig ist. Eine Übersicht über sämtliche Ergebnisse der MHV Sentineluntersuchung findet sich in Tabelle 35 im Anhang.



Raum	Sentinel	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6
6094	331	-	-	-	+	+	-	-

Abbildung 15: MHV Übertragung auf Einstreusentinels in fünf Tierräumen mit offenen Käfigen; n=10, 2 Sentinels pro Tierraum

Darunter: typischer MHV Infektionsverlauf am Beispiel von Sentinel 331. Virus wird 1 bis 2 Wochen lang im Kot ausgeschieden. Die Serokonversion folgt eine Woche später. Mit der Serokonversion endet die Virusausscheidungsphase.

-/+ = Ergebnis der Sentinelkot PCR; Farbkodierung = Serologie (dunkelgrau: negativ, hellgrau: positiv),

1.3. Untersuchung von Abluftstäuben aus Tierräumen mit offenen Käfigen auf MHV und MNV

Um erste Erfahrungen im Sammeln und der Verarbeitung von Staubproben zu erlangen, wurden Staubproben aus den Abluftöffnungen im Tierraum gewonnen und mittels konventioneller RT-PCR auf MHV und MNV untersucht. Es wurden immer 25mg Staub untersucht, außer bei Probe 2, dort waren es 8mg.

MHV ist eindeutig im Staub der Abluft in 12 von 14 Tierräumen zu finden. Die Staubproben „2“ und „8“ sind uneindeutig. MNV hingegen ist in 2 von 14 Räumen nachzuweisen (Abbildung 16).

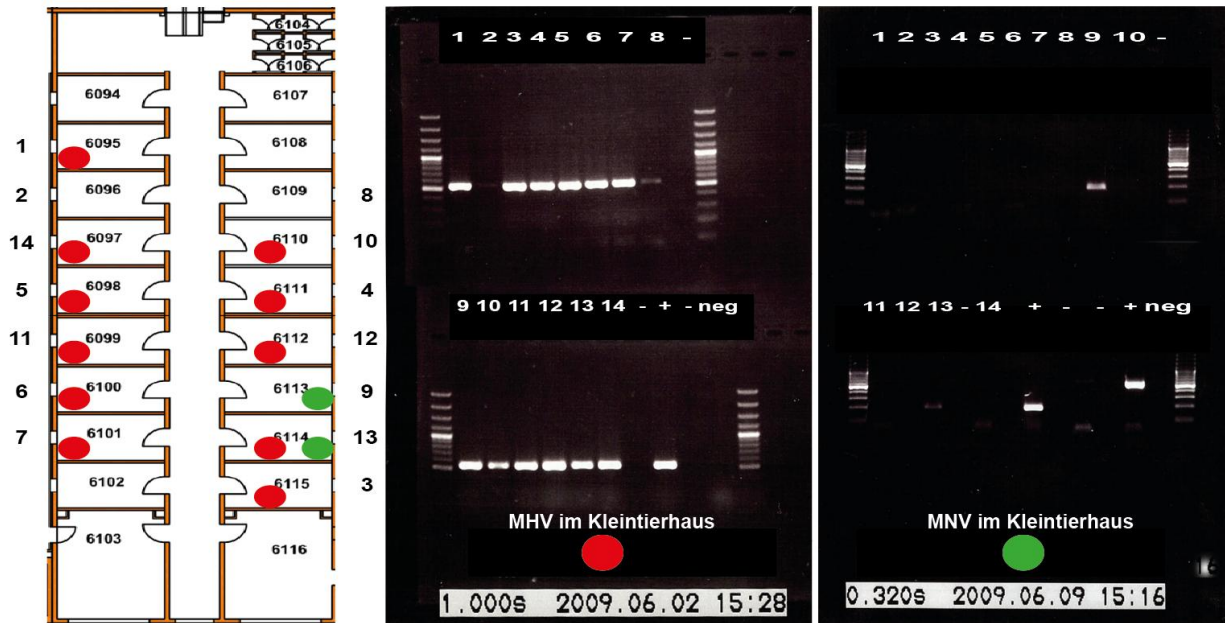


Abbildung 16: PCR Untersuchung von Abluftstäuben aus Mäuseräumen im Kleintierhaus mit offenen Käfigen (Juni 2009)

Links: Raumübersicht, rote Punkte MHV PCR positiv, grüne Punkte: MNV PCR positiv

Rechts: PCR Produkte auf 1,5% Agarosegel, Nummern ordnen die Banden den Tierräumen zu. "neg"= Negativkontrolle der RNA Präparation, „+“ PCR DNA Positivkontrolle, „-“ PCR Negativkontrolle

2. Hygienemonitoring von Mäusekolonien in IVCs

Um ein umfassendes Bild über die Effektivität des Routinehygienemonitoringkonzeptes mit Einstreusentinelns und die PCR Untersuchung des Abluftstaubes im Kleintierhaus nach der Umstellung auf IVC Haltung zu erhalten, wurden im laufenden Betrieb während der Überwachungsperiode von 12 Wochen Sentinels auf Virusausscheidung im Kot und Serokonversion getestet. Außerdem wurde die Kolonieseroprävalenz ermittelt und Abluftvorfilter mittels PCR auf virale RNA untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse wegen der besseren Übersichtlichkeit einzeln vorgestellt. Eine zusammenfassende Tabelle über alle Felddaten aus dem Kleintierhaus befindet sich im Anhang (Tabelle 36, Tabelle 37)

2.1. Einstreusentinels in IVCs

Nach der Umstellung des Haltungssystems auf IVC Haltung zwischen Juni und November 2011 (siehe Tabelle 3) wurden die Einstreusentinelsergebnisse des Routinehygienemonitorings im KTH weiter verfolgt.

Bei MNV änderte sich die Ergebnisstruktur nicht. Es waren in allen infizierten Tierräumen bis auf Raum 6111 intermittierend positive Serologiergebnisse zu finden (Tabelle 22). In offener Haltung waren in jedem Tierraum im Kleintierhaus durchgängig positive MHV Sentinelserologieergebnisse zu beobachten. Nach der Haltungsumstellung traten vermehrt MHV seronegative Ergebnisse auf (Tabelle 23), besonders auffällig in den Räumen 6114 und 6115, die bereits im Juni 2010 umgerüstet wurden. Der im Juni 2011 durch Embryotransfer sanierte Raum 6113 blieb bis zur Abgabe dieser Arbeit (Oktober 2011) negativ für MNV und MHV.

Tabelle 22: MNV bei Einstreusentinels in IVCs nach der Haltungsumstellung (Serologie, ELISA)

Raum	Nutzer	09/10	12/10	03/11	06/11
6094	A	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6095	A	pos/pos	neg/neg	neg/neg	pos/neg
6096	A	pos/neg	pos/neg	pos/neg	neg/neg
6097	D	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6098	B	neg/neg	neg/neg	pos/neg	neg/neg
6099	B	pos/pos	pos/pos	neg/neg	pos/pos
6100	B	pos/neg	neg	neg/neg	neg/neg
6101	B	pos/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6111	C	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6112	C	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6113	E	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6114	E	neg/neg	neg/neg	pos/pos	pos/neg
6115	E	pos/pos	pos/pos	pos/neg	pos/neg

Legende siehe Tabelle 19

Tabelle 23: MHV bei Einstreusentinelns in IVCs nach der Haltungsumstellung (Serologie, ELISA)

Raum	Nutzer	09/10	12/10	03/11	06/11
6094	A	pos/pos	neg/neg	neg/neg	pos/neg
6095	A	pos/pos	pos/neg	pos/neg	pos/pos
6096	A	pos/pos	neg/neg	pos/pos	pos/neg
6097	D	pos/pos	pos/pos	pos/pos	neg/neg
6098	B	pos/pos	pos/neg	neg/neg	neg/neg
6099	B	pos/pos	pos/pos	pos/pos	neg/neg
6100	B	pos/pos	neg	neg/neg	neg/neg
6101	B	pos/neg	neg/neg	pos/neg	pos/pos
6111	C	pos/pos	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6112	C	pos/pos	neg/neg	pos/pos	pos/pos
6113	E	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6114	E	pos/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg
6115	E	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg

Legende siehe Tabelle 19

2.2. Übertragung von MNV und MHV auf Einstreusentinelns in IVCs

Nachdem die Haltung ohne Rederivierung der Mauspopulation auf IVCs umgestellt wurde, wurden die nachfolgend verwendeten Sentinels wie zuvor auf Virusausscheidung im Kot und Serokonversion getestet.

2.2.1. MNV

Bereits ab der ersten Gabe von gebrauchter Einstreu war MNV intermittierend über den gesamten Untersuchungszeitraum bei allen Sentinels im Kot nachweisbar. Aber nur zwei von zehn Sentinels in zwei von fünf Räumen waren in Woche 13 serologisch positiv für MNV.

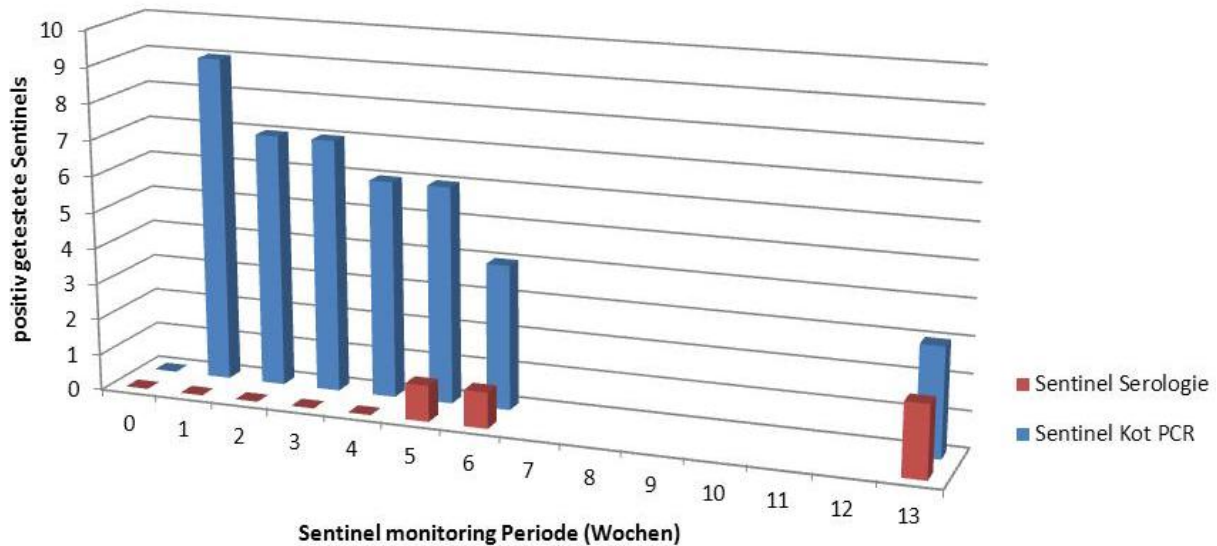


Abbildung 17: MNV Übertragung auf Einstreusentinels in fünf Tierräumen (6096 und 6098-6101) mit IVCs, n=10; 2 Sentinels pro Tierraum

Im Gegensatz zur offenen Haltung fanden wir hier bis auf zwei Ausnahmen keine Serokonversion, obwohl das Virus über längere Zeiträume im Sentinelkot nachweisbar war.

2.2.2. MHV

Die Infektionsdynamik ähnelte der in offenen Käfigen. Die Sentinels schieden zunächst für ein bis zwei Wochen Virus im Kot aus, serokonvertierten und die Ausscheidungsphase endete. Es infizierten sich nur fünf von zehn Sentinels in drei von fünf untersuchten Räumen. Der Zeitpunkt der Infektion erstreckte sich zwischen Woche 1 und Woche 8 (Abbildung 18).

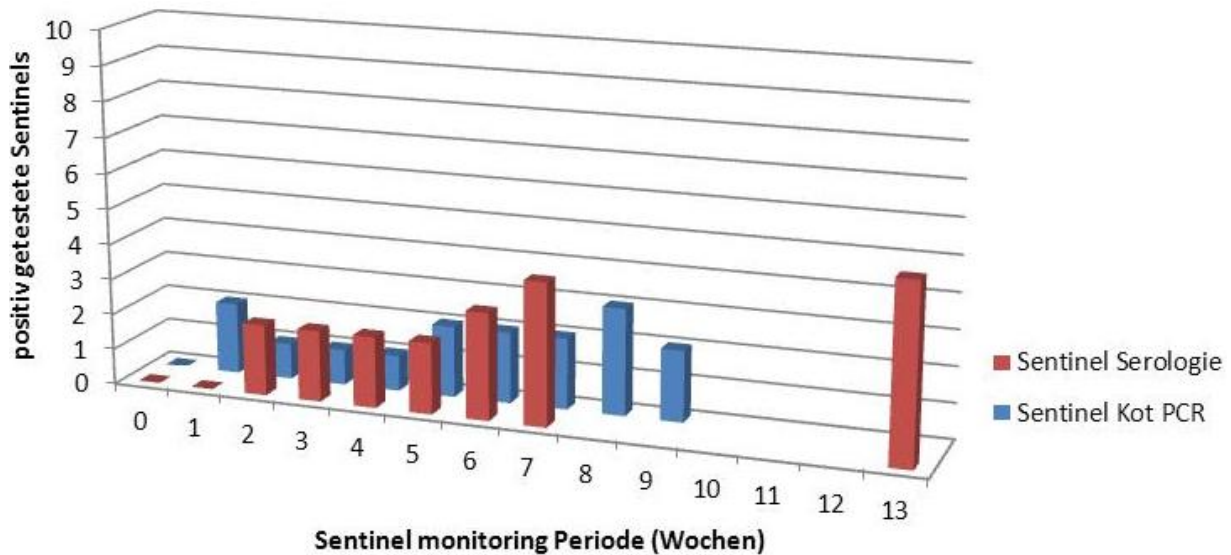


Abbildung 18: MHV Übertragung auf Einstreusentinelns in fünf Tierräumen (6096 und 6098-6101) mit IVCs, n=10; 2 Sentinels pro Tierraum

Im Unterschied zur offenen Haltung infizierten sich im IVC insgesamt weniger Sentinels. Der Infektionszeitpunkt verschob sich nach hinten.

2.3. Hygienemonitoring durch PCR Untersuchung von IVC Abluftstaub

In jedem Tierraum gibt es zwei IVC Lüftereinheiten, die mit je einem Zu- und Abluftvorfilter, welche die Be- und Entlüftung der IVC Regals sicherstellen, ausgestattet sind. Es sind entweder ein Regal oder zwei gekoppelte Regale mit der Lüftereinheit verbunden (Abbildung 19). Ein IVC Abluftvorfilter filtert also die gesamte Abluft der Regale einer Raumseite, ein IVC Zuluftvorfilter einen Teil der Zuluft des Raumes. Durch PCR Untersuchung von Abluftvorfiltern lassen sich auf Abluftebene Rückschlüsse über den hygienischen Status der Regale einer Raumseite ziehen.

Die Veränderung wurde über 6 Monate (Dezember 2010 bis Juni 2011) verfolgt. IVC Abluftvorfilter wurden im Routinebetrieb alle 3 Wochen gewechselt. Die Filter wurden wie bereits beschrieben behandelt, um mittels RT-qPCR Virus aus dem Staub nachweisen zu können.

Pro Ab- bzw. Zuluftvorfilter wurde eine RNA Präparation durchgeführt. Aus jeder RNA Präparation wurden Doppelansätze in der RT-qPCR untersucht. Sobald ein Ansatz in der PCR positiv war, wurde die gesamte Raumseite als positiv angesehen. Bei allen folgenden IVC Luftfilter PCR Untersuchungen wurde der einzelne Tierraum als hygienische Einheit definiert.

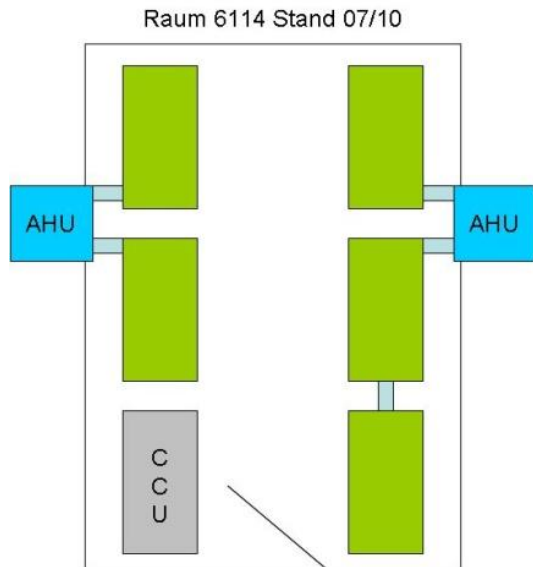


Abbildung 19: Standard Mausraum im KTH mit IVCs. AHU („air handling unit“) IVC Lüfter Einheit, CCU(“ cage changing unit“) Käfigwechselstation

Aufgrund dessen und wegen der besseren Übersichtlichkeit, wird in den folgenden Ergebnistabellen nicht zwischen rechter und linker Raumseite unterschieden (Tabelle 24). Außerdem wurden die Räume entsprechend der dort vorherrschenden Kolonieseroprävalenz in Gruppen eingeteilt.

Tabelle 24: Tabellenlegende zu IVC Luftvorfilteruntersuchung

+/+	beide Raumseiten positiv
+/-	eine Raumseite positiv
+	nur eine Raumseite untersucht; positiv
-	nur eine Raumseite untersucht; negativ
-/-	beide Raumseiten negativ
nd	nicht durchgeführt

2.3.1. Abluftfilter im Vergleich zur Seroprävalenz für MNV

In den MNV freien Räumen, inklusive dem durch Embryotransfer sanierten Raum 6113 waren alle Stäube negativ.

In den Räumen mit mittlerer Prävalenz waren die Stäube in den ersten drei Monaten zunächst positiv, in den letzten drei Monaten entweder negativ oder uneinheitlich.

Eine Ausnahme stellt Raum 6115 dar. Hier wurde die Population zwischenzeitlich ausgetauscht und der Raum war längere Zeit nur gering besetzt (Tabelle 25).

**Tabelle 25: Untersuchung von IVC Abluftvorfiltern auf MNV im Vergleich zur MNV
Kolonieseroprävalenz in demselben Raum**

Raum	12/10	01/11	02/11	03/11	04/11	05/11	06/11	07/11	Seroprävalenz
6113	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	nd
6112	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0%
6111	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0%
6097	-	nd	-	-	-	-	-	-	0%
6094	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	0-5%
6095	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	13-20%
6096	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	26-0%
6098	+/-	nd	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	100%
6099	+/-	+/-	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/-	nd
6100	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	nd
6101	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	nd
6114	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+	94-63%
6115	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	+	+	+	96%

weiße Schrift: Kontamination in der RNA Aufreinigungskontrolle, Raum 6113 hygienisch saniert

2.3.2. Abluftfilter im Vergleich zur Seroprävalenz für MHV

In nahezu allen Tierräumen, außer Raum 6115 und einem positiven Ergebnis in Raum 6113 im Juli 2011, fanden sich wiederholt intermittierend positive Ergebnisse in den Abluftvorfiltern. Die Seroprävalenz in der Kolonie ging in allen Räumen tendenziell zurück (Tabelle 26).

Tabelle 26: Untersuchung von IVC Abluftfiltern auf MHV im Vergleich zur MHV Kolonieseroprävalenz in demselben Raum

Raum	12/10	01/11	02/11	03/11	04/11	05/11	06/11	07/11	Seroprävalenz
6113	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	nd
6114	-/-	+/+	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	0%
6115	-/-	-/-	-/-	-	-	-	-	-	0%
6112	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	40%
6111	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-	nd
6094	+/+	+/-	+/-	+/-	-/-	+/+	-/-	+/-	23-0%
6095	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	65-0%
6096	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/+	-/-	+/-	30-0%
6097	+	nd	+	+	+	-	+	-	75-10%
6098	+/-	nd	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	21%
6099	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	nd
6100	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	-/-	-/-	nd
6101	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-	nd

weiße Schrift: Kontamination in der RNA Aufreinigungskontrolle, Raum 6113 hygienisch saniert

2.3.3. Einfluss der Expositionsdauer

Nach der Umstellung auf IVCs wurden alle Vorfilter zum ersten Mal am 01.12.2010 gewechselt und auf Vorhandensein viraler RNA untersucht. Die Vorfilter sind zu diesem Zeitpunkt zwischen 23 und 175 Tagen in Betrieb gewesen. Der nächste Wechsel erfolgte 22 bis 35 Tage später. Nach diesem Zeitpunkt wurden Abluftvorfilter nach Herstellervorgaben alle 21 Tage gewechselt und untersucht.

2.3.3.1. MNV

Wie in Tabelle 27 ersichtlich gab es im Dezember 2010 positive und negative Ergebnisse in den Tierräumen unabhängig von der Dauer, in der die Filter der Abluft ausgesetzt waren (23-175 Tage). Im Februar 2011 nach 22-35 Expositionstagen fanden sich deckungsgleiche Ergebnisse, was sich im März 2011 bis auf eine Ausnahme (Raum 6115) bestätigte.

Eine Expositionsdauer von 20 Tagen scheint also unter Feldbedingungen ausreichend zu sein, um MNV in den Abluftvorfiltern MNV infizierter Räume detektieren zu können.

Tabelle 27: MNV, Einfluss der Abluftvorfilter Expositionsdauer

MNV	12/10		02/11		03/11		04/11	
	Tage	Filter PCR	Tage	Filter PCR	Tage	Filter PCR	Tage	Filter PCR
6113	140	-/-	35	-/-	21	-/-	21	-/-
6114	175	+/+	35	+/-	21	+/-	21	+/+
6115	170	+/+	35	+/-	21	-/-	21	-
6112	104	-/-	35	-/-	21	-/-	21	-/-
6111	106	-/-	27	-/-	22	-/-	22	-/-
6094	71	-/-	27	-/-	22	-/-	22	-/-
6095	69	+/-	27	+/-	22	+/-	22	-/-
6096	64	+/+	27	+/-	22	+/-	22	-/-
6097	64	-/-	27	nd	22	-/-	22	-/-
6098	43	+/-	22	nd	20	+/+	20	+/-
6099	23	+/-	22	+/-	20	+/+	20	+/+
6100	28	+/+	22	+/+	20	+/+	20	+/+
6101	41	+/-	22	+/+	20	+/-	20	+/+

Raum 6113 hygienisch saniert

2.3.3.2. MHV

Auch hier gibt es positive und negative Ergebnisse, unabhängig von der Expositionsdauer. Die Ergebnisse sind weniger einheitlich als bei MNV. So war der im März untersuchte Abluftfilter in Raum 6111 nach 22 Tagen Expositionsdauer positiv; der Abluftfilter im Dezember war, obwohl er deutlich länger (106 Tage) der Abluft ausgesetzt war, negativ (Tabelle 28).

Tabelle 28: MHV Einfluss der Abluftvorfilter Expositionsdauer

MHV Raum	12/10		02/11		03/11		04/11	
	Tage	Filter PCR	Tage	Filter PCR	Tage	Filter PCR	Tage	Filter PCR
6113	140	-/-	35	-/-	21	-/-	21	-/-
6114	175	-/-	35	+/+	21	+/-	21	-/-
6115	170	-/-	35	-/-	21	-/-	21	-
6112	104	+/-	35	+/-	21	+/-	21	+/+
6111	106	-/-	27	-/-	22	+/+	22	-/-
6094	71	+/+	27	+/-	22	+/-	22	+/-
6095	69	+/-	27	+/+	22	+/-	22	+/+
6096	64	++/--	27	+/-	22	+/-	22	+/-
6097	64	+	27	nd	22	+	22	+
6098	43	+/-	22	nd	20	-/-	20	+/--
6099	23	+/-	22	+/-	20	+/-	20	-/-
6100	28	+/-	22	-/-	20	+/-	20	-/-
6101	41	-/-	22	+/+	20	+/+	20	+/+

Raum 6113 hygienisch saniert

Auch hier scheinen 20 Tage Abluftfilterexposition auszureichen, um die Nachweisgrenze für MHV RNA aus infizierten Regalen zu erreichen.

2.4. Raumlufüberwachung in Tierräumen mit IVCs durch Untersuchung von IVC Zuluftfiltern und Luftsentinels

Da es in der Barriere aufgrund einer unzureichenden Autoklavenkapazität nicht möglich ist, komplett verschlossene neue und gebrauchte Käfige in die Barriere bzw. aus der Barriere heraus zu schleusen, müssen gebrauchte Käfige offen im Tierraum gestapelt werden, während der eigentliche Umsetzvorgang in Sicherheitswerkbänken stattfindet. Dadurch wird die Raumluf potenziell mit Viren belastet. Die Untersuchung von Raumluf ist damit ein weiterer Ansatz zur Hygieneüberwachung.

Ein Standardtierraum im Kleintierhaus hat ein Luftvolumen von ca. 60m³. Bei 15 Raumlufwechseln pro Stunde werden 900m³ Luft in der Stunde im Raum umgesetzt. Jede IVC Lüfter Einheit entnimmt dem Tierraum 190 m³ Raumluf pro Stunde. Bei zwei Lüfter Einheiten pro Tierraum sind das 380 m³ Luft in der Stunde. Es werden also circa 42% der im Tierraum in der Stunde vorhandenen Raumluf vom IVC System entnommen und durch die IVC Zuluftvorfilter angesaugt. Diese Filter wurden mit PCR auf virale RNA untersucht. Zusätzlich wurden Luftsentinels vor den Raumabluftöffnungen positioniert und wöchentlich

auf Virusausscheidung im Kot und Serokonversion untersucht.

2.4.1. MHV und MNV in IVC Zuluftvorfiltern

Im Dezember 2010 wurden alle IVC Zuluftvorfilter ausgetauscht und mittels PCR auf MHV und MNV untersucht. Sie haben zu diesem Zeitpunkt, entsprechend der verschiedenen Umrüstungszeitpunkte, unterschiedlich lange Raumluft gefiltert und sind damit unterschiedlich lange der Raumluft ausgesetzt worden. Alle Zuluftvorfilter waren MHV negativ. MNV war in allen Räumen von Nutzer B, sowie in jeweils einem Raum der übrigen Nutzer zu finden.

Im Juli 2011 wurden alle IVC Zuluftvorfilter nach 238 Tagen Expositionszeit erneut ausgetauscht. Hier waren in allen Räumen von Nutzer A, zwei Räumen von Nutzer B und einem Raum von Nutzer C MHV nachzuweisen. MNV fand sich in allen Räumen von Nutzer B, sowie den nicht sanierten Räumen von Nutzer E (Tabelle 29). Das bedeutet, dass die Raumluft beim Käfigwechsel mit Viren kontaminiert wird.

Tabelle 29: Raumluftüberwachung: IVC Zuluftvorfilter PCR Ergebnisse im Dezember 2010 und Juli 2011 nach unterschiedlich langen Expositionszeiten.

Raum	Nutzer	12/10		07/11			
		Tage	Zuluftfilter	Tage	Zuluftfilter		
			MHV	MNV		MHV	MNV
6094	A	71	-/-	-/-	238	+/+	-/-
6095	A	69	-/-	+/-	238	+/-	-/-
6096	A	64	-/-	-/-	238	+/+	-/-
6098	B	43	-/-	+/-	238	+/-	+/+
6099	B	23	-/-	+/-	238	-/-	+/+
6100	B	28	-/-	+/-	238	-/-	+/+
6101	B	41	-/-	+/-	238	+/-	+/+
6111	C	106	-/-	+/-	238	-/-	-/-
6112	C	104	-/-	-/-	238	+/+	-/-
6113	E	140	-/-	-/-	238	-/-	-/-
6114	E	175	-/-	+/+	238	-/-	+/-
6115	E	170	-/-	-	238	-/-	+

In rot markierten Räumen waren zwischen Februar und Mai 2011 (KW8-20) Raumluftsentinels eingesetzt, Raum 6113 hygienisch saniert

2.4.2. Raumluftsentinels

Es wurden je zwei Luftsentinels in einem IVC Käfig bei dem der Notfallfilter entfernt wurde in den Räumen 6095, 6098 und 6114 eingesetzt. Der Käfig wurde auf einem Regal im Raum

vor einer Raumabluftöffnung positioniert, um die Raumluftexposition so groß wie möglich zu gestalten (Abbildung 6).

Die Sentinels blieben 16 Wochen (vom 24.02-15.06.11) im Tierraum. Zu mehreren Zeitpunkten wurde eine Sammelkotprobe auf MHV und MNV, sowie in Woche 0, 7, 12 und 16 jeweils Einzelerumproben serologisch untersucht.

In Woche 6 waren die Sammelkotproben der Luftsentinels in Raum 6095 und 6098 für MHV, in Woche 11 für MNV gering positiv (eine von zwei in der PCR untersuchten Proben aus der gleichen RNA Präparation).

Alle Luftsentinels blieben über den gesamten Zeitraum serologisch negativ für MHV und MNV. Das heißt, dass die beim Käfigwechsel freigesetzte Virusmenge unter den gegebenen Expositionsbedingungen nicht ausreicht, um Sentinels zu infizieren.

3. Veränderung der MHV und MNV Seroprävalenz in der Mauskolonie

Daten zur Seroprävalenz in der Kolonie wurden je nach Verfügbarkeit von Tieren unterschiedlich gewonnen.

Die Annahme für die statistische Festlegung der Stichprobengröße war, dass die Infektionsprävalenz von MHV und MNV zu Beginn der Umstellung auf IVC Haltung bei 40% liegt und sich dann 0% annähert. Die notwendige Stichprobengröße, um einen tatsächlichen Unterschied mit einer statistischen Teststärke von 80% zu entdecken, wurde mit der „Standardformel für Fallzahlfestlegung eines dichotomen Ereignisses“ berechnet. Es mussten mindestens 20 Tiere pro Zeitpunkt und Raum getestet werden. Da es Abhängigkeiten zwischen Wurfgeschwistern und Käfiggenossen gab, sollten zusätzlich 15-20% mehr Tiere untersucht werden.

In den Räumen 6094-6096 wurden überzählige Tiere über 10 Wochen zur postmortalen Blutentnahme zur Verfügung gestellt. Im Dezember und Mai wurden je 20 Tiere pro Raum auf MHV und MNV serologisch untersucht. Bei Käfigen mit ein bis drei Tieren wurde ein Tier, bei Käfigen mit vier bis sechs Tieren zwei Tiere je Käfig untersucht.

Im Raum 6097 wurden im Januar 2010 und Juni 2011 je 20 Tiere aus verschiedenen Käfigen untersucht. Im Juni wurden diese Tiere nur auf MHV Serokonversion untersucht.

Angaben zum Raum 6114 beziehen sich auf alle 12-16 Wochen alten Tiere zum jeweiligen Stichprobenzeitpunkt (siehe Abschnitt: V.4).

In den Räumen 6098-6101 konnte nur eine Stichprobe von 20 Tieren im Januar 2011 untersucht werden (Tabelle 30 und Tabelle 31).

3.1. MNV Seroprävalenz in der Kolonie

Tabelle 30: Übersicht der MNV Seroprävalenz in der Kolonie von Dezember 2010 bis Mai 2011

Raum	Nutzer	12/10	01/11	03/11	04/11	05/11
6094	A	4%	0%	5%	0%	0%
6095	A	13%	nd	nd	nd	20%
6096	A	26%	nd	nd	nd	0%
6097	D	nd	0%	nd	nd	nd
6098	B	nd	100%	nd	nd	nd
6099	B	nd	nd	nd	nd	nd
6100	B	nd	nd	nd	nd	nd
6101	B	nd	nd	nd	nd	nd
6111	C	nd	nd	nd	nd	nd
6112	C	nd	nd	0%	nd	nd
6113	E	nd	nd	nd	nd	nd
6114	E	94%	77%/63%	52%	63%	67%
6115	E	nd	nd	nd	nd	96%

grau= in offenen Käfigen vor der Umstellung geboren. Raum 6114 alle 12-16 Wochen alten Mäuse (siehe 4.2)

Grundsätzlich lassen sich drei Raumgruppen unterscheiden:

1. Räume ohne bzw. mit niedriger Seroprävalenz (0-5%)
2. Räume mit mittlere Seroprävalenz (13-26%)
3. Räume mit hoher Seroprävalenz (63-100%)

3.2. MHV Seroprävalenz in der Kolonie

Tabelle 31: Übersicht der MHV Seroprävalenz in der Kolonie von Dezember 2010 bis Juni 2011

Raum	Nutzer	12/10	01/11	03/11	04/11	05/11	06/11
6094	A	23%	0%	26%	0%	0%	nd
6095	A	65%	nd	nd	nd	0%	nd
6096	A	30%	nd	nd	nd	0%	nd
6097	D	nd	75%	nd	nd	nd	10%
6098	B	nd	21%	nd	nd	nd	nd
6099	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6100	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6101	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6111	C	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6112	C	nd	nd	40%	nd	nd	nd
6113	E	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6114	E	0%	0%/0%	0%	nd	nd	nd
6115	E	nd	nd	nd	nd	0%	nd

grau= in offenen Käfigen vor der Umstellung geboren. Raum 6114: alle 12-16 Wochen alten Mäuse (siehe 4.1)

Grundsätzlich lassen sich wenn man die Testzeitpunkte von Dezember 2010 bis März 2011 betrachtet zwei Raumgruppen unterscheiden:

1. Räume ohne bzw. mit niedriger Seroprävalenz (0%)
2. Räume mit mittlerer Seroprävalenz (21-75%)
3. An den späteren Zeitpunkten war die Prävalenz 0%

4. Entwicklung der MHV und MNV Seroprävalenz bei 12-16 Wochen alten Mäusen eines Tierraumes nach der Umstellung von offener auf IVC Haltung

4.1. Seroprävalenz für MHV in Raum 6114

Um den Einfluss der Haltungsumstellung von offenen Käfigen zu IVC Haltung auf die MHV

Prävalenz zu beurteilen, wurden im bereits im Juni 2010 umgerüsteten Raum 6114 von August bis März monatlich alle 12-16 Wochen alten Tiere serologisch mittels ELISA auf MHV untersucht. In diesem Alter persistieren keine maternalen Antikörper mehr, die bis zu einem Alter von 10 Wochen noch vorhanden sein können [60], weshalb eine Serokonversion im Alter über 12 Wochen eine durchgemachte MHV Infektion anzeigt. Positive Ergebnisse wurden mittels IFA (Immunfluoreszenzassay zur Bestimmung von Antikörpern) in einem Referenzlabor nachgetestet. War das ELISA Ergebnis positiv und das IFA Ergebnis negativ, wird die Serumprobe als „uneindeutig“ gewertet.

Es handelte sich bei den Mäusen in diesem Raum um verschiedene genetisch modifizierte Linien auf C57BL/6 Hintergrund, welche zur Zucht und in Experimenten genutzt wurden. Es fand keine Zuchtunterbrechung statt.

In den im August und September untersuchten Mäusen, die in offenen Käfigen geboren wurden, fanden sich positive Befunde. Alle später getesteten Tiere, die im IVC geboren wurden, waren negativ (Abbildung 20).

Die Umstellung auf IVC Haltung führte zu einem „Ausbrennen“ der MHV Infektion.

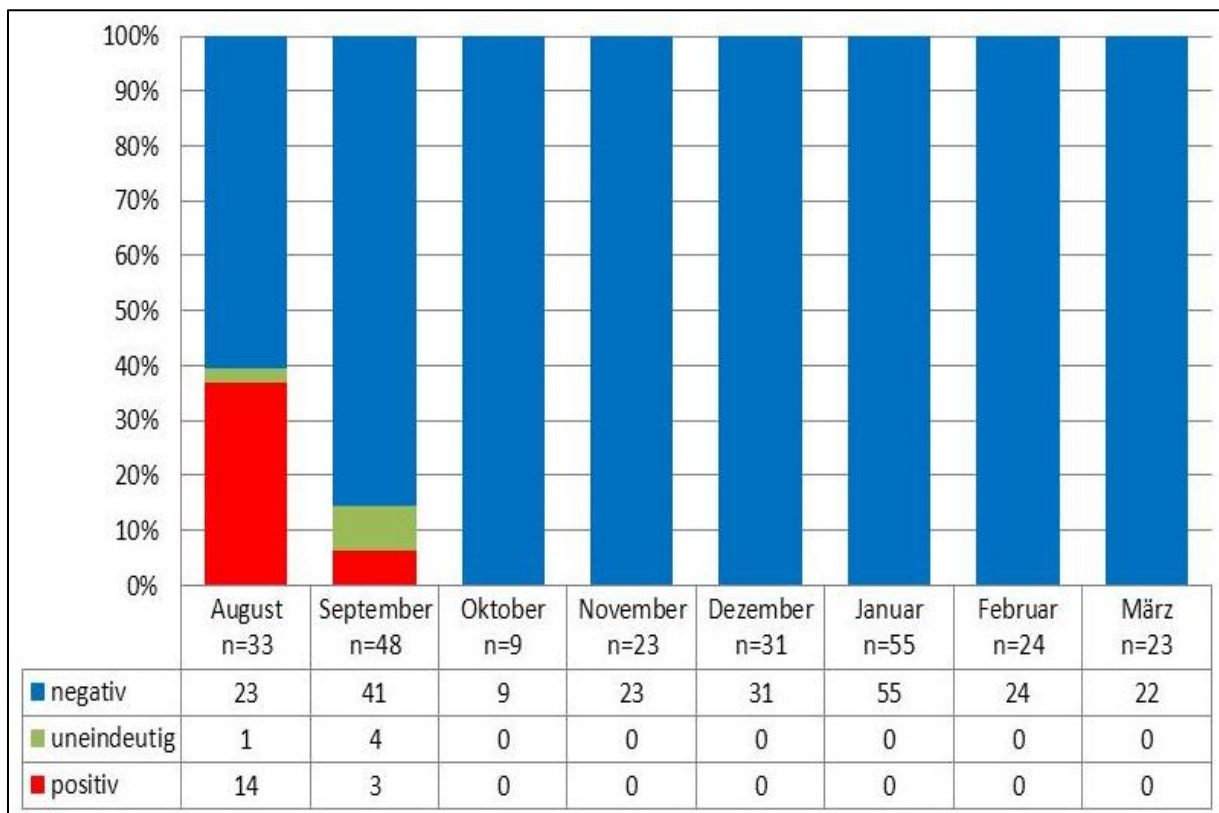


Abbildung 20: MHV Serologie bei 12-16 Wochen alten Mäusen im Raum 6114

4.2. Seroprävalenz für MNV in Raum 6114

Um auch einen Überblick über die Entwicklung der MNV Prävalenz zu erhalten wurden von Dezember bis Mai alle Tiere in dieser Altersgruppe auch auf MNV untersucht. Die Prävalenz lag zunächst bei über 90% und begann sich dann zwischen Februar und Mai zwischen 50 und 70% einzupendeln. Auffällig ist die hohe Anzahl an uneindeutigen Ergebnissen. Hier wurde zunächst beim ELISA ein positives Ergebnis, beim bestätigenden IFA ein negatives Ergebnis erzielt (Abbildung 21).

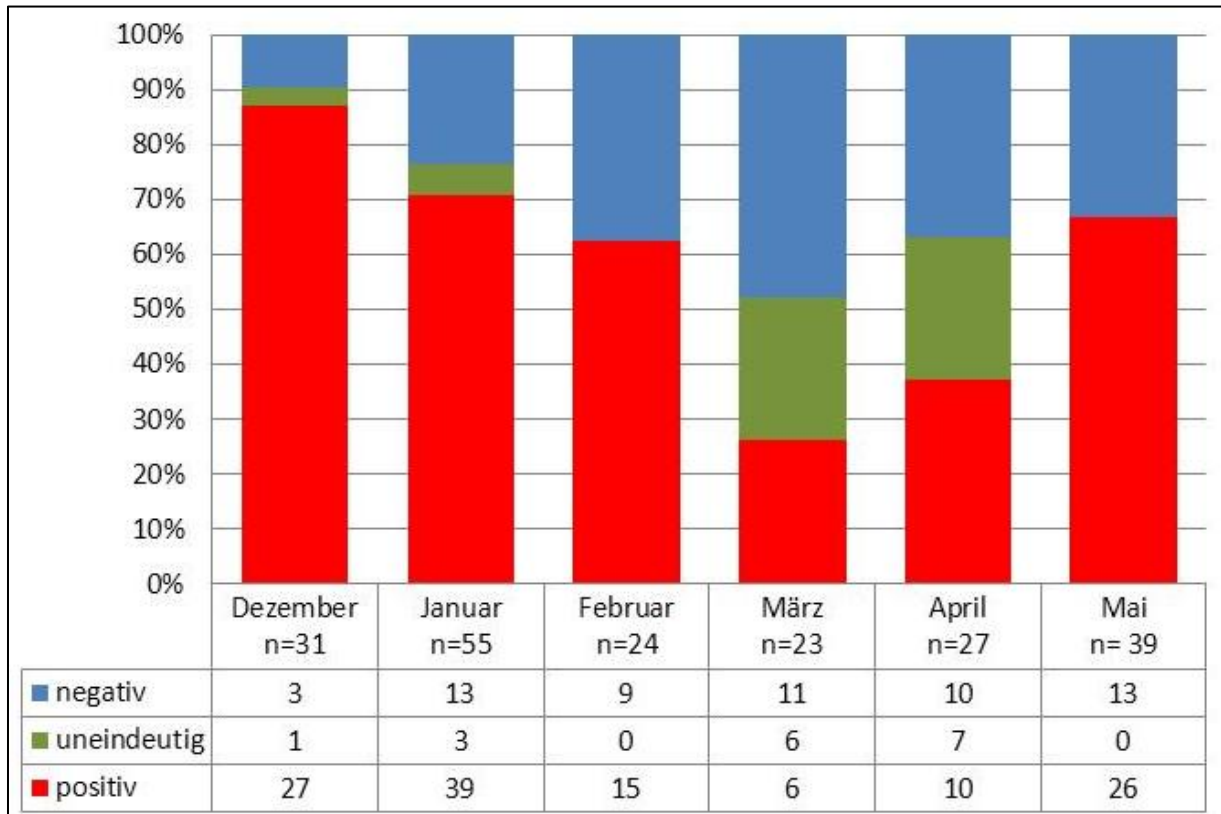


Abbildung 21: MNV Serologie bei 12-16 Wochen alten Mäusen in Raum 6114

Die Umstellung auf IVC Haltung führte zur Reduktion, aber nicht zum Abklingen der MNV Infektion in der Mauspopulation.

5. Validierung des Nachweises von MNV im IVC Abluftstaub versus Einstreusentinel im Infektionsexperiment

Um schließlich genauere Angaben zur Sensitivität des Pathogennachweises aus IVC Abluft im Vergleich zur Standardmethode Einstreusentinel zu erhalten, wurde ein Infektionsexperiment mit einer definierten Anzahl MNV infizierter Crl:CD1(Icr)/Dcm Auszuchtmäuse durchgeführt. Es stand ein Virusisolat aus der HMGU Tierhaltung in sehr niedriger Passagenanzahl (MNV Neuherberg U1), (Passage 3) zur Verfügung [27], sodass nur geringe Veränderungen des Feldvirus durch Passagierung in der Zellkultur zu erwarten waren und die künstliche Infektion der Feldinfektion sehr nah kommt.

Einstreusentinelns wurden wöchentlich auf Virusausscheidung im Kot und auf Serokonversion, IVC Abluftvorfilter auf Vorhandensein viraler Nukleinsäuren untersucht.

5.1. Versuchsaufbau und Ablauf

5.1.1. Mäuse

Zunächst wurden 2 ♀ Crl:CD1 über eine Magensonde mit jeweils 100µl 10^{6,5} TCID₅₀/ml MNV Neuherberg U1 oral infiziert und drei weitere nicht infizierte dazugesetzt. Die Manifestation der Infektion wurde durch Kotproben PCR und serologische Untersuchung bestätigt. Nach dem Abklingen der akuten Ausscheidungsphase wurde ein Käfig mit fünf sicher MNV ausscheidenden Mäusen in ein gereinigtes, autoklaviertes IVC Regal eingesetzt. Gleichzeitig wurden zwei sechs Wochen alte Crl:CD1 Männchen als Einstreusentinelns in Einzelhaltung in das Regal eingesetzt, welche nun wöchentlich gebrauchte Einstreu aus allen Käfigen des IVC Regals erhielten (Sentinel A&B).

Die übrigen freien Käfigplätze wurden mit MNV freien Mäusen verschiedener immunkompetenter Linien auf C57BL/6 Hintergrund aus dem sanierten Raum 6113 aufgefüllt (Abbildung 22). Zu Beginn des Experiments und am Ende des Experiments wurden spaltenweise (IVC Regal Spalte A-G) Sammelkotproben auf MNV untersucht. Am Ende des Experiments war leider ein Käfig der ursprünglich nicht infizierten Kolonietiere MNV PCR positiv. Unter der Annahme, dass die Box im schlimmsten Fall schon seit dem Einsatz der ersten MNV infizierten Box infiziert war, sind die dann vorherrschenden Prävalenzraten in Tabelle 32 zusätzlich in Klammern angegeben.

Die Einstreusentinelns wurden wöchentlich auf MNV Ausscheidung im Kot und auf Serokonversion untersucht. Zusätzlich wurde an mehreren Zeitpunkten eine Sammelkotprobe aus der gebrauchten Sammeleinstreu der Sentinels auf MNV untersucht.

Im weiteren Verlauf des Experimentes wurde die Anzahl infizierter Tiere in zwei weiteren Schritten gesteigert um die Erhöhung der MNV Prävalenzrate in der Kolonie zu simulieren. Im Zuge dessen wurden bei jedem Schritt je zwei neue Einstreusentinelns (zuerst C&D, dann E&F) in das Regal eingesetzt (Tabelle 32).

Tabelle 32: Übersicht der MNV Prävalenz in Bezug auf die absolute Anzahl infizierter Mäuse und die Anzahl infizierter Käfige.

	Anzahl infizierter Käfige	Prävalenz in Bezug auf infizierte Käfige	Anzahl infizierter Mäuse	Prävalenz in Bezug auf infizierte Mäuse	Anzahl Mäuse im Gesamtsystem
Schritt 1 Abbildung 22	1 (2)	1,6% (3,2%)	5 (10)	2,9% (5,8%)	174
Schritt 2 Abbildung 23	5 (6)	8% (9,5%)	25 (30)	12,7% (15,2%)	198
Schritt 3 Abbildung 24	8 (9)	12,7% (14,3%)	40 (45)	23% (21,2%)	213

In Klammern die Prävalenzraten unter Berücksichtigung des MNV positiven Käfigs mit Kolonietieren, welcher unbeabsichtigt zu einem unbestimmten Zeitpunkt während der Untersuchungsperiode kontaminiert wurde.

					ES A	ES B
			5x MNV+			

Abbildung 22: Schritt 1: 1 Käfig mit 5 MNV infizierten CrI:CD1, ES= Einstreusentinel

			ES C	ES A	ES D	ES B
5x MNV+	5x MNV+	5x MNV+	5x MNV+	5x MNV+		

Abbildung 23: Schritt 2: 5 Käfige mit jeweils 5 MNV infizierten CrI:CD1, ES= Einstreusentinel

			ES E	ES A	ES F	ES D
5x MNV+	5x MNV+	5x MNV+	5x MNV+	5x MNV+	5x MNV+	5x MNV+
5x MNV+	5x MNV+					

Abbildung 24: Schritt 3: 8 Käfige mit jeweils 5 MNV infizierten CrI:CD1, ES= Einstreusentinel

5.1.2. IVC Abluftstaubuntersuchung

Um häufiger Staubproben untersuchen zu können, wurden IVC Abluftfilter mit Gazefilter bestückt und wöchentlich auf MNV untersucht. An mehreren Zeitpunkten wurden herausgekratzte Staubproben aus dem unteren Abluftrohr gewonnen. In Woche 18 wurden zu den 25 bereits infizierten Mäusen 15 weitere dazugesetzt und von 5 auf 8 Käfige aufgeteilt. In dieser Woche wurde ein Wattetupferabstrich aus dem Abluftrohr untersucht, und der Schwerkraftstaubsammler installiert. Aus diesem wurde in Woche 20 und 21 ebenfalls ein Wattetupferabstrich untersucht.

5.2. Ergebnisse

Eine Übersicht über alle Ergebnisse der Untersuchung gibt

Tabelle 33. Zu Beginn waren alle Käfige der nicht infizierten Kolonie MNV negativ. In Woche 21, am Ende des Experiments, war ein Käfig MNV positiv.

5.2.1. MNV infizierte Tiere

Die fünf initial eingesetzten Mäuse (Schritt 1) schieden in Woche 1 bis 7 zuverlässig MNV im Kot aus. In Woche 7 (Schritt 2) wurden diese Mäuse in 5 Käfige aufgeteilt und je 4 naive Crl:CD1 dazu gesetzt. Von diesen war in Woche 8 bei 23 von 25 Mäusen MNV im Kot nachweisbar. In Woche 9 stagnierte die Ausscheidung in 2 von 5 Käfigen. Um zukünftig sicher infizierte Käfige zu haben, wurden die Mausgruppen neu zusammengestellt. Von Woche 10 bis 18 war bei allen Mäusen, bis auf wenige Ausnahmen bei denen sporadisch ein negatives Ergebnis vorlag, MNV im Kot nachweisbar. In Woche 18 wurden die 25 bereits infizierten Mäuse in sieben Dreiergruppen und eine Vierergruppe auf acht Käfigen aufgeteilt. Es wurden 15 naive Crl:CD1 dazu gesetzt, um die Anzahl infizierter Mäuse auf 40 in 8 Käfigen zu steigern. 21 von 25 Mäusen waren in Woche 18 MNV seropositiv.

In Woche 19 war bei 28 von 40 Mäusen MNV im Kot nachweisbar (Tabelle 33).

5.2.2. Einstreusentinelns

Die in Woche 0 eingesetzten Sentinels A und B blieben bis Woche 3, also zwei Wochen nach dem Einsetzen der ersten MNV infizierten Käfigs im Kot und serologisch MNV negativ, auch in der Sentineleinstreu war kein MNV nachweisbar. Ab Woche 4 und über den gesamten folgenden Untersuchungszeitraum war MNV intermittierend bei beiden Sentinels im Kot und in der Einstreu detektierbar. Einer von zwei Sentinels serokonvertierte in Woche 14, sechs Wochen nachdem 25 infizierte Tiere in das Regal eingesetzt wurden.

Ähnlich reagierten Sentinel C und D, die erst in Woche 7 (Schritt 2) eingesetzt wurden. Auch

hier war MNV ab Woche 8 intermittierend bei beiden Sentinels im Kot und in der Einstreusammelprobe nachweisbar. Sentinel C serokonvertierte wie Sentinel B in Woche 14. Nach erfolgter Serokonversion war MNV durchgängig über mindestens drei Wochen im Kot von Sentinel B und C nachweisbar. Die beiden seropositiven Sentinels B und C wurden in Woche 18 aus dem System entfernt.

Sentinel E und F, die in Woche 18 mit Schritt 3 eingesetzt wurden, blieben bis Woche 22 bis auf ein schwach positives Ergebnis im Kot von Sentinel F in Woche 21, im Kot und Serum negativ. Einstreuproben wurden nicht untersucht.

5.2.3. Abluftstaubuntersuchung

Über den gesamten Ablauf des Experiments wurden IVC Abluftvorfilter bzw. darauf platzierte Gazestücke wöchentlich auf MNV RNA untersucht. In Woche 10 und 11, drei Wochen nach dem Einsetzen von 25 Tieren, waren leicht positive Ergebnisse zu verzeichnen. Allerdings war die RNA Aufreinigungsnegativkontrolle kontaminiert. Eindeutig wurde MNV in Woche 20 und 21, zwei Wochen nach Beginn von Schritt 3, dem Zeitpunkt an dem mindestens 28 von 40 Mäusen in 8 Käfigen Virus im Kot ausschieden, detektiert.

An mehreren Zeitpunkten wurde auf verschiedene Art und Weise gewonnener Abluftstaub untersucht. In Woche 6 (ein infizierter Käfig) waren 500mg Staub aus dem unteren Abluftrohr negativ. In Woche 16 (5 infizierte Käfige) war ein leicht positives Ergebnis zu messen.

In Woche 18 (5 infizierte Käfige) war ein Wattetupferabstrich aus dem Abluftschlauch leicht positiv.

In Woche 20 war ein Wattetupferabstrich aus dem Schwerkraftstaubsammler deutlich positiv, in der darauffolgenden Woche 21 leicht positiv.

Tabelle 33: Ergebnisse des Infektionsexperiments: Nachweisensitivität von MNV im Abluftstaub und bei Einstreusentinelns

	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15	W16	W17	W18	W19	W20	W21
Anzahl infizierte Tiere	0	0	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	23/25	17/25	21/25	24/25	23/24	25/25	nd	24/25	nd	nd	23/25	28/40	nd	nd
Anzahl infizierte Boxen	0	0	1	1	1	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	8	8	8	8
Kolonie	neg	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1/53
Abluftvorfilter PCR	-	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	+	+	-	-	nd	-	-	-	nd	-	+	+
sonstige Staubproben	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	+	nd	+	+
Sentinel A&B																						
Kot	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	nd	-	+	-
Box				-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+	+/-	nd	nd	nd	-
Serologie							neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg			neg/neg		pos/neg							
Sentinel C&D																						
Kot								-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/+	-	+/-	nd	-	-	-
Box									+/-	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-	+/+	+/-	+	+/-	nd	nd	nd	-
Serologie									neg/neg	neg/neg			neg/neg		pos/neg							
Sentinel E&F																						
Kot																			-/-	-/-	-/-	+/-
Serologie																			neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg

In den blau markierten Wochen wurde der Abluftvorfilter ausgetauscht und mit neuen Gazestücken versehen. In Woche 10 und 11 war die RNA Aufreinigungskontrolle der Staubfilterpräparation kontaminiert. In Woche 21 war ein Käfig aus der nicht MNV infizierten Kolonie MNV Kot PCR positiv. Sonstige Staubproben: 500mg Staub aus dem unteren Abluftrohr (W6& 16), Wattetupferabstrich aus dem Abluftschlauch, welcher bis zu diesem Zeitpunkt an das Regal angeschlossen war (W18), Wattetupferabstrich aus dem Schwerkraftprototyp (W20&21).

6. Sequenzierung und phylogenetische Einordnung eines MNV Virusisolates aus der Tierhaltung

Die Passage 1 des im Infektionsexperiment verwendeten MNV Isolates MNV Neuherberg U1 wurde zur weitere Charakterisierung und phylogenetischen Einordnung mittels Primer Walking (Abbildung 25) sequenziert (Sequenz siehe VIII.4). Die größte Sequenzübereinstimmung war zur Sequenz *murine norovirus GV/CR6/2005/USA, complete genome (EU004676.1)* zu finden (Abbildung 26).

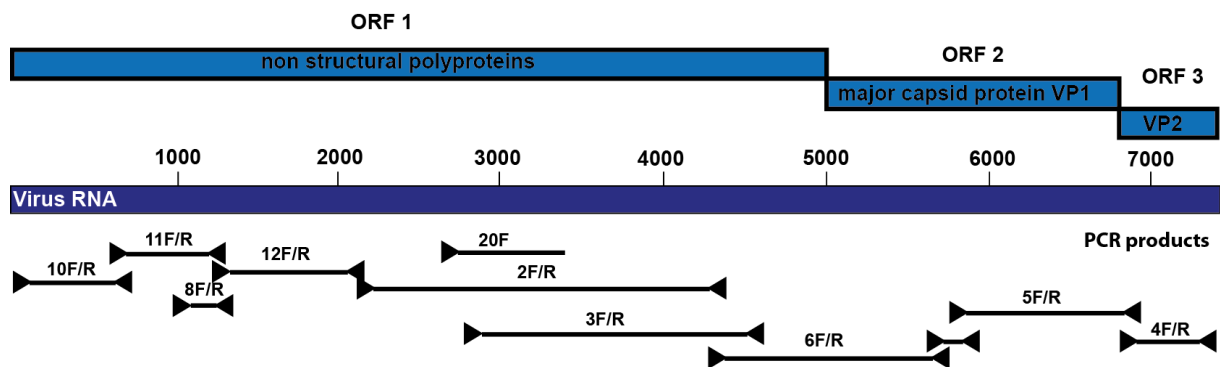


Abbildung 25: Lage der PCR Produkte zur Sequenzierung von MNV Neuherberg U1.

VP1 und 2 = Virusprotein 1 und 2

Ergebnisse

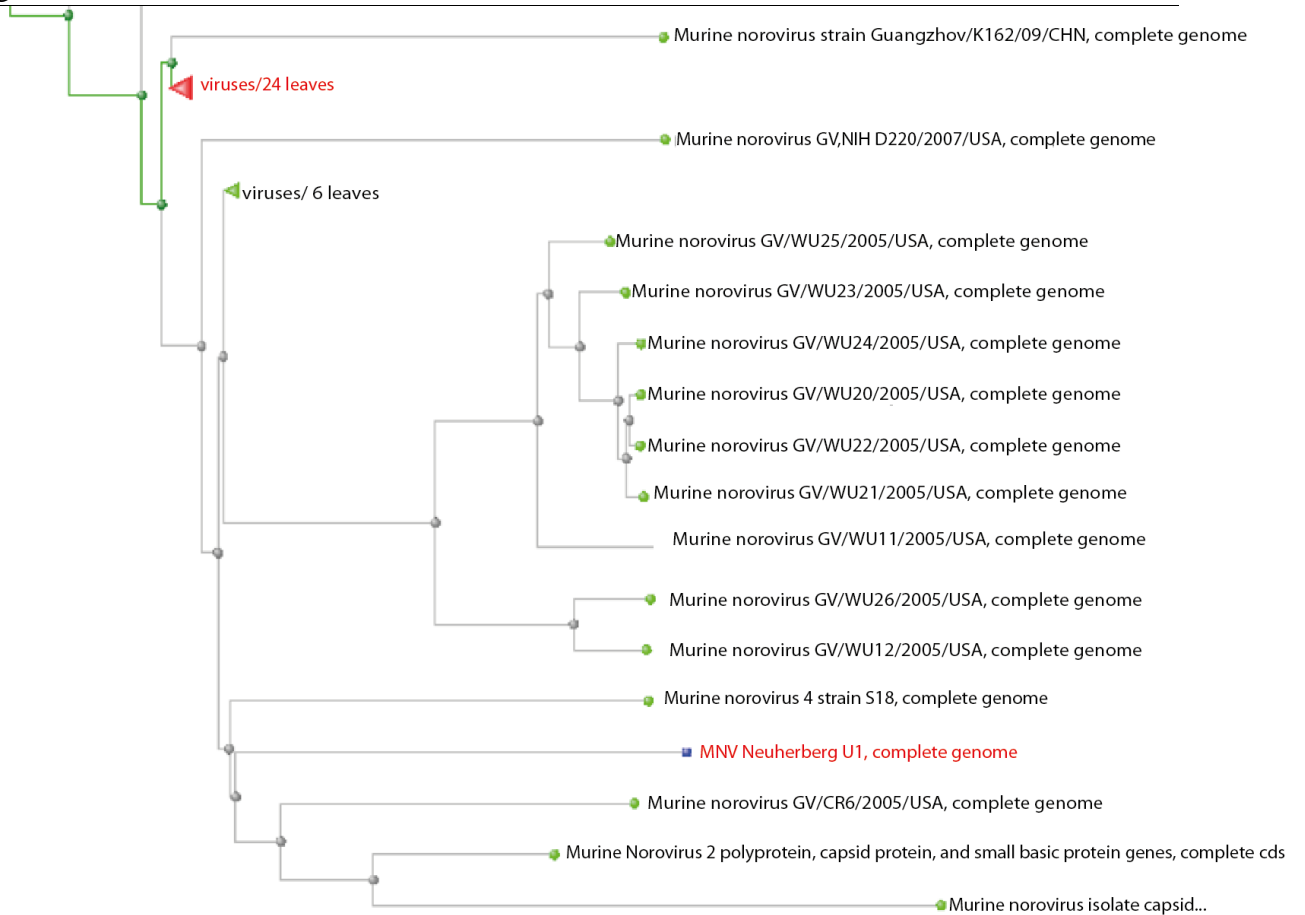


Abbildung 26: Phylogenetischer Stammbaum für MNV Neuherberg U1

NCBI blast tree view; database „nucleotide collection“, Methode: fast minimum evolution, Maximaler Sequenzunterschied 0.75 (Ausschnitt)

VI. DISKUSSION

1. Übertragung und Infektionsdynamik von MNV und MHV bei Einstreusentinelns nach Umstellung von offener auf IVC Haltung

Um einen Überblick über die Infektionsdynamik von Feldviren bei Einstreusentinelns zu bekommen, wurden Sentinels, die im Routinehygienemonitoring eingesetzt waren, exemplarisch in fünf Räumen des Kleintierhauses über den zwölfwöchigen Monitoringzeitraum zunächst in offener Haltung und später in IVCs auf Virusausscheidung im Kot und Serokonversion untersucht. So sollte festgestellt werden, wann und wie viele Sentinels sich infizieren, wie lange die Viren im Kot ausgeschieden werden, wann die Serokonversion erfolgt und ob es dabei Unterschiede zwischen den Haltungssystemen gibt.

1.1. MNV

In offenen Käfigen begannen sieben von zehn Sentinels in Woche 1 bis 5 MNV im Kot auszuschcheiden. Alle Sentinels bei denen MNV im Kot nachweisbar war, serokonvertierten ein bis zwei Wochen nach Beginn der Ausscheidungsphase, die über den gesamten 12 wöchigen Untersuchungszeitraum andauerte (Abbildung 14). Das deckt sich mit den Beobachtungen von Hsu et al., 2006 [65], die MNV Ausscheidung im Kot von Hsd:ICR(CD1) Mäusen über mindestens 8 Wochen nachweisen konnten. Wie bereits von Kraus, 2011 [27] diskutiert gibt es eine nahezu vollständige Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Kot PCR Untersuchung und der finalen serologischen Untersuchung. Beide Methoden sind gleichermaßen zur Detektion von MNV bei Einstreusentinelns in offener Haltung geeignet. Da die Ausscheidungsphase bereits zwei Wochen vor der Serokonversion beginnt, ist die Untersuchung von Kotproben mittels PCR der serologischen Untersuchung in zeitlicher Hinsicht überlegen.

Bei durchgängig seronegativen Sentinels ist zu keinem Zeitpunkt MNV im Kot nachweisbar. Sie sind scheinbar nicht über gebrauchte Einstreu mit infektiösem MNV in Kontakt gekommen. MNV scheint hauptsächlich über infizierten Kot auf Sentinels übertragen zu werden. Aerogene Übertragung scheint keine große Rolle zu spielen, da sich in offener Käfighaltung in der überwachten Kolonie immer mindestens ein Sentinel pro Tierraum infiziert hat, was nahelegt, dass in jedem Tierraum MNV infizierte Kolonietiere vorhanden waren, die aber nur den sie per Kot überwachenden Sentinel, nicht jedoch Sentinels die nur Luftkontakt hatten, infiziert haben.

In IVC Haltung war bei neun von zehn Sentinels bereits ab der ersten Gabe infizierter Einstreu in Woche 1 intermittierend über den gesamten Untersuchungszeitraum MNV im Kot nachweisbar. In Woche 13 waren zwei von zehn Sentinels in fünf Tierräumen MNV seropositiv.

Die Sentinels scheinen sich aufgrund der fehlenden Serokonversion auch nach achtwöchiger Ausscheidungshistorie im Kot, nicht mit MNV infiziert zu haben. Das kann verschiedene Ursachen haben. Möglich ist, dass die Einstreu im IVC durch die intensivere Ventilation trockener ist und MNV dadurch schneller inaktiviert wird. Bei der im Sentinelkot detektierten MNV Nukleinsäure, könnte es sich also um nicht mehr infektiöses „Passagevirus“ oder „Passage-Virus RNA“ handeln, welche vom Sentinel aus der gebrauchten Einstreu der überwachten Kolonie oral aufgenommen wurde und ohne eine Infektion auszulösen wieder im Kot ausgeschieden wird. Für diese Annahme spricht auch, dass in der Sentinelsammeleinstreu bzw. im Kot der Sentinels im MNV Infektionsexperiment, bei dem nachweislich MNV ausscheidende Kolonietiere als Einstreuspender vorhanden waren, wiederholt MNV RNA bei den Sentinels nachweisbar war die aber nie serokonvertierten (

Tabelle 33). Die PCR Untersuchung weist virale Nukleinsäuren nach und gibt keine Information über die Infektiosität des Virus, was für das Hygienemonitoring aber nicht wichtig ist.

Die hier untersuchten Sentinels wurden einzeln gehalten. Bessere Ergebnisse bringt die Gruppenhaltung von Sentinels, weil die Infektionswahrscheinlichkeit durch gegenseitigen Kontakt der Sentinels untereinander erhöht wird. In einer Feldstudie zur Übertragung von MNV Feldvirus auf Einstreusentinels (Tac:SW) in IVCs und Haltung in Filtertopfkäfigen gelang der Virusnachweis im Kot (PCR) und Serum der Sentinels und der Kolonietiere. Sentinels wurden in 5er Gruppen auf gebrauchter Einstreu von jeweils 34 Käfigen gehalten. Alle 6 Wochen wurde der jeweils älteste Sentinel untersucht und durch einen neuen vier bis sechs Wochen alten ersetzt [29].

1.2. MHV

In offener Haltung begannen sechs von zehn Sentinels bereits in Woche 1 Virus im Kot auszuschcheiden. Weitere folgten wenige Wochen später. Die Ausscheidungsphase endete mit der Serokonversion ein bis zwei Wochen nach Beginn der Kotausscheidungsphase. Am Ende des Untersuchungszeitraumes waren alle Sentinels seropositiv. Zu diesem Zeitpunkt war bei keinem Sentinel MHV im Kot nachweisbar. Sentinels infizieren sich also sehr schnell, wahrscheinlich schon vor der ersten Gabe gebrauchter Einstreu über Viruspartikel in der Luft.

In IVCs ähnelt die Infektionsdynamik beim einzelnen Sentinel der in offener Haltung. Es ist eine kurze Ausscheidungsphase und ein Ende des Ausscheidens mit der Serokonversion zu beobachten (Tabelle 35). Am Ende des Untersuchungszeitraumes waren nur fünf von zehn Sentinels seropositiv. In drei Tierräumen, in denen die Sentinels in den letzten zwei Jahren durchgängig seropositiv waren, wurde keine Infektion angezeigt. Das ist zum einen wahrscheinlich auf den fehlenden Luftkontakt zwischen Sentinels und der zu überwachenden Kolonie im IVC, zum anderen auf den generellen Rückgang der MHV Prävalenz in der Kolonie durch die Haltungsumstellung zurück zu führen (siehe dazu auch VI.2).

Die serologische MHV Untersuchung von Sentinels in offener Haltung spiegelt nach ausreichend langer Expositionszeit den MHV Status der untersuchten Kolonie zuverlässig wieder. MHV wird nicht nur über infizierten Kot, sondern auch aerogen übertragen. Deshalb wird die Infektion auch gut über Luftsentinels, die der Abluft von IVCs ausgesetzt werden, erkannt [5, 50].

Kot PCR Untersuchungen von Sentinels sind aufgrund der kurzen Ausscheidungsphase in beiden Haltungssystemen als alleinige Testmethode unzuverlässig, außer sie würden wöchentlich wiederholt werden.

Aber auch die nicht wöchentliche Gabe gebrauchter Einstreu birgt vor allem in IVC Haltung ein großes Risiko, die akute Ausscheidungsphase der zu überwachenden Kolonietiere zu verpassen. Im Kleintierhaus bekamen die Einstreusentinels während der zwölfwöchigen Überwachungsperiode nur zweimal aus jedem zu überwachenden Käfig gebrauchte Einstreu. Ist in diesen zwei Wochen zufällig kein MHV ausscheidendes Kolonietier vorhanden, wird die Infektion vom Einstreusentinel nicht erkannt.

Die Übertragung des enterotropen MHV-Y über Einstreu auf Swiss Webster Sentinelmäuse (Tac:SW) in Filtertop Käfigen gelang in einer Studie von Barthold et al., 1993 nur in der akuten Ausscheidungsphase von Tag 2 bis 5 nach der Infektion, was mit der geringen Umweltstabilität von MHV erklärt wurde [56]. Außerdem ist in Betracht zu ziehen, dass die MHV Prävalenz in IVC Haltung sehr niedrig ist (siehe VI.2.2) und möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze des Sentinelmonitoringprogrammes liegt.

Kleinere vom Sentinel überwachte Einheiten und damit häufigere Einstreugaben könnten den MHV Detektionserfolg durch eine serologische Untersuchung mit Sentinels in IVC Haltung erhöhen.

2. Einfluss von IVC Haltung auf die MNV/MHV Seroprävalenz in der Mauspopulation

Bei IVC Haltung bildet jeder Käfig eine abgeschlossene mikrobiologische Einheit. Im Raum 6114 wurde die Entwicklung der MHV und MNV Seroprävalenz bei allen 12 bis 16 Wochen alten Mäusen aus diesem Raum über mehrere Monate nach der Umstellung auf IVC Haltung verfolgt. Es wurden jeden Monat alle Tiere im Raum getestet, die am Stichtag im Zeitfenster lagen.

Zwei Monate nach der Haltungsumstellung begannen wir zunächst nur auf MHV zu testen, da bei diesem Virus, welches auch aerogen übertragen wird, ein Einfluss auf die Infektionsprävalenz durch die Abschottung im IVC zu erwarten war. Nachkommen MHV seropositiver Mütter erhalten durch die Aufnahme von Kolostrum im Alter bis zu zwei Wochen eine maternale, also passive Immunität gegen MHV Infektionen desselben Substammes [58]. Diese Immunität kann bis zum Alter von 10 Wochen anhalten [60]. Die serologische Untersuchung von Mäusen unter 10 Wochen auf MHV gibt daher keine Aussage darüber, ob die Tiere selber eine Infektion durchgemacht haben, oder nur maternale Antikörper im Serum nachweisbar sind. Aus diesem Grund entschieden wir uns, Mäuse im Alter über 12 Wochen zu testen, weil in diesem Alter sicher keine maternalen Antikörper mehr persistieren und die Tiere im Falle einer MHV Infektion Zeit gehabt hätten, um eine eigene adaptive Immunantwort zu entwickeln. Eine Serokonversion ist in diesem Fall also ein Anzeiger für eine durchgemachte MHV Infektion. Die obere Altersgrenze von 16 Wochen wurde gewählt, damit bei monatlicher Untersuchung nach einigen Monaten alle nachkommenden Tiere im betreffenden Raum einmal getestet wurden.

Sechs Monate nach der Haltungsumstellung entschlossen wir uns, auch Daten zur MNV Seroprävalenz im Tierraum zu erheben. Eine Serokonversion ist auch hier ein Anzeiger für eine durchgemachte MNV Infektion, allerdings scheiden infizierte Tiere auch nach erfolgter Serokonversion häufig noch über mehrere Wochen Virus im Kot aus und es gibt keine maternale Immunität. Das Testalter ist also für die Detektion einer MNV Infektion weniger entscheidend als bei MHV. Die Tiere sollten lediglich in der Lage sein, eine adaptive Immunreaktion zu entwickeln, was im Alter von über 12 Wochen gegeben sein sollte.

2.1. MNV

Sechs Monate nach der Haltungsumstellung im Dezember 2010 waren über 90% der 12-16 Wochen alten Mäuse MNV seropositiv. Zwischen Februar und Mai 2011 pendelte sich die

Seroprävalenz zwischen 50% und 70% ein.

Da, wie bereits in Abschnitt VI.1 diskutiert wurde, MNV Ausscheidung im Kot über mehrere Wochen persistiert, ist die Gefahr der Verschleppung durch Neukombination von Zuchtpaaren und anderen Experimentalgruppen sehr groß. Außerdem spielt Luftübertragung von MNV, wie bei Sentinels beobachtet, scheinbar nur eine untergeordnete Rolle.

Die IVC Haltung könnte durch „*Biocontainment*“ nur dann einen Beitrag zur Kontrolle von MNV Infektionen leisten, wenn Zuchtpaare vor der Zusammenstellung auf MNV Ausscheidung im Kot getestet würden und nur MNV negative Tiere zur Weiterzucht zugelassen würden, oder andere Methoden zur MNV Sanierung, insbesondere der Embryotransfer [27] eingesetzt werden würden. Die alleinige Umstellung von offener zu IVC Haltung hat dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Infektionsprävalenz in der Mauspopulation.

2.2. MHV

Zwei Monate bzw. drei Monate nach der Haltungsumstellung waren 45 % bzw. 15% der 12-16 Wochen alten Tiere MHV seropositiv. In den folgenden Monaten bis März 2011 waren alle zum jeweiligen Testzeitpunkt 12-16 Wochen alten Tiere MHV seronegativ. Die Haltungsumstellung führte zum Ausbrennen der MHV Infektion.

Weibchen sind zum Zeitpunkt der Verpaarung meist zwischen acht und zwölf Wochen alt. Männchen können auch älter sein. In diesem Alter ist die Empfänglichkeit für MHV Infektionen besonders hoch, weil der Schutz durch maternale Antikörper spätestens im Alter von 10 Wochen wegfällt [60]. Nach der Zusammenstellung des Zuchtpaares dauert es mindestens drei bis vier Wochen bis der erste Wurf geboren wird. Ist ein Elternteil zum Zeitpunkt der Verpaarung MHV Ausscheider, infiziert er den Zuchtpartner mit großer Wahrscheinlichkeit innerhalb von ein bis zwei Wochen und serokonvertiert. Die Neugeborenen nehmen Antikörper über das Kolostrum auf und entwickeln wiederum eine passive (maternale) Immunität. Durch Isolation des Zuchtpaares im IVC Käfig ist die Infektionskette in horizontaler Richtung unterbrochen.

Da wir die Tiere erst im Alter von 12-16 Wochen getestet haben, gibt es keine Interferenzen mit der maternalen Immunität.

Die hier erhobenen Daten legen nahe, dass die Infektionsdynamik des im Raum 6114 vorhandenen MHV Stammes sich zwischen den Crl:CD1(Icr)/Dcm Sentinels und den dort gehaltenen genetisch modifizierten, immunkompetenten C57BL/6 Mäusen nicht unterscheidet, weil die MHV Population durch die Abschottung der einzelnen Mausgruppen

im IVC Käfig „ausbrennt“, was für sehr kurze Ausscheidungsphasen, gefolgt von zeitnaher Serokonversion spricht.

Vergleichbare Resultate beschrieben Smith et al. [73] als Methode zur Eliminierung von MHV aus einem Mausbestand. Sie wählten potenzielle Elterntiere zur Zusammenstellung von Zuchtpaaren mit negativen PCR Befund im Kot und positiven Serumbefund. Die zu sanierende Population in IVC bzw. Mikroisolatorhaltung wurde zuerst über 10 Wochen infizierter Einstreu ausgesetzt, um die Kolonie zu infizieren und eine stabile Immunität zu entwickeln, bevor die Zucht fortgesetzt wurde. Sentinels blieben über mindestens 22 Monate nach dem ersten Auftreten der MHV Infektion seronegativ. Damit wurde die Sanierungsmaßnahme als erfolgreich bewertet. Im Unterschied zu unseren Beobachtungen entwickelten hier 30% der infizierten Mäuse, die von der Zucht ausgeschlossen wurden, einen Dauerausscheiderstatus, der zum einen auf den genetischen Hintergrund der genetisch modifizierten Mäuse (FVB/N und Hybrid B6129) zum anderen auf die Biologie des in der Tierhaltung vorhandenen MHV Stammes zurück geführt wurde. Unsere Daten legen nahe, dass es keine „Dauerausscheider“ gab, wobei es ohnehin fraglich ist, ob es sich bei den häufig erwähnten immunkompetenten MHV Dauerausscheidern nicht eher um Tiere handelt, die sich mit neu in die Population eingebrachten oder durch Mutation stark antigenetisch veränderten MHV Varianten neu infizieren. Barthold et al. 1989 [58] publizierte, dass die Immunität gegen MHV stark Virusstammabhängig ist.

Die Abschottung von Mäusen in IVC Käfigen gegenüber der Umwelt und der umgebenden Mäusepopulation unterbricht die MHV Ausbreitung, weil der Fortbestand der Infektion auf den Eintrag und Neuinfektion naiver Mäuse angewiesen ist. Naive Mäuse sind durch das *Biocontainment* in IVCs und das Umsetzen in Käfigwechselstationen jedoch vor der Infektion geschützt. Dieser Eliminationserfolg ist abhängig vom Immunstatus und genetischen Hintergrund bzw. von Modifikationen der Mäuse und von der in der Maushaltung vorhandenen MHV Variante, sowie der Handhabung der Mäuse beim Umsetzen in den Käfigwechselstationen.

3. Nutzen der Untersuchung von IVC Abluft auf MNV und MHV im Vergleich zur Standardmethode Einstreusentinel und Veränderung der Infektionsprävalenz in der Mauskolonie durch die Haltungsumstellung

3.1. Staubsammelmethoden

Zu Beginn der Untersuchung wurden diverse Staubsammelmethoden aus IVC Abluft getestet, die in dieser Arbeit nicht weiter erläutert werden.

Die Untersuchung von IVC Abluftvorfiltern, welche im Infektionsexperiment wie bei Compton et al. 2004 [50] mit Gazefilterstücken versehen wurden, um häufigere Staubprobennahme zu ermöglichen, stellte sich als effiziente Methode heraus. Zudem ist kein zusätzlicher apparativer Aufwand am IVC System notwendig. Es können so sehr viele Staubproben zu beliebigen Zeitpunkten aus verschiedenen IVC Regalen gesammelt werden, ohne auf spezielle Sammelbehälter angewiesen zu sein.

Zur Ergänzung der IVC Vorfilteruntersuchung wurden später im MNV Infektionsexperiment weitere Staubsammelmethoden getestet. Die Staubmenge, die im Schwerkraftstaubsammler innerhalb von drei Wochen gesammelt wurde, stellte sich als nicht ausreichend zur Untersuchung auf MNV und MHV RNA heraus. Dennoch konnten mit einem sterilen Wattetupfer Staubproben von der Innenseite gewonnen werden, deren Untersuchung erfolgreich war.

Eine weitere Methode ist das Herausstreifen von Staubproben aus dem unteren horizontalen Abluftrohr mit einem Staubkratzer. Wird ein frisch gereinigtes voll besetztes IVC Regal an die Lüfter Einheit angeschlossen, hat sich nach ca. vier Wochen eine gewinnbare Staubprobe gesammelt. Vorteil dieser Methode ist, wie bei der Untersuchung von Abluftvorfiltern, der geringe apparative Aufwand und die damit verbundene Möglichkeit, Staubproben aus mehreren IVC Systemen zu sammeln. Nachteil ist, dass es zum einen relativ lange dauert, bis eine verwertbare Staubprobe gesammelt ist, zum anderen die große Kontaminationsgefahr. Denn zur Gewinnung der Staubprobe muss das Abluftsystem zum Raum hin geöffnet werden. Infektiöser Staub kann in die Raumluft gelangen und stellt eine potenzielle Infektionsquelle dar. Aus diesem Grund wurde diese Staubsammelmethode nur sporadisch angewendet.

3.2. MNV in der Feldstudie und MNV Infektionsexperiment

Folgende Teilbefunde aus der Feldstudie müssen betrachtet werden, um den zusätzlichen

Nutzen von Staubsammelproben zur Überwachung von MNV in Mauskolonien bewerten zu können:

- MNV wurde in Tierräumen mit Seroprävalenzraten zwischen 63 und 100% zuverlässig bei jedem Filterwechsel zwischen Dezember 2010 und Juni 2011 im Abluftvorfilter nachgewiesen. Abluftvorfilter aus Tierräumen ohne oder mit sehr niedriger (Raum 6094, 5%, März 2011) MNV Seroprävalenz blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum negativ.
- In Raum 6096 ging die MNV Seroprävalenz der Mauspopulation von 26% im Dezember 2010 auf 0% im Mai 2011 zurück. Ab März war (bis auf eine kontaminierte Probe im Juni 2011) kein MNV im Abluftvorfilter detektierbar.
- Es gab über den gesamten sechs monatigen Untersuchungszeitraum keinen Tierraum, in denen Sentinels positiv, die Abluftfilter aber negativ getestet wurden.
- In Raum 6095 schwankte die Seroprävalenz zwischen 13% im Dezember 2010 und 20% im Mai 2011. Dort wurden die Abluftvorfilter bis auf zwei Ausnahmen im März und Mai 2011 positiv getestet.
- In Raum 6094 lag die MNV Seroprävalenz zwischen 4% im Dezember 2011, 0% in Januar und Mai 2011 und 5% im März 2011. Diese geringe Infektionsrate wurde weder über Abluftfilter PCR noch über Einstreusentinels gefunden. Diese Prävalenzwerte lagen also unterhalb der Nachweisgrenze beider Untersuchungsmethoden.
- In IVC Haltung änderte sich das Verteilungsmuster der Sentinelserologiebefunde im Routinehygienemonitoring nicht (Tabelle 20 bzw. Tabelle 22). In infizierten Tierräumen mit ausreichend hoher Infektionsprävalenz lagen immer wieder positive Sentinelbefunde vor.

Aus den MNV Felddaten ist zu schließen, dass die PCR Untersuchung von IVC Abluftfiltern mindestens genauso gut, wie die serologische Untersuchung von Einstreusentinels funktioniert. Eine Untersuchung für sich alleine hat wie bei den Einstreusentinels nur eine geringe Aussagekraft. Da Abluftvorfilter viel häufiger (unter Feldbedingungen haben sich drei

Wochen bewährt) als Einstreusentinels untersucht werden können, ist diese Methode in zeitlicher Hinsicht überlegen. Für den nahe der Nachweisgrenze gelegenen, zuverlässigen PCR MNV RNA Nachweis aus Abluftvorfiltern, sollten mindestens fünf Filter in Folge untersucht werden.

Im Infektionsexperiment wurden verschiedene MNV Prävalenzraten innerhalb eines IVC Regals simuliert. Die Frage ist hier, ob die absolute Anzahl infizierter Tiere im System oder die absolute Anzahl infizierter Käfige entscheidend für den Detektionserfolg ist. Im Feldexperiment wurde die Anzahl infizierter Käfige als Parameter der Seroprävalenz im Tierraum definiert. Zum einen, da sich in der Studie zur MNV Seroprävalenz in Raum 6114 herausgestellt hatte, dass immer alle Tiere innerhalb eines Käfigs entweder positiv oder negativ sind. Zum anderen aus der Überlegung heraus, dass die Luftmenge, die durch einen Käfig strömt, unabhängig von der Tierzahl konstant bleibt und die Abnahme der Anzahl nicht infizierter Käfigen im System zu einer Verringerung des Verdünnungseffektes durch negativen Staub im Vorfilter führt. Am Ende des Experiments in Woche 21 war ein Käfig von 53 nicht infizierten Käfigen in der Sammelkotprobe MNV PCR positiv. Der genaue Zeitpunkt der Infektion konnte leider nicht rekonstruiert werden, da die „negative“ Mauspopulation nur einmal am Anfang und einmal am Ende des Experimentes getestet wurde. Unter der Annahme, dass der Käfig im extremsten Fall schon in Woche 1 infiziert war, sind die dann vorherrschenden Prävalenzraten im Folgenden in Klammern angegeben.

Die Infektion wurde bei einer Prävalenz von 8% (9,5%) auf Käfigebene (Schritt 2) nach sieben Wochen von zwei der vier Sentinels durch Serokonversion entdeckt. Im Kot der Sentinels bzw. in der Sammelkotprobe aus der gebrauchten Einstreu war die Infektion sogar schon bei einer Prävalenz von 1,6% (3,2%) (Schritt 1) nach zwei Wochen durch PCR Untersuchung nachweisbar.

Im Abluftstaub ist die Infektion erst bei 8% (9,5%) Prävalenz in 500mg Staubeinwaage aus dem unteren Abluftrohr nach 9 Wochen nachweisbar. Bei 1,6% (3,2%) Prävalenz nach 5 Wochen dagegen noch nicht.

Im Abluftvorfilter wurde die Infektion erst bei 12,7% (15,2%) Prävalenz (Schritt 3) nach 2 Wochen erkannt. Diese Beobachtung deckte sich sehr gut mit den Felddaten. Im Raum 6095 wurden bei einer Kolonieseroprävalenz von 13% im Dezember 2010 durchgängig positive MNV PCR Ergebnisse im Abluftfilter ermittelt. Die Sentinels zeigten die Infektion erst wieder im Juni 2011 an, nachdem die Kolonieseroprävalenz im Mai 2011 wieder auf 20% angestiegen war.

Die MNV Abluftfilter PCR Untersuchung kann MNV Infektionen im Bereich $\geq 15,2\%$

Kolonieseroprävalenzrate detektieren, was 8 (9) von 63 infizierten Käfigen entspricht.

Die bessere Detektion von MNV durch Sentinels im Infektionsexperiment ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass die von den Sentinels überwachte Einheit hier nur ein Regal ist. Unter Feldbedingungen überwachen zwei Sentinels fünf Regale im Standardierraum. Innerhalb der zwölfwöchigen Monitoringperiode wird aus jedem Koloniekäfig zweimal eine Einstreuprobe gewonnen. Obwohl MNV Ausscheidung im Kot bei infizierten Mäusen über mehrere Wochen persistiert und MNV RNA mindestens zwei Wochen bei Raumtemperatur stabil ist [28], ist es möglich, dass zum Zeitpunkt an dem Einstreu gesammelt wird kein aktiver Ausscheider vorhanden ist, der Verdünnungseffekt bei sehr niedrigen Prävalenzraten in der Kolonie zu groß ist oder die Virus Dosis nicht reicht um die Sentinels zu infizieren.

Für ein zuverlässiges MNV Hygienemonitoring mit Einstreusentinels ist es daher anzuraten, die von einem Sentinelpaar überwachte IVC Einheit zu verkleinern. Optimaler Weise sollten zwei Sentinels pro IVC Regal eingesetzt werden und wöchentlich mit gebrauchter Einstreu versorgt werden. Damit minimiert man das Risiko einer zu starken Verdünnung der infizierten Einstreu.

Einstreusentinels in IVC Haltung zeigten eine wesentlich schlechtere MNV Serokonversionsrate im Vergleich zur offenen Haltung, wogegen virale RNA häufig intermittierend über mehrere Wochen im Kot und in der gebrauchten Einstreu nachweisbar war (siehe Sentinels im Infektionsexperiment). Fehlende Serokonversion spricht dafür, dass die Sentinels sich nicht infizierten, sondern mit Virus Nukleinsäuren kontaminierten Kot aus der gebrauchten Einstreu oral aufnahmen, durch den Darm passagierten und dann im Kot wieder ausschieden (siehe auch Abschnitt VI.1.1).

Wenn Einstreusentinels zur MNV Detektion verwendet werden, sollte die mehrmalige Untersuchung von Sentinelkot oder einer Sammelkotprobe aus der gebrauchten Einstreu des untersuchten Regals im IVC die serologische Untersuchung am Ende des Monitoringzeitraumes ergänzen.

3.3. MHV in der Feldstudie

MHV wird nur über sehr kurze Zeiträume im Kot ausgeschieden (eigene Daten). Immunkompetente Mäuse serokonvertieren ca. zwei Wochen nach Infektion mit dem Virus. Damit endet die Ausscheidungsphase. Serologische Daten der Kolonietiere geben daher anders als bei MNV, bei dem die Ausscheidung im Kot durch die Serokonversion nicht beendet wird, einen retrospektiven Blick auf das Infektionsgeschehen in der untersuchten Mauspopulation.

Die MHV Seroprävalenz in der Kolonie ging nach Umstellung auf IVC Haltung deutlich zurück. So ging sie in den Räumen 6094-6096 von 23%, 65%, bzw. 30% im Dezember 2010 auf 0% im Mai 2011 zurück. Über den gesamten Zeitraum waren die Abluftvorfilter bis auf wenige Ausnahmen MHV positiv. In mindestens einem (Dezember 2010) und bis zu allen drei Räumen (Juni 2011) sind die Einstreusentinel seropositiv. Es scheint also zwischen März und Juni infizierte Tiere im Raum gegeben zu haben, die durch die stichprobenartige serologische Untersuchung von Kolonietieren nicht erfasst wurden. Das ist gut möglich, da die Auswahl der untersuchten Tiere nicht absolut zufällig erfolgen konnte. Es handelte sich um eine Auswahl von Tieren, die vom Raumnutzer nicht mehr anderweitig verwendet werden konnten. Diese Auswahl muss nicht unbedingt den hygienischen Status der Tiere im Raum, vor allem bei besonders niedrigen MHV Prävalenzraten widerspiegeln, da durch eine Stichprobe von 20 Tieren pro Tierraum nur mit 80%iger Sicherheit infizierte Tiere erkannt werden (siehe V.3).

Sehr deutlich ist auch der Rückgang der Kolonieseroprävalenz im Raum 6097 von 75% im Dezember 2010 auf 10% im Juni 2011. Hier konnte tatsächlich eine zufällig gewählte Stichprobe von 20 Tieren aus dem Raum untersucht werden. Die Abluftvorfilter waren von Dezember 2010 bis April 2011 durchgängig positiv. Im Mai und Juli waren die Filter ebenfalls positiv, im Juni dagegen negativ. Die Sentinels waren im Juni MHV seronegativ im Dezember 2010 und März 2011 dagegen positiv. Die Beobachtung deutet darauf hin, dass Kolonieprävalenzraten von 10% vom Sentinel nicht mehr detektiert werden können, wohl aber im IVC Abluftvorfilter.

Der durch Embryotransfer sanierte Raum 6113 blieb bis Juni 2011 MHV negativ in Abluftfilter PCR und Sentinel Serologie. Das positive Ergebnis im Abluftvorfilter im Juli 2011 ist sehr wahrscheinlich auf eine Kontamination der Filter untereinander bei der Präparation zurück zu führen. Um ganz sicher zu gehen, müssten Tiere aus der Kolonie serologisch untersucht werden. Diese Daten liegen aktuell noch nicht vor.

Überraschend ist das intermittierende Auftreten positiver MHV PCR Abluftvorfilterbefunde in Januar, Februar, April, Mai und Juni 2011 im Raum 6114. Hier wurde die jeweils nachkommende 12-16 Wochen alte Mauspopulation von August 2010 bis März 2011 vollständig serologisch auf MHV untersucht. Seit Oktober 2010 waren alle untersuchten Tiere MHV seronegativ. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass sich Tiere erst infizierten, nachdem sie im Alter zwischen 12 und 16 Wochen serologisch untersucht worden waren, wurden 20 Tiere im Alter von 178 bis 251 Tagen erneut getestet. Diese Mäuse, die alle zum selben Stamm gehörten und es somit keinen Austausch zu Mäusen anderer Stämme im selben

Tierraum gab, waren alle seronegativ (Daten nicht angegeben). Um den Sachverhalt weiter abzuklären, müssten ältere Mäuse von anderen Stämmen aus dem Raum serologisch auf MHV untersucht werden. Die IVC Regale in diesem Tierraum wurden nach der Umrüstung im Juni 2011 kontinuierlich ohne Zwischenreinigung und Desinfektion weiter betrieben. Es ist möglich, dass sich im Abluftsystem alter Staub aus dem Zeitraum als noch MHV infizierte Tiere in den Käfigen saßen, von Zeit zu Zeit löst und dann im Abluftvorfilter gesammelt wird. Diese Möglichkeit ist sehr wahrscheinlich, weil die Sentinels seit Dezember 2010 durchgängig MHV seronegativ waren und uns bislang keine Hinweise vorliegen, dass die Übertragung von MHV aus Einstreu auf Sentinels im IVC schlechter funktioniert, als bei offener Haltung (siehe VI.1.2). Allerdings ist es auch, bedingt durch die MHV Feldvirus eigene kurze Ausscheidungsphase, wahrscheinlicher als bei MNV, dass Infektionen im niedrigen Prävalenzbereich nicht durch Sentinels erkannt werden, weil die gebrauchte Einstreu unter Umständen nicht in der aktiven Ausscheidungsphase der Kolonietiere gesammelt wird.

Da MHV auch aerogen übertragen wird, ist es daher sinnvoll um die Expositionswahrscheinlichkeit zu erhöhen, die Sentinels zusätzlich der Abluft der IVC Regale auszusetzen [5].

Bei den positiven Ergebnissen der Abluftvorfilter PCR in den Räumen 6094-6101 im Juni 2011 kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um Kontamination während der RNA Isolation handelt, weil die bei der RNA Isolation mitgeführten Leerkontrollen in der PCR positiv waren.

Aus den Felddaten lässt sich schließen, dass die Abluftvorfilter PCR Untersuchung grundsätzlich zur Detektion von MHV RNA im IVC Abluftstaub geeignet ist.

Allerdings gab es häufiger Ergebnisse, die falsch positiv sein könnten. Das mag an der Fähigkeit des zur Detektion verwendeten MHV RNA *real-time PCR Assays* liegen, sehr geringe Kopienzahlen zu detektieren. Eine auch nur geringfügige Verschleppung von Virusmaterial aus dem bereits kontaminierten IVC Regal, bei der Filteraufbereitung, RNA Isolation und dem PCR Setup führen zu falsch positiven Ergebnissen. Das Viruspartikel selbst hat eine geringe Tenazität, allerdings ist das MHV Genom sehr groß, sodass es wahrscheinlich sehr lange dauert, bis die im Staub enthaltenen RNAsen die virale RNA soweit zersetzt haben, dass sie nicht mehr mit PCR nachzuweisen ist. So war MHV RNA auch noch nach vier Wochen im IVC Deckelabluftfilter von Käfigen mit infizierten Mäuse detektierbar [50].

Eine Lösung wäre, das IVC Regal und die Lüfter Einheit nach dem Auftreten positiver

Ergebnisse komplett zu reinigen und zu desinfizieren, was unter Praxisbedingungen aufgrund des Arbeitsaufwandes schwer zu verwirklichen ist.

Durch die Infektionsdynamik von MHV (kurze Ausscheidungsphase) ist die Virus Kopienzahl in Staubproben gering. Im niedrigen Kopienzahlbereich nimmt naturgemäß die Fehlerwahrscheinlichkeit zu. Es ist daher unerlässlich, Proben mit erwarteter niedriger Kopienzahl in Triplikaten zu untersuchen [74]. In dieser Studie wurden lediglich Duplikate untersucht, weshalb Proben, die ein positives und ein negatives Ergebnis brachten, als fraglich zu betrachten sind.

Da in dieser Studie für MHV lediglich Felddaten gesammelt wurden, kann keine Aussage zur tatsächlichen Sensitivität des PCR Nachweises von MHV RNA in IVC Abluftvorfiltern gemacht werden. Die Felddaten deuten darauf hin, dass die Methode das Einstreusentinelmonitoring unterstützen kann. Um genauere Daten zu ermitteln, müsste analog zum Vorgehen bei MNV ein Infektionsexperiment mit einer genau definierten Anzahl infizierter Mäuse durchgeführt werden. Problematisch ist, dass hierfür ein Laborvirusstamm mit langer Zellkulturhistorie verwendet werden müsste, dessen Eigenschaften einer Feldinfektion nicht nahe kommen. Ein Feldisolat steht uns leider nicht zur Verfügung. Uns ist es, wie auch einigen vor uns nicht gelungen, MHV aus dem Kot Virus ausscheidender Mäuse zu isolieren und in der Zellkultur zu vermehren [42]. Bedingt durch die dem MHV Feldvirus eigene kurze Ausscheidungsphase von nur ein bis zwei Wochen, wäre es sehr schwierig, eine ausreichende Anzahl natürlich infizierter Tiere aus der Kolonie zeitnah durch Kot PCR Untersuchung zu erkennen und in ein Experimental-Regal einzusetzen.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten bei der Durchführung eines Infektionsexperiments ist es notwendig, weitere empirische Daten zum MHV RNA Nachweis im Abluftstaub bei verschiedenen MHV Kolonieprävalenzraten zu ermitteln um zuverlässige Aussagen zum Nutzen dieser Methode im Hygienemonitoring von Mauskolonien in IVCs machen zu können.

4. MNV/MHV Hygienemonitoring durch Raumlüftüberwachung: Luftsentinelns versus Untersuchung von IVC Zuluft Filtern

Beim Käfigwechsel im Kleintierhaus ist es, wie in vielen anderen Maushaltungen aufgrund einer zu geringen Autoklaven Kapazität nicht möglich, frische und gebrauchte Käfige geschlossen in die Barriere und aus der Barriere heraus zu bringen. Weil Käfige mit schmutziger Einstreu deshalb offen im Tierraum gestapelt werden müssen, können Pathogene

aus infizierten Käfigen so in die Raumluft gelangen. IVC Zuluftvorfilter filtern einen großen Teil der im Raum mit Staub und Pathogenen belasteten, vorhandenen Luft, da das IVC System seine gesamte Zuluft aus der Raumluft entnimmt. Die PCR Untersuchung von IVC Zuluftvorfiltern ist damit ein weiterer Ansatz zur Hygieneüberwachung.

Die erste PCR Untersuchung von Zuluftfiltern fand im Dezember 2010 statt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Filter zwischen 23 und 175 Tagen in Betrieb. Der folgende Wechsel fand im Juli 2011 nach 238 Tagen Expositionsdauer statt.

4.1. PCR Untersuchung von IVC Zuluftfiltern auf MNV

MNV RNA fand sich an beiden Zeitpunkten in allen vier Räumen von Nutzer B (Räume 6098-6101), obwohl die Filter hier zum ersten Untersuchungszeitpunkt die kürzeste Zeit über (23-43 Tage) der Raumluft ausgesetzt waren. Die Raumluft scheint in diesen Räumen besonders stark mit MNV belastet zu sein. Dafür sprechen auch die durchgängig positiven Abluftfilter PCR Ergebnisse zwischen Dezember 2010 und Juli 2011. Leider konnte aus den Räumen dieses Nutzers nur einmal die MNV Kolonieseroprävalenz und auch nur in Raum 6098 bestimmt werden. In der im Februar untersuchten Stichprobe waren 100% der Tiere seropositiv. Die Beobachtungen legen nahe, dass in den übrigen Räumen desselben Nutzers, zwischen denen auch Tiere ausgetauscht werden, ähnlich hohe Kolonieprävalenzen vorlagen. Allerdings waren die Zuluftvorfilter PCR Ergebnisse am ersten Zeitpunkt nach kurzer Expositionszeit in drei von vier Räumen nur sehr schwach positiv (eine von vier untersuchten Proben aus dem jeweiligen Raum). Nach 238 Tagen waren sie in allen Räumen deutlich positiv. Längere Expositionzeiten zwischen 43 und 238 Tagen können den MNV Detektionserfolg in IVC Zuluftvorfiltern erhöhen.

Im nicht sanierten Raum 6114 von Nutzer E sind die Zuluftvorfilter ebenfalls an beiden Terminen deutlich MNV PCR positiv. Die Abluftvorfilter sind über den gesamten Zeitraum positiv. Die MNV Seroprävalenz bei 12-16 Wochen alten Mäusen, lag dort zwischen 94% im Dezember 2010 und 67% im Mai 2011, ist also ebenfalls sehr hoch.

In den Räumen 6094 und 6096 von Nutzer A lag die MNV Seroprävalenz zwischen 4 bzw. 26% im Dezember 2010 und 0% im Mai 2011. Die Zuluftvorfilter waren an beiden Zeitpunkten MNV negativ.

Liegt die Infektionsprävalenz im Tierraum bei 26% oder weniger, reicht die Virusbelastung im Raum nicht aus, um MNV RNA im Zuluftvorfilter nachzuweisen zu können. Diese Annahme wird durch die Beobachtung im dritten Raum 6096 desselben Nutzers unterstützt. Dort lag die Kolonieseroprävalenz zwischen 13% im Dezember 2010 und 20% im Mai 2011.

Hier war ein Zuluftvorfilter im Dezember nur leicht positiv (eine von vier untersuchten Proben aus diesem Raum), am zweiten Zeitpunkt war, wie in den anderen beiden Räumen keine MNV RNA im Zuluftvorfilter zu detektieren.

Im Raum 6115 desselben Nutzers war der Filter am ersten Zeitpunkt nach 170 Expositionstagen negativ, am zweiten Zeitpunkt positiv. Die Mauspopulation in diesem Raum wurde im Dezember 2011 nahezu vollständig eliminiert: Der Raum stand zwischenzeitlich leer und wurde in den folgenden Monaten mit Tieren aus Raum 6114 aufgefüllt, welcher sehr stark mit MNV belastet ist. Diese Veränderung spiegelte sich bei der zweiten Zuluftvorfilter Untersuchung im Juli 2011 wieder.

Die Zuluftvorfilter des sanierten Raums 6113 von Nutzer E und des MNV freien Raums 6112 von Nutzer C blieben an beiden Zeitpunkten, obwohl sie von stark mit MNV belasteten Räumen umgeben sind, in der MNV PCR negativ. Die Abluftvorfilter waren in diesen Räumen ebenfalls durchgängig negativ.

Die MNV belastete Raumluft scheint den Tierraum nicht zu verlassen. Das ist nicht anders zu erwarten, weil es zum Schutz der Tierräume ein Druckgefälle zwischen Tierräume und Flur gibt und Arbeiten in den Mausräumen nur bei geschlossenen Türen durchgeführt werden. Die Luft strömt vom Tierraum in den Flur und von dort über das Abluftsystem des Flures nach draußen.

Die Untersuchung von IVC Zuluftfiltern auf MNV RNA zur Raumluftüberwachung ist eine sinnvolle Ergänzung zum MNV Hygienemonitoring, weil sie den MNV Status der im Raum gehaltenen Tiere wieder spiegelt. Allerdings gelingt der zuverlässige Nachweis nur bei hoher Infektionsprävalenz von mindestens 63% in der Mauskolonie. Längere Expositionszeiten (hier 238 Tage) führen zu eindeutigeren Ergebnissen.

4.2. PCR Untersuchung von IVC Zuluftfiltern auf MHV

Am ersten Untersuchungszeitpunkt im Dezember waren alle IVC Zuluftvorfilter in der MHV PCR negativ.

Am zweiten Untersuchungszeitpunkt nach 238 Tagen waren die Zuluftvorfilter aller Räume von Nutzer A deutlich positiv, was sich mit den Ergebnissen der Abluftvorfilter PCR und den Sentinel Serologieergebnissen von Dezember 2010 bis Juni 2011 deckt. Die durch Stichprobennahme von zur Verfügung gestellten Kolonietieren ermittelte Kolonieseroprävalenz lag im Dezember 2010 zwischen 23 und 65% und ist 0% im Mai 2011. Dieses Ergebnis untermauert die bereits im Abschnitt VI.3.3 diskutierte Überlegung, dass die späteren, wie die ersten nicht absolut zufällig gewählten Kolonieserologie Stichproben die

tatsächliche zurück gehende MHV Prävalenz im Tierraum nicht wieder spiegelt. Man kann also davon ausgehen, dass die MHV Infektionsprävalenz der Mauskolonie über die 238 Tage Expositionszeit des zweiten Filters bei $\leq 23\%$ liegt und bei diesen Gegebenheiten noch MHV RNA im Zuluftvorfilter nachweisbar ist.

23-175 Tage Expositionsdauer am ersten Untersuchungszeitpunkt im Dezember 2010 sind zu kurz um MHV RNA im Zuluftvorfilter nachweisen zu können. Diese Überlegung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die MHV Kolonieprävalenzrate kurz nach der Umstellung auf IVC Haltung noch relativ hoch war, und beim zweiten Zuluftvorfilter Untersuchungszeitpunkt bei wahrscheinlich niedrigerer MHV Kolonieinfektionsprävalenz deutlich positive Ergebnisse in der Zuluftvorfilter PCR zu erzielen waren.

Im März 2011 betrug die Kolonie Seroprävalenz in Raum 6112 40%. Der zweite Zuluftvorfilter war im Juli deutlich positiv. Auch hier waren die Zuluftvorfilter von Dezember 2010 bis Juni 2011 immer positiv, was für den Fortbestand der MHV Infektion im Tierraum spricht.

In den Räumen 6098 bis 6101 von Nutzer B konnte nur einmal im März 2011, also während der Expositionszeit der zweiten Zuluftvorfilter, die MHV Kolonieseroprävalenz von 21% ermittelt werden. In diesem Raum sind die Zuluftvorfilter im Juli 2011 leicht positiv, was die Annahme bestätigt, dass MHV RNA in IVC Zuluftvorfiltern aus Mäuseräumen mit Kolonieseroprävalenzraten um 20% bei längeren Expositionszeiten zwischen 175 und 238 Tagen nachgewiesen werden kann.

Im sanierten Raum 6113 waren die Zuluftvorfilter immer negativ, was die schon in Abschnitt 4.1 diskutierte Beobachtung unterstützt, dass durch das Druckgefälle zwischen Tierraum und Flur keine MHV Partikel aus dem Flur in andere Tierräume gelangen können.

Die PCR Untersuchung von IVC Zuluftfiltern ist eine sinnvolle Ergänzung zum MHV Routinehygienemonitoring. Im Gegensatz zu MNV wird die Infektion der Mauspopulation schon bei niedrigeren Infektionsprävalenzraten um 20% detektiert, wenn die Expositionszeit ausreichend lang ist.

4.3. Raumlufsentinels

Um zu sehen, ob die im Raum vorhandene Pathogenlast ausreicht, um Mäuse zu infizieren, wurden in drei Räumen (Raum 6095, 6098, 6114) zwischen Ende Februar und Mitte Juni 2011, also während der Expositionszeit des zweiten Filters, Raumlufsentinels eingesetzt.

Diese wurden wöchentlich auf MHV und MNV Ausscheidung im Kot und mehrmals während des Untersuchungszeitraums auf Serokonversion untersucht. Bis auf ein leicht positives MHV

PCR Ergebnis im Kot in Woche 11, was vermutlich auf Kontamination während der Präparation zurück zu führen ist, blieben alle Sentinels in Kot und Serum negativ für MHV und MNV.

Die in der Raumluft vorhandene Viruslast während der 16 wöchigen Expositionszeit reicht nicht aus um Sentinels zu infizieren. Eine längere Verweildauer im Tierraum würde das Ergebnis vermutlich nicht ändern, da Pathogene im Sentinel nicht akkumulieren, sondern einmal eine ausreichend hohe Infektionsdosis vorhanden sein muss, um die Sentinels zu infizieren. Die Sentinels wurden in einem IVC Käfig gehalten, bei dem der Notfilter im Deckel entfernt worden ist. Der Käfig wurde auf einem IVC Regal vor der Raumentlüftungsöffnung platziert. Möglicherweise ist die Exposition der Sentinels zur Raumluft unter diesen Voraussetzungen zu gering.

Die PCR Untersuchung von IVC Zuluftvorfiltern auf MNV und MHV RNA zur Raumluftüberwachung ist dem Einsatz von Luftsentinels eindeutig vorzuziehen. Die Ergebnisse spiegeln innerhalb der Nachweisgrenzen den tatsächlichen Infektionsstatus der überwachten Mauskolonie wieder. Durch den Verzicht auf Mäuse als Bioindikatoren hat diese Untersuchungsmethode das Potenzial, eine Ersatzmethode für Luftsentinels in der Raumluftüberwachung von Virusinfektionen zu sein und leistet damit einen Beitrag zum 3R Prinzip (*Replacement*) [75].

5. Empfehlung zur Durchführung der MNV Überwachung in Mauskolonien mit IVC Haltung

Für ein optimales Hygienemonitoring sollte die serologische und die Kot PCR Untersuchung von Einstreusentinels mit der Untersuchung von IVC Zu- und Abluftfiltern mittels PCR kombiniert werden.

5.1. Untersuchung von Einstreusentinels mittels Serologie und Kot PCR

- 1.) Die PCR Untersuchung von Sentinelkot bzw. Sammeleinstreu ist die effizienteste Methode zur Detektion von MNV Infektionen in IVCs, wenn sie mehrmals während der Monitoringperiode durchgeführt wird. Sie ist der serologischen Untersuchung vorzuziehen.
- 2.) Ein Sentinelpaar sollte optimalerweise nur ein IVC Regal überwachen und aus jedem Käfig wöchentlich gebrauchte Einstreu erhalten.

Unter diesen Bedingungen kann ein Sentinelpaar schon bei Kolonieprävalenzraten von

8% nach 7 Wochen per Serologie, durch Sentinelkot PCR sogar bereits bei 1,6% Prävalenz nach zwei Wochen die Infektion anzeigen.

Ist die zu überwachende hygienische Einheit zu groß (hier zwei Sentinels für fünf IVC Regale) wird die Infektion erst bei über 20% Infektionsprävalenz von den Sentinels über MNV Serokonversion angezeigt.

5.2. Untersuchung von IVC Zu- und Abluftvorfiltern mittels PCR

1.) Die Untersuchung von IVC Abluftfiltern ist bei wiederholter Untersuchung (mindestens 5 Filter in Folge) eine sinnvolle Ergänzung zur Untersuchung von Einstreusentinelns. Sie kann häufiger durchgeführt werden (hier alle drei Wochen) und ist der serologischen Untersuchung zeitlich überlegen.

Es können Infektionen $\geq 15\%$ Prävalenz detektiert werden. Herausschaben von Staub aus dem unteren horizontalen Abluftrohr bringt bei 8% Prävalenz ein positives Ergebnis. Durch Verbesserung der Methoden zum Sammeln virushaltiger IVC Abluftstäube sollte es möglich sein, die Nachweisgrenze noch weiter zu senken.

2.) Die Untersuchung von IVC Zuluftvorfiltern eignet sich besonders in Räumen mit höheren Infektionsprävalenzen zur Detektion von MNV Infektionen.

MNV kann in IVC Zuluftvorfiltern in Tierräumen mit MNV Prävalenzen $\geq 26\%$ nachgewiesen werden. Längere Expositionszeiten über 43 Tage verbessern den Detektionserfolg.

6. Empfehlung zur Durchführung der MHV Überwachung in Mauskolonien mit IVC Haltung

6.1. Untersuchung von Einstreusentinelns mittels Serologie und Kot PCR

Kleinere vom Sentinel überwachte Einheiten und damit häufigere Einstreugaben können den Detektionserfolg von MHV durch die serologische Untersuchung von Sentinels in IVC Haltungen erhöhen.

1.) Die serologische Untersuchung von Einstreusentinelns zeigt zuverlässig MHV Infektionen in einer im IVC gehaltenen Mauskolonie an. Sentinel Kot PCR Untersuchungen sind aufgrund der kurzen Ausscheidungsphase und der damit verbundenen Gefahr, das diagnostische Fenster dieser Methode zu verpassen, nicht zu

empfehlen.

- 2.) Wie schon bei MNV diskutiert, sollte ein Sentinelpaar, um zuverlässige serologische Ergebnisse zu erzielen, optimaler Weise nur ein IVC Regal überwachen und aus jedem Käfig wöchentlich gebrauchte Einstreu erhalten.
- 3.) Da die aerogene Übertragung von MHV eine große Rolle spielt, ist es sinnvoll, die Sentinels, um die Infektionswahrscheinlichkeit zu erhöhen, zusätzlich der Abluft der IVC Regale auszusetzen [5].

6.2. Untersuchung von IVC Zu- und Abluftvorfiltern mittels PCR

- 1.) PCR Untersuchungen von Abluftvorfiltern können die Überwachung des MHV Status einer Mauskolonie unterstützen und liefern unter Feldbedingungen zuverlässigere und kontinuierlichere Ergebnisse als Einstreusentinels.

Unsere Beobachtungen deuteten darauf hin, dass Kolonieprävalenzraten von 10% von Einstreusentinels nicht mehr detektiert werden, im IVC Abluftvorfilter jedoch schon noch. Außerdem ist es möglich, diese häufiger (wie hier alle drei Wochen) zu untersuchen.

- 2.) Die PCR Untersuchung von IVC Zuluftvorfiltern gibt - sogar besser als für MNV - bei einer ausreichend langen Expositionszeit, nämlich über mindestens 43 Tage, den MHV Infektionsstatus der Mauskolonie im Tierraum wieder.

Im Gegensatz zu MNV wird die Infektion der Mauspopulation mit MHV schon bei niedrigeren Infektionsprävalenzraten um 20% detektiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BMLEV. *Tierversuchszahlen* 2009. Available from: http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2009-TierversuchszahlenGesamt.pdf;jsessionid=1A8F92448B14159FE6D37EB08BC5AC2_2.2_cid182?_blob=publicationFile.
2. Baker, D.G., *Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(2): p. 231-66.
3. Mahler, M. and W. Kohl, *A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and Mycoplasma pulmonis in laboratory mice and rats in western Europe*. Lab Anim (NY), 2009. **38**(5): p. 161-5.
4. Pritchett-Corning, K.R., J. Cosentino, and C.B. Clifford, *Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats*. Lab Anim, 2009. **43**(2): p. 165-73.
5. Brielmeier, M., et al., *Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: a field study*. Lab Anim, 2006. **40**(3): p. 247-60.
6. Clough, G., et al., *A positive, individually ventilated caging system: a local barrier system to protect both animals and personnel*. Lab Anim, 1995. **29**(2): p. 139-51.
7. GV-SOLAS, *Handhabung von Mikroisolatorkäfigen*, in *Ausschuss für Hygiene*, Y.U.W.N. Felix R. Homberger, DKFZ Heidelberg and U.H. Revised by Bettina Kränzlin, Editors.
8. Rosenbaum, M.D., et al., *Disparities in Ammonia, Temperature, Humidity, and Airborne Particulate Matter between the Micro-and Macroenvironments of Mice in Individually Ventilated Caging*. J Am Assoc Lab Anim Sci. **49**(2): p. 177-83.
9. Rosenbaum, M.D., S. VandeWoude, and T.E. Johnson, *Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironment*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009. **48**(6): p. 763-73.
10. Renstrom, A., G. Bjoring, and A.U. Hoglund, *Evaluation of individually ventilated cage systems for laboratory rodents: occupational health aspects*. Lab Anim, 2001. **35**(1): p. 42-50.
11. GV-SOLAS, *Implications of infectious agents on results of animal experiments. Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde--Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS)*. Lab Anim, 1999. **33 Suppl 1**: p. S39-87.
12. Nicklas, W., et al., *Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units*. Lab Anim, 2002. **36**(1): p. 20-42.
13. GV-SOLAS, *Hygieneüberwachung von Maus- und Rattenbeständen bei verschiedenen Haltungformen*, G.-S.A.f. Hygiene, Editor 2009.
14. GV-SOLAS, *Mikrobiologische Diagnostik bei Laboratoriumstieren*, ed. G.-S.V. Nr.111989.
15. Smith, P.C., et al., *Reliability of soiled bedding transfer for detection of mouse parvovirus and mouse hepatitis virus*. Comp Med, 2007. **57**(1): p. 90-6.
16. Lindstrom, K.E., et al., *Soiled bedding sentinels for the detection of fur mites in mice*. J Am Assoc Lab Anim Sci. **50**(1): p. 54-60.
17. Scharmann, W. and A. Heller, *Survival and transmissibility of Pasteurella pneumotropica*. Lab Anim, 2001. **35**(2): p. 163-6.
18. Mähler, M., *GV-SOLAS-Murines Norovirus*, 2007.
19. GV-SOLAS, *Handhabung von Mikroisolatorkäfigen*, Y.U.W.N. Felix R. Homberger, DKFZ Heidelberg and U.H. Revised by Bettina Kränzlin, Editors.

20. Thackray, L.B., et al., *Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10460-73.
21. Zheng, D.P., et al., *Norovirus classification and proposed strain nomenclature*. Virology, 2006. **346**(2): p. 312-23.
22. Karst, S.M., et al., *STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1575-8.
23. Mumphrey, S.M., et al., *Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3251-63.
24. Lencioni, K.C., et al., *Murine norovirus: an intercurrent variable in a mouse model of bacteria-induced inflammatory bowel disease*. Comp Med, 2008. **58**(6): p. 522-33.
25. Paik, J., et al., *Effects of murine norovirus infection on a mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance*. Comp Med, 2010. **60**(3): p. 189-95.
26. Artwohl, J.E., J.E. Purcell, and J.D. Fortman, *The use of cross-foster rederivation to eliminate murine norovirus, Helicobacter spp., and murine hepatitis virus from a mouse colony*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008. **47**(6): p. 19-24.
27. Kraus, M., *Nachweissicherheit von Murinem Norovirus durch Sentinelmonitoring und Einschätzung des Übertragungsrisikos beim Embryotransfer*, in *Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät 2011*, Ludwig Maximilian Universität, München. p. 112.
28. Manuel, C.A., et al., *Soiled-bedding sentinel detection of murine norovirus 4*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008. **47**(3): p. 31-6.
29. Perdue, K.A., et al., *Naturally occurring murine norovirus infection in a large research institution*. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2007. **46**(4): p. 39-45.
30. Goto, K., et al., *Molecular detection of murine norovirus from experimentally and spontaneously infected mice*. Exp Anim, 2009. **58**(2): p. 135-40.
31. Brian, D.A. and R.S. Baric, *Coronavirus genome structure and replication*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **287**: p. 1-30.
32. Escutenaire, S., et al., *SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses*. Arch Virol, 2007. **152**(1): p. 41-58.
33. Homberger, F.R., *Enterotropic mouse hepatitis virus*. Lab Anim, 1997. **31**(2): p. 97-115.
34. Barthold, S.W. and A.L. Smith, *Mouse hepatitis virus strain--related patterns of tissue tropism in suckling mice*. Arch Virol, 1984. **81**(1-2): p. 103-12.
35. Homberger, F.R., L. Zhang, and S.W. Barthold, *Prevalence of enterotropic and polytropic mouse hepatitis virus in enzootically infected mouse colonies*. Lab Anim Sci, 1998. **48**(1): p. 50-4.
36. Barthold, S.W., A.L. Smith, and M.L. Povar, *Enterotropic mouse hepatitis virus infection in nude mice*. Lab Anim Sci, 1985. **35**(6): p. 613-8.
37. Huang, D.S., et al., *Hepatic pathology resulting from mouse hepatitis virus S infection in severe combined immunodeficiency mice*. Lab Anim Sci, 1996. **46**(2): p. 167-73.
38. Cray, C., M.O. Mateo, and N.H. Altman, *In vitro and long-term in vivo immune dysfunction after infection of BALB/c mice with mouse hepatitis virus strain A59*. Lab Anim Sci, 1993. **43**(2): p. 169-74.
39. Fallon, M.T., et al., *Mouse hepatitis virus strain UAB infection enhances resistance to Salmonella typhimurium in mice by inducing suppression of bacterial growth*. Infect Immun, 1991. **59**(3): p. 852-6.
40. Wilberz, S., et al., *Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice*. Diabetologia, 1991. **34**(1):

- p. 2-5.
41. Compton, S.R., et al., *Pathogenesis of enterotropic mouse hepatitis virus in immunocompetent and immunodeficient mice*. *Comp Med*, 2004. **54**(6): p. 681-9.
 42. Compton, S.R., et al., *Pathogenesis of mouse hepatitis virus infection in gamma interferon-deficient mice is modulated by co-infection with Helicobacter hepaticus*. *Comp Med*, 2003. **53**(2): p. 197-206.
 43. Weir, E.C., et al., *Elimination of mouse hepatitis virus from a breeding colony by temporary cessation of breeding*. *Lab Anim Sci*, 1987. **37**(4): p. 455-8.
 44. Lipman, N.S., C.E. Newcomer, and J.G. Fox, *Rederivation of MHV and MEV antibody positive mice by cross-fostering and use of the microisolator caging system*. *Lab Anim Sci*, 1987. **37**(2): p. 195-9.
 45. Barthold, S.W., D.S. Beck, and A.L. Smith, *Mouse hepatitis virus and host determinants of vertical transmission and maternally-derived passive immunity in mice*. *Arch Virol*, 1988. **100**(3-4): p. 171-83.
 46. Carthew, P., M.J. Wood, and C. Kirby, *Pathogenicity of mouse hepatitis virus for preimplantation mouse embryos*. *J Reprod Fertil*, 1985. **73**(1): p. 207-13.
 47. Scavizzi, F. and M. Raspa, *Tissue distribution and duration of mouse hepatitis virus in naturally infected immunocompetent ICR (CD-1) and immunodeficient athymic nude-nu mouse strains used for ovarian transplantation and in vitro fertilization*. *Lab Anim*, 2004. **38**(2): p. 189-199.
 48. Kyuwa, S., *Replication of murine coronaviruses in mouse embryonic stem cell lines in vitro*. *Exp Anim*, 1997. **46**(4): p. 311-3.
 49. Compton, S.R., B.E. Vivas-Gonzalez, and J.D. Macy, *Reverse transcriptase polymerase chain reaction-based diagnosis and molecular characterization of a new rat coronavirus strain*. *Lab Anim Sci*, 1999. **49**(5): p. 506-13.
 50. Compton, S.R., et al., *Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack*. *Comp Med*, 2004. **54**(4): p. 382-92.
 51. Compton, S.R., et al., *Transmission of enterotropic mouse hepatitis virus from immunocompetent and immunodeficient mice*. *Comp Med*, 2004. **54**(1): p. 29-35.
 52. Hickman, D.L., *Persistent shedding of mouse hepatitis virus in mouse lines selected for genetic differences in alcohol sensitivity*. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2004. **43**(5): p. 19-21.
 53. Pullium, J.K., et al., *Confirmed persistent mouse hepatitis virus infection and transmission by mice with a targeted null mutation of tumor necrosis factor to sentinel mice, using short-term exposure*. *Comp Med*, 2003. **53**(4): p. 439-43.
 54. Rehg, J.E., M.A. Blackman, and L.A. Toth, *Persistent transmission of mouse hepatitis virus by transgenic mice*. *Comp Med*, 2001. **51**(4): p. 369-74.
 55. Barthold, S.W. and A.L. Smith, *Duration of mouse hepatitis virus infection: studies in immunocompetent and chemically immunosuppressed mice*. *Lab Anim Sci*, 1990. **40**(2): p. 133-7.
 56. Barthold, S.W., D.S. Beck, and A.L. Smith, *Enterotropic coronavirus (mouse hepatitis virus) in mice: influence of host age and strain on infection and disease*. *Lab Anim Sci*, 1993. **43**(4): p. 276-84.
 57. Emmoth, E., et al., *Ammonia disinfection of hatchery waste for elimination of single-stranded RNA viruses*. *Appl Environ Microbiol*. **77**(12): p. 3960-6.
 58. Barthold, S.W. and A.L. Smith, *Virus strain specificity of challenge immunity to coronavirus*. *Arch Virol*, 1989. **104**(3-4): p. 187-96.
 59. Gustafsson, E., et al., *Maternal antibodies protect immunoglobulin deficient neonatal mice from mouse hepatitis virus (MHV)-associated wasting syndrome*. *Am J Reprod Immunol*, 1996. **36**(1): p. 33-9.
 60. Homberger, F.R., *Maternally-derived passive immunity to enterotropic mouse*

- hepatitis virus*. Arch Virol, 1992. **122**(1-2): p. 133-41.
61. Oyanagi, M., et al., *Detection of MHV-RNAs in mouse intestines and in filter dust in mouse room ventilation duct by a modified RT-nested PCR*. Exp Anim, 2004. **53**(1): p. 37-41.
 62. Union, E.P.u.d.R.d.e., *RICHTLINIE 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere*, 2010: Amtsblatt der europäischen Union. p. 47.
 63. Baumans, V., et al., *Individually ventilated cages: beneficial for mice and men?* Contemp Top Lab Anim Sci, 2002. **41**(1): p. 13-9.
 64. Tecniplast, I. *seal-safe Plus mouse IVC green line- Produktbroschüre*. 2010 10/10 [cited 2011 06.09.]; Available from: [http://www.tecniplast.it/assets/products/CAT090%20ING Internet.PDF](http://www.tecniplast.it/assets/products/CAT090%20ING%20Internet.PDF).
 65. Hsu, C.C., et al., *Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses*. Comp Med, 2006. **56**(4): p. 247-51.
 66. Biosystems, A., *Real-Time PCR: Understanding Ct*, in *Publication 136AP01-012008*. p. 6.
 67. Sambrook, R., *Protocol 1.1 Preparation of plasmid DNA by Alkaline lysis with SDS:Miniprep*, in *The Condensed Protocols from molecular cloning: a laboratory Manual*2006, John Inglis: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p. 2-3.
 68. Applied, B., *Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR*, 2009. p. 9.
 69. Sambrook, R., *Appendix 3 Spectrometry of DNA and RNA*, in *The Condensed Protocols from molecular cloning: a laboratory Manual*2006, John Inglis: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. p. 740-741.
 70. Müller, B., *Molekulare Charakterisierung muriner Noroviren – phylogenetische und antigene Eigenschaften*;, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I2010*, Humboldt- Universität: Berlin. p. 112.
 71. GV-SOLAS, T., *Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren*, in *Publikationen des Ausschusses für Tierschutzbeauftragte A.f.T.i.d.G.-S.u.A.i.d. TVT*, Editor 2009.
 72. Kim, M., et al., *Molecular characterization of murine norovirus isolates from South Korea*. Virus Res, 2010. **147**(1): p. 1-6.
 73. Smith, G.D., et al., *Use of TaqMan reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis and serologic testing to eliminate an enzootic infection of mouse hepatitis virus*. Comp Med, 2002. **52**(5): p. 456-60.
 74. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
 75. Russell W. M, B.R.I., *Principles of Human Experimental Technique*1992: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW).

VIII. ANHANG

1. Abkürzungsverzeichnis

AHU	<i>air handling unit</i> = IVC Lüfter Einheit
Bp	<i>base pair</i> = Basenpaar
CCU	<i>cage changing unit</i> = Käfigwechselstation
cDNA/ RNA	<i>copy</i> DNA/RNA
C _q	Quantifizierungszyklus in der real-time PCR
FAM	6-Carboxyfluorescein
FELASA	Federation of laboratory animal science associations
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
HEPA	<i>high efficiency particle absorbance</i>
HMGU	Helmholtz Zentrum München
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IFA	Immunfluoreszenzassay
IVC	individuell belüfteter Käfig
MHV	murines Hepatitis Virus
MNV	murines Norovirus
MPV	murines Parvovirus
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RT	reverse Transkription
SCID	<i>severe combined immuno deficient</i>
SPF	spezifiziert Pathogen frei

2. Zusammenfassung MNV und MHV Infektionsdynamik bei Einstreusentinelns

Tabelle 34: Zusammenfassung MNV Infektionsdynamik bei Einstreusentinelns in offenen Käfigen (oben) aus Kraus,2011 [27] und IVCs (unten)

Raum	Sentinel	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13
6099	257	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
6099	258	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
6100	259	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
6100	260	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
6101	261	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	neg
6101	262	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
6113	269	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
6113	270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	neg
6114	271	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	nd	+
6114	272	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	nd	neg
6115	273	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	neg
6115	274	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	nd	+

Raum	Sentinel	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13
6094	330	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-
6094	331	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-
6095	332	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-
6095	333	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	nd	nd	nd	-
6096	334	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	nd	nd	nd	+
6096	335	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-
6097	336	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-
6097	337	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-
6098	338	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	+
6098	339	-	+	+	+	+	+	+	neg	neg	+	nd	nd	nd	+
6099	340	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	nd	nd	nd	-
6099	341	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	-
6100	342	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	nd	nd	nd	-
6100	343	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	-
6101	344	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	nd	nd	nd	-
6101	345	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	nd	nd	nd	-

+/- = Ergebnis der Sentinelkot PCR; Farbkodierung = Serologie (dunkelgrau: negativ, hellgrau: positiv, weiß: Serologie nicht untersucht)

Tabelle 35: Zusammenfassung MHV Infektionsdynamik bei Einstreusentineln in offenen Käfigen (oben) und IVCs (unten)

Raum	Sentinel	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12
6096	279	nd	+	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6096	280	nd	+	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6098	283	nd	-	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6098	284	nd	-	-	-	-	-	+	+	nd	nd	nd	nd	nd
6099	285	nd	+	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6099	286	nd	+	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6100	287	nd	+	+	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6100	288	nd	neg	neg	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6101	289	nd	+	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6101	290	nd	+	+	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Raum	Sentinel	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W13
6094	330	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	nd	nd	nd
6094	331	-	-	-	+	+	+	-	nd			nd	nd	nd
6095	332	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	nd	nd	nd
6095	333	-	-	-	+	+	+	-	nd			nd	nd	nd
6096	334	-	-	-	-	-	+	+	+			nd	nd	nd
6096	335	-	-	-	-	-	+	+	+	+		nd	nd	nd
6097	336	-	+	-	+	-	-	nd	nd			nd	nd	nd
6097	337	-	+	+	+	-	-	nd	nd			nd	nd	nd
6098	338	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
6098	339	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
6099	340	-	+	-	-	+	-	-	nd			nd	nd	nd
6099	341	-	+	+	-	-	-	nd	nd			nd	nd	nd
6100	342	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
6100	343	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
6101	344	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	nd	nd	nd
6101	345	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	nd	nd	nd

+/- = Ergebnis der Sentinelkot PCR; Farbkodierung = Serologie (dunkelgrau: negativ, hellgrau: positiv, weiß: Serologie nicht untersucht)

3. Zusammenfassung der MNV und MHV Feldstudie

Tabelle 36: Zusammenfassung der Ergebnisse der MNV Feldstudie

MNV			09/10		12/10			01/11	02/11	03/11			04/11			05/11		06/11		
Raum	Nutzer	start IVC	Sentinel	start IVC	Sentinel	Filter	Seropr.	Filter	Seropr.	Seropr.	Filter	Sentinel	Filter	Seropr.	Filter	Filter	Seropr.	Filter	Sentinel	Filter
6094	A		neg/neg	21.9	neg/neg	--/--	4%	--/--	0%	5%	--/--	neg/neg	--/--	0%	--/--	--/--	0%	--/--	neg/neg	+/-
6095	A		pos/pos	23.9	neg/neg	++/--	13%	+/-	nd	nd	++/--	neg/neg	--/--	nd	++/--	--/--	20%	++/--	neg/pos	++/--
6096	A		neg/pos	28.9	neg/pos	+++	26%	++/--	nd	nd	++/--	neg/pos	--/--	nd	--/--	--/--	0%	--/--	neg/neg	+/-
6097	D		neg/neg	19.8	neg/neg	--	nd	nd	0%	nd	--	neg/neg	--	nd	--	--	nd	--/--	neg	--
6098	B		neg/neg	19.10	neg/neg	++/--	nd	nd	100%	nd	+/-	neg/pos	++/--	nd	+/-	++/--	nd	++/++	neg/neg	++/--
6099	B		pos/pos	8.11	pos/pos	++/--	nd	++/--	nd	nd	+/-	neg/neg	++/++	nd	++/--	+/-	nd	++/++	pos/pos	+/-
6100	B		neg/pos	3.11	neg	+++	nd	+++	nd	nd	+/-	neg/neg	+++	nd	+++	+/-	nd	+++	neg/neg	+/-
6101	B		neg/pos	21.10	neg/neg	++/--	nd	+++	nd	nd	++/--	neg/neg	+++	nd	++/--	++/--	nd	+/-	neg/neg	++/--
6111	C		neg/neg	19.8	neg/neg	--/--	nd	--/--	nd	nd	--/--	neg/neg	--/--	nd	--/--	--/--	nd	--/--	neg/neg	--/--
6112	C		neg/neg	17.8	neg/neg	--/--	nd	--/--	nd	0%	--/--	neg/neg	--/--	nd	--/--	--/--	nd	--/--	neg/neg	--/--
6113	E	14.7	neg/neg		neg/neg	--/--	nd	--/--	nd	nd	--/--	neg/neg	--/--	nd	--/--	--/--	nd	--/--	neg/neg	--/--
6114	E	9.6	neg/neg		neg/neg	+++	94%	++/--	63%	52%	++/--	pos/pos	+/-	63%	++/--	++/--	67%	++/--	neg/pos	+++
6115	E	14.6	neg/pos		pos/pos	+++	nd	++/--	nd	nd	--/--	neg/pos	--	nd	--	++	96%	++	neg/pos	++

Sentinel: Einstreusentinel im Routinehygienemonitoring, Filter: jeweils Abluftfilter PCR der rechten und linken Raumseite (je 2 Proben untersucht), Seropr: Seroprävalenz der Kolonie(im Raum 6114 nur 12-16 Wochen alte Mäuse), Raum 6113: im Juni 2011 durch Embryotransfer hygienisch saniert. In den rot markierten Räumen wurden zwischen Ende Februar und Mitte Juni Raumlufsentinels eingesetzt

Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse der MHV Feldstudie

MNV			09/10		12/10			01/11	02/11	03/11			04/11			05/11		06/11		
Raum	Nutzer	start IVC	Sentinel	start IVC	Sentinel	Filter	Seropr.	Filter	Seropr.	Seropr.	Filter	Sentinel	Filter	Seropr.	Filter	Filter	Seropr.	Filter	Sentinel	Filter
6094	A		neg/neg	21.9	neg/neg	--/--	4%	--/--	0%	5%	--/--	neg/neg	--/--	0%	--/--	--/--	0%	--/--	neg/neg	+/-
6095	A		pos/pos	23.9	neg/neg	++/--	13%	+/-	nd	nd	++/--	neg/neg	--/--	nd	++/--	--/--	20%	++/--	neg/pos	++/--
6096	A		neg/pos	28.9	neg/pos	+++	26%	++/--	nd	nd	++/--	neg/pos	--/--	nd	--/--	--/--	0%	--/--	neg/neg	+/-
6097	D		neg/neg	19.8	neg/neg	--	nd	nd	0%	nd	--	neg/neg	--	nd	--	--	nd	--/--	neg	--
6098	B		neg/neg	19.10	neg/neg	++/--	nd	nd	100%	nd	+/-	neg/pos	++/--	nd	+/-	++/--	nd	++/++	neg/neg	++/--
6099	B		pos/pos	8.11	pos/pos	++/--	nd	++/--	nd	nd	+/-	neg/neg	++/++	nd	++/--	+/-	nd	++/++	pos/pos	+/-
6100	B		neg/pos	3.11	neg	+++	nd	+++	nd	nd	+/-	neg/neg	+++	nd	+++	+/-	nd	+++	neg/neg	+/-
6101	B		neg /pos	21.10	neg/neg	++/--	nd	+++	nd	nd	++/--	neg/neg	+++	nd	++/--	++/--	nd	+/-	neg/neg	++/--
6111	C		neg/neg	19.8	neg/neg	--/--	nd	--/--	nd	nd	--/--	neg/neg	--/--	nd	--/--	--/--	nd	--/--	neg/neg	--/--
6112	C		neg/neg	17.8	neg/neg	--/--	nd	--/--	nd	0%	--/--	neg/neg	--/--	nd	--/--	--/--	nd	--/--	neg/neg	--/--
6113	E	14.7	neg/neg		neg/neg	--/--	nd	--/--	nd	nd	--/--	neg/neg	--/--	nd	--/--	--/--	nd	--/--	neg/neg	--/--
6114	E	9.6	neg/neg		neg/neg	+++	94%	++/--	63%	52%	++/--	pos/pos	+/-	63%	++/--	++/--	67%	++/--	neg/pos	+++
6115	E	14.6	neg/pos		pos/pos	+++	nd	++/--	nd	nd	--/--	neg/pos	--	nd	--	++	96%	++	neg/pos	++

Sentinel: Einstreusentinel im Routinehygienemonitoring, Filter: jeweils Abluftfilter PCR der rechten und linken Raumseite (je 2 Proben untersucht), Seropr: Seroprävalenz der Kolonie(im Raum 6114 nur 12-16 Wochen alte Mäuse), Raum 6113: im Juni 2011 durch Embryotransfer hygienisch saniert. In den rot markierten Räumen wurden zwischen Ende Februar und Mitte Juni Raumluftsentinels eingesetzt

4. Sequenz MNV Neuherberg U1

>MNV Neuherberg U1

```
GTGAAATGAGGNCCNCCNNNNNNNNNNNTGCGTCCCTCTGTGCGCAACACAGAGAAACGNN
NAAACAANAAGGCTTCATCTAAGGCTAGCGTCTCCTTTGGAGCACCTAGCCCCCTCTCTT
CGGAGAGTGAAGATGAAGTAACTACATGACCCCTCCTGAGCAGGAAGCTCAGCCCGGCA
CGTTGCGGGCCCTTATGGCCATGGGCCCATGCTGGGCTCCCGTGACGCGAAGTGATG
CACGCGTGCTGATCTCAATGAATGGGAGGAGAGGAAGAAGTCTGAGCCGTGGCTACGGC
TGGACATGTCTGACAAAGGCTATCTTCCGCCGCTTCCCCATCTGCGGCCGAAGGAGGATA
AAGCTGACGCGCCCTCCCATGCGGAGGACGCCATGGATGCCAAGGGAGCCCGCGATTGG
CTTCGATCTTGGAAACAGGATGACCACAAGTTCTACCATTACTCTGTCTACATCGGTAATG
GCCTTGTGATGGGAGTCAACAACCCCTGGTGCCGAGTTTGCCAAGCGGTGATCGACGTGG
AGAAGCTGCACCTCTGGTGGAGGCCGCTCTGGGAGCCCCGCCAGCCCTCGACTCGGCTG
AGTTGAGGAAGTGTGGCCATGACTGTCCCTTATGTGGCCACCCTGTCAACTGCTACC
AGGTGTGTTGCTGGATTTGGGAATCAAGGACACTTGGCTGAAGAGGGCGAAGATCTCCAG
GGACTCGCCCTTCTACAGCCCTGTCCAGGACTGGAATACTGATCCCCAGGAGCCTTTCGT
CCCGTCCAAGCTCAGGATGGTCTCTGACGGCATTCTGGTGGCCCTGTCAACGGTGATTGG
TCGGCCGATCAAGAACCTGTTGGCCTCGGTTAAGCCGCTCAACATTTCAACATCGTGTT
GAGCTGTGATTGGACCTTCTCGGCCATTGTCAACGCCCTGATTCTCCTTGTGAGCTCTT
TGACATCTTCTGGACCCCCAGATGTCACCAACTGGATGATCTCCATTTTCGGAGAATG
GCAGCCCGAGGGCCCTTCGACCTCGCCCTTGATGTGTTCACCCCTGCTGGGAGGGAT
TGGGATGGCCTTTGGCCTGACCTCCGAGACCATCGGGCGCAAGCTTGCCCTCCACCAACTC
GGCCCTGAAGGCTGCGCAGGAGATGGGCAAGTTTGCCATTGAGGTCTTCAAGCAGATCAT
GGCTGGATCTGGCCCTCTGAAGATCCAGTGCCAGCCCTCCTGTCCAACATGGAGCAAGC
TGTTCATTAAGAATGAGTGCCAGCTGGAGAACCAGCTCACGGCCATGTTGCGGGATCGCAA
CGCCGGAGCTGAGTTCTGAAGTCCCTTGATGAGGAAGAACAAGAGGTCCGCAAGATTGC
GGCCAAGTGTGGCAACTCGGCCACCACGGGGACCACCAATGCCCTCCCTGGCTAGGATCAG
CATGGCTCGCGCAGCCTTTGAGAAGGCTCGCGCCGAGCAGACCTCCCGGGTTCTGCCCGT
GGTGATCATGGTCTCAGGCAGGCCCGGGATCGGGAAAACCTGCTTCTGCCAGAACCCTCGC
CAAGAGGATTGCCGCATCCCTTGGTGATGAGACCTCGGTGCGCATCATACCACGCGCCGA
TGTGACCATTTGGGATGCCTACAAGGGAGCCAGAGTAGTTCTTTGGGATGACTTTGGTAT
GGACAACGTGGTGAAGGATGCGTTGAGGCTTCAGATGCTTGTGACACGTGTCCAGTCAC
CCTCAACTGTGACAGGATGAGAACAAGGGCAAGATGTTTGAATCCCAAGTCATCATCAT
CACCACCAACCAGCAAACCCAGTCCGCCCTGGATTAATGTCAACCTTGAGGCGGTCTGCCG
CCGCATAGACTTCTTGGTCTATGCCGAGAGCCCCGTTGTTGATGTGCTCGAGCCAGATC
ACCGGGTGATGTGGCCGCCGTCGCAAGGCCCATGAGACCAGATTACAGCCACATCAATTT
CATCTTGGCACCCAGGGCGGCTTCGACCCGCGAGGGCAACACCCCTATGGCAAGGGCGT
CACCAAGATCATTTGGCCACCAGCGCTCTGCGCAAGGGCGGTCGCCCTTGTTCATGAACG
CCTATGATGATTTTGGCCTCCAGAACAAGTCTACGACTTTGACGCTGGCAAGGTCACCTGC
CTTCAAGGATGACACAGCGGACGCTGGTATCCCATGTTACAAGATGGCAGCAATTGGATG
CAAGGCTATGGGCTGCACCTGCGTGGAGAAGCCATGAATTTGCTCAAGGATTATGAGGT
GGCCCCGTGCCAGGTGATCTATAATGGCGCTACCTACAATGTGAGCTGCATTAAGGGTGC
CCCTATGGTTGAGAAGGTTAAGGAGCCTGAGCTGCCAAGACACTTGTCAACTGTGTGAG
AAGGATAAAAGAGGGCCCGCTCCGCTGCTATTGCAGGATGGCCACCGATGTCATCACTTC
CATCCTGCAAGCAGCCGGGACGGCCTTCTCCATTTACCACCAGATTGAGAAGAAATCTAG
ACCTCTTTTTACTGGGATCAGGATACACCTACCGTGATGGGCCCGGGCCTTTGATCT
CTTTGAGGATGACAAACGACGTTGGTACCATTCTGAGAGTAAGAAGGGTAAGAACAAGAA
GAGCCGAGGGCGGCCCTGGTGTTTTTCAAATCCCGTGGGCTCACGGATGAGGAGTACGATGA
GTTCAAGAAACGCCGCGAGTCCAAGGGCGCAAGTACTCCATTGATGACTACCTTGTGTA
TCGTGAGCGATAANAGGAGCTCCGGAGCGTGATGAGGAGGAGCCATCTCGGGGACGGC
TNCNCCNNAAGGNACACGCCGCTCCCGCAAATGCGGAGAGGGCCANNCTTAGCCTGGT
CTCGGGTGGTGACATCCGTGCCCGCAAACCTATTGACTGGAATGTGGTTGGCCCCCTCTG
GGCTGACGACGACGCCAGGTCGACTATGGTGAGAAGATCAACTTTGAGGCCCCAGTTTC
AATATGGTCCCGTGTGTGCAATTCGGAACGGGATGGGGCTTCTGGGTTAGCAGCCATGT
GTTTCATCACTGCTAAACATGAGGCCCCAGTTAAGGGCACAGAAGTGTTTGGGCGCAAGCC
TGAAGAATTCACCGTCACTTCCAGTGGAGACTTCTGAAATACAACCTCACCAGTGCTGT
CAGGCTGACATCCCTGCCATGGTTTGGAAAACGGCTGCCAGGAGGGTGTCTGTCGCCCTC
GGTTCTCGTTAAGAGGGCCTCTGGCGAGATGCTCGCCTTGGCGGTGAGGATGGGCTCGCA
AGCCGCCATTAAGATTGGCAGCGCCGTTGGTGCATGGACAACTGGCATGCTTCTAACCGG
TTCCAATGCCAAGGCCAAGATCTCGGGACCATCCCGGGGATTTGCGGCTGCCCCCTATGT
CTATAAGAAAGGAAACACCTGGGTAGTGATTGGAGTGCATGTGGCGGCCACCAGGTCTGG
CAACACAGTTCATCGCTGCCACCCATGGGGAGCCACGCTTGGAGCTCTGGAGTTTCAAGG
TCCCCCTATGCTTCCCGCCCTCTGGGACCTATGCTGGCCTCCCAATCGCCGATTACGG
CGACGCCCCCTTTGAGCACAAGACCATGTTTTGGCGCACCTCACCAGAAAAGCTCCC
CCCCGGGGCTTGGGAGCCCGCTATCTTGGCTCCAAAGATGAGAGAGTGGATGGCCCCCTC
CTTGCAACAAGTTCATGCGCGACCAGCTCAAGCCCTTCTCAGAGCCGCGCGCCTACTTCC
CCCTCAGGAGATTTTGGATGCGGCTGCGCATGCCATCGAGAACCCTTGAAAACACCCCT
```

CGAACCACAGAAGCCCTGGACATTCAGAAGGCCCTGCGAGAGCCTGGACAAGAACCAG
CAGTGGGTATCCCTACCATAAACAGGAAGACAGGGATTGGACGGGGACCGCCTTCATCGG
CGAGCTCGGTGACCAGGCCACCCACGCCAACACATGTATGAGATGGGTAAGCCCATGCG
GCCATCTACACAGCCGCACCTCAAGGATGAATTGGTTAAGCCAGACAAAATTTACAAGAA
GGTGAAGAAAAGGCTTCTCTGGGGCTCTGATCTTGGCACCATGATCCGTGCTGCTCGCGC
CTTTGGCCCTTTCTGTGATGCCCTAAAAGAGACTTGCATTTTCAATCCCATCAGAGTGGG
CATGTCAATGAACGAGGATGGTCCCTTCATCTTTGCTAGGCATGCCAATTTTAGATACCA
TATGGATGCAGATTATCCAGGTGGGACTCCACCCAGCAGAGGGCCATCTTGAAGCGCGC
CGGTGACATTATGGTGCGCCTCTCTCCTGAGCCAGAGTTGGCCCGTGTAGTGATGGATGA
CCTCTTGGCCCCCTCGCTGCTGGATGTCCGGCAGTACAAGGTCGTCGTCGAAGAGGGGCT
TCCGTCTGGTTGCCCTTGCACCACACAGCTAAACAGCCTGGCCCACTGGATCCTAACTCT
TTGTGCAATGGTTGAAGTGACCCGGATTGATCCCGATATTGTGATGCAAGAGTCTGAGTT
CTCCTTCTATGGTGATGATGAGGTGGTTTCAACTAATCTTGAATTGGATATGACCAAATA
TACCATGGCCCTGAAGCGGTATGGTCTCCTCCCAGCGCTGCGGACAGGAGGAGGGGCC
CCTGGAGCGTCCAGACGCTGCAGGGTATCTCCTTCTTGGCGCCGCGGATAATCGGTGA
CCAATTTGGTTGGTATGGTCTCTCGACCCGCGCCAGCATCGAACGCCAGCTTCTTTGGAC
TAAAGGACCAATCAACAGAAATCCCTTCGAGACTCTCCAGGACATGCTCAGAGACCTC
CCAATTAATGGCCCTGCTCGGTGAGGCTGCCATGCATGGTGAAAAGTATTACAGGACTGT
GGCTTCCCGGTCTCCAAGGAGGCCGCCATAGTGGGATAGAGATGGTGGTCCCACGCCA
CCGGTCTGTTCTGCGCTGGGTGCGCTTTGGAACAATGGATGCTGAGACCCCGCAGGAACG
CTCAGCAGTCTTTGTGAATGAGGATGAGTGATGGCGCAGCGCCAAAAGCCAACGGCTTG
AAGCCAGCGGCCAGGATCTTGTTCCTACCGCCGTTGAACAGGCCGTCCTCCATTCAGCCCG
TGGCTGGCCGCTCTCTTCCGCCCCCGCCGCGGCAATCAACCAAATGACCCCTGGA
TCTTCCAAAATTTTGTGCAATGCCCTTGGTGAGTTTTCATTTCACTCGAAAACACCC
CAGGTGAAAATATTGTTGATTTGGCCCTCGGGCCAGGGCTCAACCCCTACCTTGCCACC
TCTCAGCCATGTACACCGCTGGGTGGGAACATGGAGGTTTCCAGTGGTCTCGCCGGCA
ATGCCCTTACTGCTGGCAAGGTGGTTGTTGCCCTTGTACCACCTATTTCCCAAAGGGT
CACTCACCCTGCTCAGATCACATGTTCCACATGTCATGTGTGATGTGCGCACCCCTGG
AGCCCATTAACCTCCCTCTTCTTGACGTGCGTTCGAGTTCTTTGGCATGCTACCCAGGATC
AGGAGAACTATGCGCCTGGTCTGCATGCTATACACGCCACTCCGCACAAACAGCCCGG
GTGATGAGTCTTTTGTGGTCTCTGCGCCGCTTCTTTCTAAGCCGGCAGCTGATTTCAACT
TTGTATACCTGACCCCCCATTGAGAGAATATCTACCGGATGGTTGACCTGCCCGTGT
TGCAGCCGCGGCTGTGACGCACGCTCGTTGGCCGGCTCCGGTCTATGGCCTCTTGGTGG
ACCCATCCCTCCCTCCAACCCCAAGTGGCAGAATGGAAGAGTGACATCGATGGAACCC
TCCTTGGGACAACACCCGTGTCTGGATCCTGGGTTTCTTGCTTCCGACGCTGAGGCTGCCT
ATGAGTTCCAATCTGGGGTTGGTGGAGTGGCAACCTTACCATGATTGAGCAGGATGGGT
CCGCTACGTCCTTGGTGACAGGGCGCCCCCTCGGATACCCGACTTCTCCGGGCAAC
TGGAGATCGAGGTTGAGACTGAGACTACCAAGACTGGAGACAAACTTGGGGTGACCACCT
TTGAGATGACCCTTGGTCTTACCACCAACGTGGACCAGGCCCTTACCAGGGCAGGGCGT
ATGCAAGCCTCACGTTGCGGCCCTCGCTTACCTGGTGGACGGGAGGGTTAGGGCAGTCC
CACGCTCCATCTATTCCTTTTCCAGGATGTGCTCCCAGAAATAATGATGGTCTTTTGGTTC
CCCTTGGCCCGCCCTAGGCCCTTCTCCCGGTGAGGTTCTTGTGAGGTTCCGGACCT
ACATGCGTCAGGTTGACTCTGCTGACGCCACAGCGCAACCGATTGACTGTGCCTTGCCCTC
AGGAGTTCACTCCTGGTTGCAAGCAACAACCTTCAAGTTCAATCGGAGGCGCTCCTGG
TCAGGTATCGGAATACCTTACTGGCCAGCTCCTGTTTGGAGGCTAAGCTCTATAGCGAAG
GCTACATTGCTGTGCTTACTCAGGGTCTGGCCCCCTACCTTYCCACCGACGGCTTCT
TTGAGGTCGTTAGCTGGGTTCCCGCCTCTTTCAATTGGCCTCTGTGGGAAGCTTGGTGA
CAGGCCGAACACTCAAACAATAATGGCTGGTGCATTTTGGTGCATTTGGAGGTGGCCT
GATGGGCATAATTGGCAATTCATCTCAACAGTCCAGAACCTTCCAGGCAACAAACAAT
GGCTGCACAACAATTTGGCTATAAATCCTCTTTGCTTGAACGCAAAATTCAGGCCAGAA
GGATCTCACACTGATGGGGCAGCAATTC AACAGCAGCTCCAAGCCAACCTTTTCAAGCA
TGACCTTGAAGTGTGGCGCCAGGTGCAAGCCAGGCGCAGGCCAGGAGAACGCAAT
CAATATCAGATCGGCGCAACTCCAGGCCGAGGCTTCTCAAAGTCCGACGCCATTCGCCT
GKCTCGGGACAGCAGCCGACGAGGGCCGTTGACTGGTCTGGGACGCGGTATTATACCGC
CAACCAACCGGTTACGGGCTTCTCGGGTGGCTTACCCCAAGTTACTTCCAGGTAGGCA
AATGGCAGTCCGCCCTGTGGACACATCCCCCTTACCATCTCGGGTGGGCGCATGCCGTC
CCTTCGTGGAGGTTCTGGTCTCCGCGTGATTACACGCCGACAGCCAGGGCTCCTACAC
GAACGGGCGGTTTGTGCTTCCCAAAGATCGGGAGCAGCGGCATAGGTTGGAAGAGA
AACCTTCTGTGAAAATGATTTCTGCTTACTGCTCTTTCTTTTGGTAGTATTTAGATGC
ATTTT

5. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Kalkulation der erforderlichen Stichprobengröße bei offener Haltung aus Kolonien > 100 Individuen zur Detektion von Pathogenen abhängig von der Prävalenzrate für unterschiedliche Konfidenzlevel (aus [12] Tabelle 1)	15
Abbildung 2: Raumplan Kleintierhaus.....	28
Abbildung 3: Maushaltung in offenen Käfigen.....	29
Abbildung 4: Luftgeschwindigkeit und Strömungsrichtung in „GM 500“ Mausekäfigen (Tecniplast) [64]	30
Abbildung 5: Luftstrom im IVC System,.....	31
Abbildung 6: Raumlufsentinels.....	34
Abbildung 7: Abluftstaubgewinnung aus dem unteren Abluftrohr mit dem Staubkratzer	35
Abbildung 8: Probennahme aus IVC Luftvorfiltern	36
Abbildung 9: IVC Luftvorfilter mit Gazestücken	37
Abbildung 10: Schwerkraftstaubsammler an der IVC Lüfter Einheit.....	38
Abbildung 11: Quantifizierung in der RT-qPCR am Beispiel des MHV RT-qPCR assays. Auf der y-Achse ist die normalisierte Fluoreszenz (Delta Rn) linear angegeben. Die fünf Kurven von links nach rechts sind jeweils Triplikate des RNA Standards von 3×10^6 bis 3×10^2 Kopien/Ansatz. Der Schwellenwert wurde für sämtliche Auswertungen auf 0,2 gesetzt.....	43
Abbildung 12: MNV DNA Standard (4162bp) +NcoI, XmaI ergibt 2 Fragmente (1751bp, 2409bp) GeneRuler™100bp plus DNA Ladder	44
Abbildung 13: RNA Standard nach DNase Verdau und Gelelektrophorese (0,8% Agarose). 46	
Abbildung 14: MNV Übertragung auf Einstreusentinels in fünf Tierräumen mit offenen Käfigen; n=10, 2 Sentinels pro Tierraum	55
Abbildung 15: MHV Übertragung auf Einstreusentinels in fünf Tierräumen mit offenen Käfigen; n=10, 2 Sentinels pro Tierraum	56
Abbildung 16: PCR Untersuchung von Abluftstäuben aus Mausräumen im Kleintierhaus mit offenen Käfigen (Juni 2009).....	57
Abbildung 17: MNV Übertragung auf Einstreusentinels in fünf Tierräumen (6096 und 6098-6101) mit IVCs, n=10; 2 Sentinels pro Tierraum.....	60
Abbildung 18: MHV Übertragung auf Einstreusentinels in fünf Tierräumen (6096 und 6098-6101) mit IVCs, n=10; 2 Sentinels pro Tierraum.....	61
Abbildung 19: Standard Mausraum im KTH mit IVCs. AHU („air handling unit“) IVC Lüfter Einheit, CCU(“ cage changing unit“) Käfigwechselstation.....	62

Abbildung 20: MHV Serologie bei 12-16 Wochen alten Mäusen im Raum 6114	71
Abbildung 21: MNV Serologie bei 12-16 Wochen alten Mäusen in Raum 6114	72
Abbildung 22: Schritt 1: 1 Käfig mit 5 MNV infizierten Crl:CD1, ES= Einstreusentinel	75
Abbildung 23: Schritt 2: 5 Käfige mit jeweils 5 MNV infizierten Crl:CD1, ES= Einstreusentinel	75
Abbildung 24: Schritt 3: 8 Käfige mit jeweils 5 MNV infizierten Crl:CD1, ES= Einstreusentinel	75
Abbildung 25: Lage der PCR Produkte zur Sequenzierung von MNV Neuherberg U1.....	79
Abbildung 26: Phylogenetischer Stammbaum für MNV Neuherberg U1	80
Tabelle 1: TBE Puffer: pH 8,3	25
Tabelle 2: TE-Puffer: pH 7,4.....	25
Tabelle 3: Übersicht der untersuchten Tierräume und Umrüstungszeitpunkte auf IVC Haltung	28
Tabelle 4: Mastermix der konventionelle RT-PCR.....	39
Tabelle 5: Primer MNV konventionelle RT-PCR.....	40
Tabelle 6: MNV PCR Produkt (187bp).....	40
Tabelle 7: Temperaturprotokoll konventionelle RT-PCR MNV	40
Tabelle 8: Primer MHV konventionelle RT-PCR.....	41
Tabelle 9: MHV PCR Produkt (534bp).....	41
Tabelle 10: Temperaturprotokoll konventionelle RT-PCR MHV	41
Tabelle 11: Mastermix RT-qPCR (Agpath-ID™ One-Step RT-PCR Kit, Ambion)	47
Tabelle 12: Temperaturprotokoll RT-qPCR	47
Tabelle 13: Primer & Sonde MNV RT-qPCR	48
Tabelle 14: MNV RT-qPCR Produkt (92bp)	48
Tabelle 15: Primer & Sonde MHV RT-qPCR	48
Tabelle 16: MHV RT-qPCR Produkt (63bp)	48
Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Primer zur Sequenzierung des MNV Isolates	51
Tabelle 18 : Temperaturprotokoll für lange PCR Produkte zur Sequenzierung	52
Tabelle 19: Legende Sentinelerologie	53
Tabelle 20: Historische Einstreusentinelsergebnisse für MNV in offenen Käfigen zwischen September 2008 und Juni 2010 (Serologie, ELISA)	53
Tabelle 21: Historische Einstreusentinelsergebnisse für MHV in offenen Käfigen zwischen September 2008 und Juni 2010 (Serologie, ELISA)	54

Tabelle 22: MNV bei Einstreusentinelns in IVCs nach der Haltungsumstellung (Serologie, ELISA).....	58
Tabelle 23: MHV bei Einstreusentinelns in IVCs nach der Haltungsumstellung (Serologie, ELISA).....	59
Tabelle 24: Tabellenlegende zu IVC Luftvorfilteruntersuchung	62
Tabelle 25: Untersuchung von IVC Abluftvorfiltern auf MNV im Vergleich zur MNV Kolonieseroprävalenz in demselben Raum	63
Tabelle 26: Untersuchung von IVC Abluftfiltern auf MHV im Vergleich zur MHV Kolonieseroprävalenz in demselben Raum	64
Tabelle 27: MNV, Einfluss der Abluftvorfilter Expositionsdauer	65
Tabelle 28: MHV Einfluss der Abluftvorfilter Expositionsdauer	66
Tabelle 29: Raumluftüberwachung: IVC Zuluftvorfilter PCR Ergebnisse im Dezember 2010 und Juli 2011 nach unterschiedlich langen Expositionszeiten.	67
Tabelle 30: Übersicht der MNV Seroprävalenz in der Kolonie von Dezember 2010 bis Mai 2011	69
Tabelle 31: Übersicht der MHV Seroprävalenz in der Kolonie von Dezember 2010 bis Juni 2011	70
Tabelle 32: Übersicht der MNV Prävalenz in Bezug auf die absolute Anzahl infizierter Mäuse und die Anzahl infizierter Käfige.	74
Tabelle 33: Ergebnisse des Infektionsexperiments: Nachweissensitivität von MNV im Abluftstaub und bei Einstreusentinelns	78
Tabelle 34: Zusammenfassung MNV Infektionsdynamik bei Einstreusentinelns in offenen Käfigen (oben) aus Kraus,2011 [27] und IVCs (unten)	105
Tabelle 35: Zusammenfassung MHV Infektionsdynamik bei Einstreusentinelns in offenen Käfigen (oben) und IVCs (unten).....	106
Tabelle 36: Zusammenfassung der Ergebnisse der MNV Feldstudie	107
Tabelle 37: Zusammenfassung der Ergebnisse der MHV Feldstudie	108
Formel 1: Berechnung Plasmidmasse (m) aus [68], n= Anzahl Basenpaare	45
Formel 2: Berechnung der Masse einer beliebigen Kopienzahl (k) bei 5µl Einsatz in der qPCR (mx)	45

6. Gesundheitszeugnisse für das Kleintierhaus (KTH) und die SPF Stammzucht (Container)

HelmholtzZentrum münchen
German Research Center for Environmental Health

Health Certificate

Comparative Medicine		Accumulative results since März 10	Latest test results		Laboratory	Method
Area / Room Number:	KTH, 6094-6115		positive	tested		
Species:	Mouse			Date: 09.09.2011		
Strain:	Swiss, Sentinel			Ref: mfd 385		
Viruses						
Mouse hepatitis virus (MHV)	3 months	101 / 161	2 / 30	mfd	ELISA	
Mouse rotavirus (EDIM)	3 months	0 / 161	0 / 30	mfd	ELISA	
Mouse minute virus (MMV)	3 months	0 / 161	0 / 30	mfd	ELISA	
Mouse parvovirus (MPV)	3 months	0 / 161	0 / 30	mfd	ELISA	
Mouse norovirus (MNV)	3 months	47 / 161	5 / 30	mfd	ELISA	
Pneumonia virus of mice (PVM)	3 months	0 / 161	0 / 30	mfd	ELISA	
Sendai virus (SV)	3 months	0 / 161	0 / 30	mfd	ELISA	
Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	3 months	0 / 161	0 / 30	mfd	ELISA	
Ectromelia virus (ECTR)	annually	0 / 54	nt / nt	mfd	ELISA	
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	annually	0 / 54	nt / nt	mfd	ELISA	
Mouse adenovirus type 1 (FL) (MAV1)	annually	0 / 54	nt / nt	mfd	ELISA	
Mouse adenovirus type 2 (K87) (MAV2)	annually	0 / 54	nt / nt	mfd	ELISA	
Mouse cytomegalovirus (CMV)	annually	0 / 54	nt / nt	mfd	ELISA	
Reovirus type 3 (REO3)	annually	0 / 54	nt / nt	mfd	ELISA	
Bacteria & Mycoplasma						
<i>Citrobacter rodentium</i>	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Culture	
<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's disease)	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	ELISA	
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Culture	
<i>Mycoplasma</i> spp.	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	ELISA	
Pasteurellaceae 1)	3 months	10 / 159	1 / 30	mfd	Culture	
<i>Salmonella</i> spp.	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Culture	
Streptococci β -haemolytic	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Culture	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Culture	
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	PCR/ Culture	
<i>Helicobacter</i> spp.	annually	0 / 54	nt / nt	mfd	Culture	
Parasites & Protozoa						
<i>Aspiculuris</i> sp.	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Micr/ Flotation	
<i>Syphacia</i> spp.	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Micr/ Flotation	
Coccidia	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Micr/ Flotation	
<i>Giardia</i> spp.	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Micr/ Flotation	
<i>Spironucleus muris</i>	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Micr/ Flotation	
<i>Trichomonas</i> sp.	3 months	74 / 159	9 / 30	mfd	Micr/ Flotation	
Others 2)	3 months	18 / 159	2 / 30	mfd	Micr/ Flotation	
Ectoparasites	3 months	0 / 159	0 / 30	mfd	Microscopy	
Pathological lesions						
none observed						

Comments:

Presence of opportunistic organisms will be communicated upon request.

1) *Pasteurella pneumotropica*

2) *Entamoeba* sp., *Enteromonas* sp.

mfd: mfd Diagnostics, Dr.B.Lecher, S.Maurer, Wendelsheim; nt: not tested

All mice presented in good condition and had good coverage of body hair.
In all animals there was no evidence of faecal soiling around the anus.
At necropsy, no abnormality detected in any of the organs.

Neuherberg,
26.09.2011

Markus Brielmeier, DVM
Head of Comparative Medicine

Health Certificate

Comparative Medicine		Accumulative results since Mar-10	Latest test results		Laboratory Method	
Area / Room Number:	Container 7060-7063 Mouse Swiss, Sentinel		positive / tested	positive / tested		
Species:				Date: 06.09.2011		
Strain:				Ref: mfd		
				Rep #: 374		
Viruses						
Mouse hepatitis virus (MHV)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Mouse rotavirus (EDIM)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Mouse minute virus (MMV)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Mouse parvovirus (MPV)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Mouse norovirus (MNV)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Pneumonia virus of mice (PVM)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Sendai virus (SV)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Ectromelia virus (ECTR)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Mouse adenovirus type 1 (FL) (MAV1)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Mouse adenovirus type 2 (K87) (MAV2)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Mouse cytomegalovirus (CMV)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Reovirus type 3 (REO3)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Bacteria & Mycoplasma						
<i>Citrobacter rodentium</i>	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Culture	
<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's disease)	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Culture	
<i>Mycoplasma</i> spp.	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	ELISA	
Pasteurellaceae	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Culture	
<i>Salmonella</i> spp.	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Culture	
Streptococci β -haemolytic	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Culture	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Culture	
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	PCR/ Culture	
<i>Helicobacter</i> spp.	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Culture	
Parasites & Protozoa						
<i>Aspiculuris</i> sp.	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Micr/ Flotation	
<i>Syphacia</i> spp.	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Micr/ Flotation	
Coccidia	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Micr/ Flotation	
<i>Giardia</i> spp.	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Micr/ Flotation	
<i>Spironucleus muris</i>	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Micr/ Flotation	
<i>Trichomonas</i> sp.	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Micr/ Flotation	
Others	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Micr/ Flotation	
Ectoparasites	3 months	0 / 93	0 / 7	mfd	Microscopy	
Pathological lesions						
none observed						

Comments:

Presence of opportunistic organisms will be communicated upon request.

mfd: mfd Diagnostics, Dr.B.Lecher, S.Maurer, Wendelsheim; nt: not tested

All mice presented in good condition and had good coverage of body hair.
In all animals there was no evidence of faecal soiling around the anus.
At necropsy, no abnormality detected in any of the organs.

Neuherberg,
26.09.2011

Markus Briemeier, DVM
Head of Comparative Medicine

IX. ZUSAMMENFASSUNG

Versuchsmäuse werden zunehmend in IVCs gehalten. In diesem Haltungssystem bildet jeder Käfig eine hygienische Einheit für sich, was die Überwachung des Hygienestatus der Mauspopulation erschwert. In dieser Arbeit wurde der Nutzen von „Einstreusentinel Kot PCR Untersuchung“ und Serologie zum Nachweis von murinen Noroviren (MNV) und murinen Hepatitis Viren (MHV) im Vergleich zum direkten Erregernachweis durch PCR Untersuchung der gemeinsamen Abluft eines IVC Regals betrachtet.

Zudem wurde überprüft, ob sich virale Nukleinsäuren, die beim Stapeln von benutztem, infiziertem Käfigmaterial außerhalb von Umsetzstationen freigesetzt werden, durch serologische Untersuchungen von Raumlufsentinels oder durch Zuluftvorfilter PCR nachweisen lassen.

Die PCR Untersuchung von Sentinelkot bzw. Sammeleinstreu ist die effizienteste Methode zur Detektion von MNV Infektionen in IVCs, wenn sie mehrmals während der Monitoringperiode durchgeführt wird. Sie ist der serologischen Untersuchung vorzuziehen.

Überwacht ein Sentinelpaar nur ein IVC Regal, kann es die Infektion schon bei Kolonieprävalenzraten von 8% nach 7 Wochen per Serologie, durch Sentinelkot PCR sogar bereits bei einer Prävalenz von 1,6% nach zwei Wochen anzeigen. Ist die zu überwachende hygienische Einheit zu groß (hier zwei Sentinels für fünf IVC Regale), wird die Infektion erst bei über 20% Infektionsprävalenz von den Sentinels über MNV Serokonversion angezeigt.

Die Untersuchung von IVC Abluftvorfiltern auf MNV RNA ist bei wiederholter Untersuchung (mindestens 5 Filter in Folge) eine sinnvolle Ergänzung zur Untersuchung von Einstreusentinelns. Sie kann häufiger durchgeführt werden (hier alle drei Wochen) und ist der serologischen Untersuchung zeitlich überlegen. Es können Infektionen mit $\geq 15\%$ Prävalenz detektiert werden.

Herausschaben von Staub aus dem unteren horizontalen Abluftrohr bringt bei 8% Prävalenz ein positives Ergebnis. Durch Verbesserung der Methoden zum Sammeln virushaltiger IVC Abluftstäube, sollte es möglich sein, die Nachweisgrenze noch weiter zu senken.

Die Untersuchung von IVC Zuluftvorfiltern eignet sich besonders in Räumen mit höheren Infektionsprävalenzen zur Detektion von MNV Infektionen.

MNV kann in IVC Zuluftvorfiltern in Tierräumen mit MNV Prävalenzen $\geq 26\%$ nachgewiesen werden. Längere Expositionszeiten über 43 Tage verbessern den Detektionserfolg.

Die serologische Untersuchung von Einstreusentinelns zeigt zuverlässig MHV Infektionen in einer in IVCs gehaltenen Mauskolonie an. Sentinel Kot PCR Untersuchungen sind aufgrund der kurzen Ausscheidungsphase und der damit verbundenen Gefahr das diagnostische Fenster dieser Methode zu verpassen, nicht zu empfehlen.

Wie bei MNV sollte ein Sentinelpaar, um zuverlässige serologische Ergebnisse zu erzielen, optimaler Weise nur ein IVC Regal überwachen und aus jedem Käfig wöchentlich gebrauchte Einstreu erhalten.

Da die aerogene Übertragung von MHV eine große Rolle spielt, ist es sinnvoll die Sentinels, um die Infektionswahrscheinlichkeit zu erhöhen, zusätzlich der Abluft der IVC Regale auszusetzen. PCR Untersuchungen von Abluftvorfiltern können die Überwachung des MHV Status einer Mauskolonie unterstützen und liefern unter Feldbedingungen zuverlässigere und kontinuierlichere Ergebnisse als Einstreusentinelns. Die Beobachtung deutet darauf hin, dass Kolonieprävalenzraten von 10% von Sentinels nicht mehr detektiert werden, im IVC Abluftvorfilter jedoch noch nachgewiesen werden können. Außerdem ist es möglich diese häufiger (wie hier alle drei Wochen) zu untersuchen. Die PCR Untersuchung von IVC Zuluftvorfiltern gibt - sogar besser als für MNV - bei einer ausreichend langen Expositionszeit, über mindestens 43 Tage, den MHV Infektionsstatus der Mauskolonie im Tierraum wieder. Im Gegensatz zu MNV wird die Infektion der Mauspopulation mit MHV schon bei niedrigeren Infektionsprävalenzraten um 20% detektiert.

Für ein optimales MNV und MHV Hygienemonitoring sollte die serologische und die Kot PCR Untersuchung von Einstreusentinelns mit der Untersuchung von IVC Zu- und Abluftvorfiltern mittels PCR kombiniert werden. Beim Einsatz von Einstreusentinelns sollte die von einem Einstreusentinelnpaar überwachte Einheit idealer Weise nur ein IVC Regal umfassen, aus dem wöchentlich gebrauchte Einstreu von der zu überwachenden Kolonie gesammelt wird.

X. SUMMARY

Health monitoring of SPF mice in IVCs is a challenging task. Each cage is a closed hygienic unit. There is no spread of infection from cage to cage if the cages are handled properly in cage changing units. In this study the use of soiled bedding sentinel serology and fecal PCR testing for murine norovirus (MNV) and murine hepatitis virus (MHV) was evaluated and compared to direct pathogen detection by PCR testing of the combined exhaust air of the IVC. Moreover it was tested if viral particles from infected soiled cages opened and stacked outside the cage changing units in the animal room may be detected by IVC fresh air prefilter PCR or room air sentinels.

PCR testing of sentinel feces or feces from soiled bedding is the most efficient method to detect MNV infection, even better than sentinel serology if samples are collected frequently at multiple time points during the sentinel monitoring period.

If one pair of sentinels monitors one IVC rack, where soiled bedding from the colony is collected weekly, MNV infection can be detected at 1.6% colony prevalence after 2 weeks by sentinel fecal PCR, or at 8% colony prevalence after 7 weeks by sentinel serology. In larger monitoring units (here: two sentinels for five IVC racks) MNV infection is not detected until colony prevalence exceeds 20%.

IVC exhaust air prefilter testing can improve MNV health monitoring and is even faster than sentinel seroconversion when it is done repeatedly (as a minimum. 5 successive filters exposed to the exhaust air for 3 weeks) and is able to detect infections on $\geq 15\%$ colony prevalence level.

Exhaust dust collected by scraping from the lower exhaust air plenum is tested positive at 8% colony prevalence.

More efficient dust traps need to be constructed to increase the sensitivity of pathogen detection.

IVC fresh air prefilter PCR is a useful tool for MNV detection, especially in animal rooms with high colony prevalence ($\geq 26\%$) and long exposure times (longer than 43 days).

The fecal shedding period of MHV is short (max. 2 weeks) and stops after seroconversion. Therefore, because of the high risk missing this period, it is not recommended to test sentinels for MHV infection by fecal PCR. The infection is efficiently detected by soiled bedding sentinel seroconversion when bedding is collected in the period of colony fecal excretion. Because MHV is also transmitted by air, exposure of sentinels to IVC exhaust air enhances

the success of detection. Under field conditions, IVC exhaust air prefilter PCR generally achieves more consistent results than soiled bedding sentinel serology and detects the infection with colony seroprevalence as low as 10% after three weeks exposure time, whereas infection is not detected anymore by soiled bedding sentinel serology after the 12 week monitoring period. IVC fresh air prefilter PCR detects MHV infection after 43 days exposure time in mouse rooms with low colony seroprevalence of around 20%.

In conclusion, to improve MHV and MNV health monitoring of SPF mice in IVCs soiled bedding sentinel serology and fecal PCR testing should be combined with exhaust and fresh air prefilter PCR testing. Sensitivity of soiled bedding sentinel detection can be improved if one sentinel pair monitors one IVC rack from which soiled bedding of every single cage is collected on a weekly base.

XI. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich meinem Mentor Herr PD Dr. Markus Brielmeier für die exzellente Betreuung danken. Er ermutigte mich stets eigene, lösungsorientierte Ideen zu entwickeln und selbständig umzusetzen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard Aigner, der die Arbeit von Seiten der Fakultät betreut hat, für die gute Zusammenarbeit und konstruktive Kritik.

Ich bedanke mich bei allen Instituskollegen in der AVM, die mich in meiner Doktorandenzeit begleitet und unterstützt haben.

Besonders danke ich Claudia Ludwig, die mir bei meinen ersten Schritten im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand und meiner Mit-Doktorandin Monika Kraus für die anregenden Diskussionen und gegenseitige Unterstützung.

Ich danke meinen Freunden für viele schöne Abende und Ausflüge, die für den nötigen Ausgleich gesorgt haben. Mein besonderer Dank gilt Anna-Lena für die Ausdauer im Korrekturlesen und die Versorgung mit Schokolade.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die immer für mich da sind und auch in schwierigen Zeiten eine große Stütze waren.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden auf der Fachtagung der GV-SOLAS 2011

in Dresden präsentiert: GV-SOLAS-P-16 “Burn-out of MHV infection in a mouse facility after changeover from open cages to IVCs“.