

**Aus dem
Robert Koch-Institut in Berlin
Zentrum für Biologische Sicherheit
Präsident: Prof. Dr. Reinhard Burger**

Habilitationsschrift

**Untersuchungen zur Diagnostik und Risikobewertung von
emerging und *re-emerging* Orthopockenviren in Deutschland**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Virologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Andreas Nitsche

Eingereicht: Dezember 2010

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Drosten (Bonn)

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Sutter (München)

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis nicht gängiger verwendeter Abkürzungen.....	iv	
1	Einleitung.....	1
1.1	Die Familie der Pockenviren – ein Überblick	1
1.2	Die Orthopockenviren	4
1.2.1	Aufbau der Virionen.....	4
1.2.2	Virusreplikation.....	5
1.2.3	Immunmodulation durch Orthopockenviren	8
1.2.4	Physikalische Eigenschaften von Pockenviren.....	8
1.2.5	Wirtsbereich und Zell-Tropismus von Orthopockenviren.....	9
1.2.6	Variola major und Variola minor	11
1.2.7	Kuhpockenviren.....	13
1.2.8	Infektionen mit anderen Orthopockenviren.....	15
1.3	Diagnostik von Pockenviren.....	17
1.3.1	Virusanzucht.....	19
1.3.2	Elektronenmikroskopie (EM).....	19
1.3.3	Serologie.....	19
1.3.4	Nukleinsäurenachweismethoden	20
1.4	Prävention und Therapie von Pockenvirus-Infektionen	20
1.4.1	Die Pockenimpfung	20
1.4.2	Therapie	22
2	Zielsetzung.....	24
3	Eigene Arbeiten	25
3.1	Diagnostik von Orthopockenviren: Identifizierung und Differenzierung in klinischen Proben.....	25
3.1.1	Einführung und Stand der Forschung.....	25
3.1.2	Publikation: <i>Detection of Orthopoxvirus DNA by Real-time PCR and Identification of Variola Virus DNA by Melting Analysis</i>	27
3.2	Diagnostik von Orthopockenviren: Umweltproben	34
3.2.1	Einführung und Stand der Forschung.....	34
3.2.2	Publikation: <i>Orthopoxvirus detection in environmental specimens during suspected bioterror attacks: Inhibitory influences of common household products</i>	36
3.2.3	Publikation: <i>Rapid and sensitive detection of infectious poxvirus particles</i>	42

3.3	Probleme bei der Diagnostik von Orthopockenvirus-Infektionen des Menschen	45
3.3.1	Einführung und Stand der Forschung	45
3.3.2	Publikation: <i>A 14-Year-Old Girl with a Black Eschar</i>	47
3.3.3	Publikation: <i>Pitfalls in diagnosing human poxvirus infections</i>	51
3.4	Risikopotential von Kuhpockenvirus-Infektionen beim Menschen	55
3.4.1	Einführung und Stand der Forschung	55
3.4.2	Publikation: <i>Viremia in human Cowpox virus infection</i>	57
3.5	Risikopotential von Kuhpockenvirus-Infektionen beim Tieren	60
3.5.1	Einführung und Stand der Forschung	60
3.5.2	Publikation: <i>Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus</i>	62
3.5.3	Publikation: <i>Cowpox virus outbreak in banded mongooses (<i>Mungos mungo</i>) and jaguarundis (<i>Herpailurus yagouaroundi</i>) with a time-delayed infection to humans</i>	64
4	Diskussion	74
4.1	Diagnostik von Pockenviren	74
4.2	Infektionen mit Pockenviren in Deutschland	78
4.3	Risikopotential von Orthopockenvirus-Infektionen	82
5	Literatur	87
6	Zusammenfassung	96
7	Danksagung	97
8	Erklärung	98

Verzeichnis nicht gängiger verwendeter Abkürzungen

BRZ	<i>Brazil</i>
BPSV	Bovines Papuläres Stomatitis-Virus
CAM	Chorioallantoismembran
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEV	<i>Cell associated virus</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CHOhr	<i>Chinese Hamster Ovary host-range</i>
CMLV	<i>Camelpoxvirus</i>
CPXV	<i>Cowpoxvirus</i>
ECTV	<i>Ectromelia-Virus</i>
EEV	<i>Extracellular enveloped virus</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EV	<i>Enveloped Virion</i>
FWPV	Hühnerpockenvirus
IMV	<i>Intracellular mature virus</i>
MOCV	Molluscum Contagiosum-Virus
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MPXV	<i>Monkeypoxvirus</i>
MV	<i>Mature Virion</i>
MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara</i>
MYXV	Myxomavirus
OPV	Orthopockenviren
ORFV	ORF-Virus
PCPV	Pseudokuhpockenvirus
p.i.	<i>post infectionem</i>
PFU	<i>plaque forming units</i>
PPV	Parapockenviren
RCNV	Waschbärpockenvirus
SNP	<i>Single Nuclotide Polymorphism</i>
SPV	Seehundpockenvirus
SWPV	Schweinepockenvirus
TATV	Taterapockenvirus
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNPV	Tanapockenvirus
VACV	Vaccinia-Virus
VARV	Variola-Virus
VIG	Vaccinia-Immunglobulin
WHO	<i>World Health Organisation</i>
YMTV	Yaba Monkey Tumovirus
ZBS 1	Zentrum für Biologische Sicherheit 1

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Pockenviren – ein Überblick

Die Familie der *Poxviridae* umfasst zahlreiche Vertreter von Viren, die in Vertebraten (Unterfamilie *Chordopoxvirinae*) oder Insekten (Unterfamilie *Entomopoxvirinae*) milde bis letale Infektionen hervorrufen können. Innerhalb der *Chordopoxvirinae* sind neun Genera bekannt, von denen vier Genera humanpathogene Pockenviren enthalten, die aber untereinander keine Kreuzimmunität hervorrufen. Es handelt sich um die Orthopockenviren, die Molluscipockenviren, die Parapockenviren und die Yatapockenviren. Tabelle 1 fasst die wesentlichen Charakteristika der *Poxviridae* zusammen (Moss, 2007).

Besondere Bedeutung für die Geschichte der Menschheit besitzen die Orthopockenviren durch den Vertreter Variola-Virus, welches seit Tausenden von Jahren die Menschenpocken verursachte (Damon, 2007). In Europa sind Pockenvirus-Epidemien erstmals im 6. Jahrhundert historisch belegt und haben über Jahrhunderte weltweit Millionen Todesopfer gefordert (Fenner et al., 1988). Noch im 20. Jahrhundert sind weltweit 300 Millionen Menschen an den „Pocken“ verstorben (Henderson, 1980). Deshalb wurden auch in Unkenntnis des Erregers bereits vor ~3000 Jahren die ersten systematischen Versuche zur Prävention durch Immunisierung unternommen (siehe 1.4.1). Hierzu wurden zunächst Kuhpockenviren verwendet, später Vaccinia-Viren, welche wie alle Orthopockenviren untereinander eine hohe immunologische Kreuzreaktivität hervorrufen (Letai, 2003), im Gegensatz zu den Genera der *Chordopoxvirinae*. Die Menschenpocken sind heute die einzige Infektionskrankheit des Menschen, welche durch gezielte Impfungen eradiziert werden konnte (WHO, 1980). Seitdem sind Arbeiten mit Variola-Viren ausschließlich unter Kontrolle der WHO an zwei Referenzzentren weltweit zugelassen (WHO, 2002).

Der Genus der Orthopockenviren zeichnet sich jedoch noch durch eine Reihe weiterer Besonderheiten aus: So sind die Vaccinia-Viren die ersten Viren, die mit dem Mikroskop dargestellt, in Zellkultur vermehrt und exakt titriert werden konnten. Die Erforschung des Vaccinia-Virus hat wesentlich zum heutigen Verständnis von Infektionskrankheiten und den Funktionen des Immunsystems beigetragen. Biologisch betrachtet zeichnen sich Pockenviren durch ihre Eigenschaft aus, im Zytoplasma einer infizierten Zelle zu replizieren, weshalb sie im Virion einen vollständigen Transkriptionsapparat für frühe Genprodukte enthalten (siehe 1.2.2 [Moss, 2007]).

Neben Variola-Virus infizieren weitere Orthopockenviren auf natürlichem Wege den Menschen, wie Vaccinia-Viren, Kuhpockenviren und Affenpockenviren (Damon und Esposito, 2003; Fenner et al., 1989), wobei diese Viren jeweils Tiere als Reservoir besitzen und als Zoonoseerreger gelten (siehe 1.2.7 & 1.2.8). Auch verschiedene Parapockenviren können den Menschen durch direkten Kontakt zu erkrankten Tieren infizieren und den Kuhpocken ähnliche lokale Hautveränderungen hervorrufen (Essbauer et al., 2010; Lewis-Jones, 2004). Anders verhält es sich bei den Molluscipocken: Neben dem VARV ist das Molluscipockenvirus das einzige weitere Pockenvirus, welches ausschließlich den Menschen infiziert

(Hanson und Diven, 2003; Scholz et al., 1988). Der Wirtsbereich einiger Pockenviren ist dagegen trotz hoher genetischer Verwandtschaft überraschend breit (McFadden, 2005), und das Beispiel der Infektion von europäischen statt südamerikanischen Kaninchen mit Myxomaviren hat gezeigt, dass die Infektion eines unnatürlichen Wirts häufig mit hoher Letalität verbunden sein kann (Fenner, 2000). Vergleichbar infizierten früher die Kuhpockenviren Kühe lediglich lokal, meist am Euter, in Katzen und Zootieren können sie jedoch eine fatale systemische Infektion verursachen (Fenner et al., 1989).

Während das Variola-Virus ausschließlich den Menschen infiziert, dies aber mit hoher Letalität, sind Infektionen mit Kuhpockenviren in Mensch und Tier unterschiedlich pathogen, werden dafür jedoch in zahlreichen Spezies gefunden (Chantrey et al., 1999). Da die molekularen Vorgänge hinter diesen unterschiedlichen Wirtsbereichen nicht bekannt sind, lässt sich das Risiko der Entstehung einer für den Menschen hochpathogenen neuen Variante eines Kuhpockenvirus nicht einschätzen (Baxby und Bennett, 1997a). Dies wird unterstrichen durch die für DNA-Viren vergleichsweise hohe Variabilität im Kuhpockenvirus-Genom (Bennett und Baxby, 1996).

Seit der Eradikation der Menschenpocken werden in den letzten Jahren weltweit vermehrt Infektionen mit anderen Orthopockenviren beobachtet (Baxby, 1994; Vorou et al., 2008). Während in Deutschland und anderen Ländern Europas Infektionen mit Kuhpockenviren zunehmen (Nitsche und Pauli, 2007), kommen in Afrika natürliche Infektionen mit Affenpockenviren (Parker et al., 2007) sowie in einigen Regionen wie Indien und Brasilien Infektionen mit Vaccinia-Virus-ähnlichen Erregern vor (Drumond et al., 2008; Moussatche et al., 2003; Moussatche et al., 2008; Nagasse-Sugahara et al., 2004; Trindade et al., 2004). Auch der ungewollte Import von Affenpockenviren in die USA im Sommer 2003 hat gezeigt, dass diese Viren über eine Infektionskette von mehreren Spezies und über Tausende von Kilometern die Übertragung auf den Menschen schaffen können (Centers for Disease Control and Prevention, 2003). Abgesehen von Infektionen durch Kontakt zu Vaccinia-Virusgeimpften Personen (Sepkowitz, 2003; Talbot et al., 2004) oder Laborunfälle (CDC, 2008) kommen aktuelle Infektionen mit Orthopockenviren des Menschen immer nach Kontakt zu infizierten Tieren zustande. Ein möglicher Grund für die beobachtete Zunahme von Infektionen mit Orthopockenviren ist, dass nach der Einstellung der Impfungen gegen Variola-Virus der Anteil der Bevölkerung ohne Impfschutz gegen Orthopockenviren zunimmt. Ein anderer Grund ist vermutlich eine zunehmend erhöhte Aufmerksamkeit auf Seiten der behandelnden Ärzte (Nitsche und Pauli, 2007). In einem großen Teil der behandelnden Ärzteschaft herrschte noch bis vor Kurzem die Meinung vor, dass die Pocken ausgerottet seien, ohne dabei zwischen Variola-Virus und anderen Pockenviren zu unterscheiden.

Bis auf Infektionen mit Affenpockenviren verlaufen Orthopockenvirus-Infektionen bei Immunkompetenten zumeist selbstlimitierend, und es treten nur lokale, in der Regel auf die Infektionsstelle begrenzte Hautläsionen sowie Allgemeinsymptome in Form einer febrilen Lymphangitis und -adenitis auf (Fenner et al., 1989). Da die Fälle selten sind und eine

Behandlung in den letzten Jahren nicht verfügbar war, hatte man bislang der richtigen Diagnose wenig Bedeutung beigemessen.

Im Folgenden sollen die humanpathogenen Orthopockenviren kurz beschrieben werden. Der Fokus liegt in dieser Arbeit auf den beiden für Deutschland am relevantesten Pockenviren: 1. dem Variola-Virus als Beispiel für ein *re-emerging* Virus, welches bei einem Wiederauftreten zahlreiche Todesopfer fordern und eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem darstellen würde, und 2. dem Kuhpockenvirus als Beispiel für den Erreger einer *emerging disease*, da diese Viren aufgrund ihres breiten Wirtsbereiches und der genetischen Variabilität ein zurzeit nicht verlässlich einschätzbares Risikopotential für den Menschen besitzen.

Tabelle 1: Zusammenfassende Darstellung der wesentlichen Pockenviren.

Familie	Unterfamilie	Genus (-virus)	Spezies (-virus)	Abk*.	Genomgröße	%-GC
<i>Poxviridae</i>	<i>Chordopoxvirinae</i>	Orthopocken (OPV*)	Vaccinia	VACV	~195 kb	~36
			Variola	VARV	~186 kb	
			Affenpocken	MPXV	~198 kb	
			Kuhpocken	CPXV	~225 kb	
			Mauspocken	ECTV	~208 kb	
			Kamelpocken	CMLV	~203 kb	
			Taterapocken	TATV	~198 kp	
			Waschbärpocken	RCNV	unbekannt	
		Parapocken	ORF	ORFV	~138 kb	~64
			Bovines Papuläres Stomatitis	BPSV	~134 kb	
			Pseudokuhpocken	PCPV	~145 kb	
			Seehundpocken	SPV	unbekannt	
		Yatapocken	Tanapocken	TNPV	~145 kb	~33
			Yaba Monkey Tumor	YMTV	~135 kb	
		Molluscipocken	Molluscum contagiosum	MOCV	~190 kb	~60
		Avipocken	Hühnerpocken	FWPV	~266–360 kb	~35
		Capripocken	Schafpocken	SPPV	~150 kb	
		Cervidpocken	Hirschpocken	DPV	~168 kb	
		Leporipocken	Myxoma	MYXV	~160 kb	~40
	Suipocken	Schweinepocken	SWPV	~146 kb		
	<i>Entomopoxvirinae</i>	α -Entomopocken	Melontha melontha		~260–370 kb	~18
		β -Entomopocken	Amsacta moorei		~232 kb	
		γ -Entomopocken	Chironimus luridus		~250–380 kb	

*Abkürzungen, die in dieser Arbeit für die verschiedenen Viren verwendet werden, siehe auch Abkürzungsverzeichnis.

1.2 Die Orthopockenviren

1.2.1 Aufbau der Virionen

OPV-Partikel gehören zu den größten bekannten Viruspartikeln. Sie sind umhüllt, quaderförmig, haben in der elektronenmikroskopischen Darstellung Ausmaße von $\sim 300\text{--}350\text{ nm} \times 140\text{--}170\text{ nm}$ (Abbildung 1) und sind morphologisch mit dem Elektronenmikroskop (EM) nicht voneinander unterscheidbar (Biel und Gelderblom, 1999). Wichtiges Merkmal der OPV ist das Vorkommen von verschiedenen infektiösen Partikelformen (Smith et al., 2002). Ursprünglich wurden vier verschiedene infektiöse Viruspartikel-Formen während der OPV-Replikation unterschieden. Für die Pathogenese spielen davon die *mature virions* (MV) und die *enveloped virions* (EV) die größte Rolle (Smith und Law, 2004). MV sind an der Ausbreitung der Erreger von Zelle zu Zelle beteiligt, während von der Zelle freigesetzte EV mit einer spezifischen Protein-Ausstattung auf der Hülle die Ausbreitung im infizierten Organismus ermöglichen (Moss, 2007; Roberts und Smith, 2008).

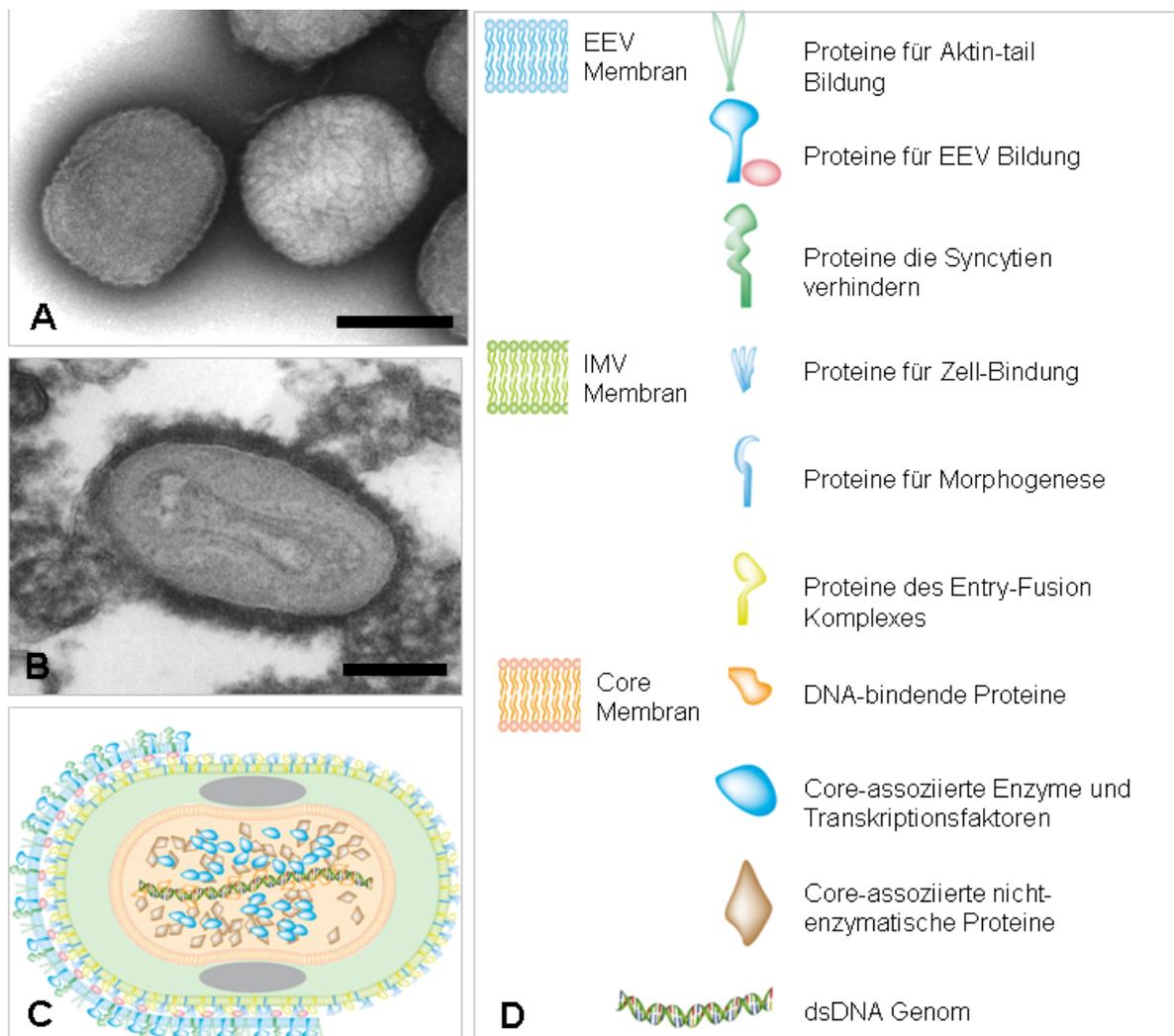


Abbildung 1: Morphologie von OPV-Partikeln. A, B: Elektronenmikroskopische Darstellung von OPV-Partikeln, Negativ-Kontrastierung (A) Dünnschnitt (B), Balken = 100 nm. C: Schematische Darstellung von OPV IMV-(*Intracellular mature virus*) und EEV (*Extracellular enveloped virus*)-Partikeln. D: Legende für C (EM-Aufnahmen Dr. Andreas Kurth, Zeichnungen C, D: Daniel Stern, Robert Koch-Institut).

Das Innere des Virions stellt sich in der EM als bikonkaves *core* dar, welches mit zwei Lateralkörperchen unbekannter Funktion aggregiert ist und das Genom sowie nicht-enzymatische und für die frühe Replikation essentielle Faktoren enthält (Moss, 2007). Das Genom der OPV besteht aus dsDNA mit einer Länge von ~186–230 kb (siehe Tabelle 1), deren Enden durch kovalente Bindungen verbunden sind (Moss, 2007). Die Enden der OPV-Genome bestehen aus *inverted terminal repeats* variabler Länge, welche ebenfalls Offene Leserahmen enthalten (Garon et al., 1978). Das Genom alleine ist nicht infektiös, da notwendige Enzyme für die Transkription des Genoms im Zytoplasma der Zelle fehlen. Von den ~200 Genen sind ~49 Gene innerhalb der Pockenviren und 89 Gene innerhalb der OPV stark konserviert (Upton et al., 2003). Diese befinden sich meist in der zentralen Region des Genoms und sind in essentielle Funktionen wie die Replikation involviert (Broyles, 2003). Variablere Gene befinden sich an den Enden des Genoms und spielen häufig eine Rolle bei der Virus-Wirt-Interaktion. OPV-Gene sind in der Regel nicht gespleißt, nicht überlappend und zeigen in ihrer Transkriptionsrichtung zu dem näher gelegenen Ende des Genoms (Moss, 2007). Die Homologie innerhalb der OPV ist auf Genomebene sehr hoch und spiegelt sich in der ausgeprägten Antigenverwandtschaft wieder (Fenner et al., 1989).

1.2.2 Virusreplikation

Die Bindung der OPV-Partikel an die Zelle ist gerade vor dem Hintergrund der verschiedenen Partikel MV und EV, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung auf der jeweils äußeren Hülle stark unterscheiden, noch nicht gut verstanden (Moss, 2007). Neben einem *entry-fusion*-Komplex aus mindestens 10 interagierenden Proteinen (Senkevich et al., 2005) werden endosomale Eintrittsmechanismen oder makropinozytische Vorgänge diskutiert, bei denen die Viren nach einem als Membran-*blebbing* bezeichneten Prozess in die Zelle aufgenommen werden (Mercer und Helenius, 2008). Der Prozess beruht auf der Präsentation von Phosphatidylserin auf der Virushülle und lässt vermuten, dass die Viren Apoptose der Zelle simulieren. Sicher ist jedoch, dass es keinen einzigen Rezeptor für Pockenviren oder OPV gibt, dessen Bindung essentiell für eine erfolgreiche Infektion ist (Blasco et al., 1993; Chung et al., 1998; Hsiao et al., 1998; Hsiao et al., 1999; Lin et al., 2000). Eher ist es so, dass eine Vielzahl verschiedener Zelltypen infiziert werden kann, dort jedoch die produktive Replikation der Viren nicht abläuft. Vereinfacht stellt sich eine erfolgreiche Zellinfektion wie folgt dar: Reife Viruspartikel adsorbieren an die Plasmamembran unter Fusion mit der Virushülle, was die Freisetzung des Virus *cores* bewirkt (Howard et al., 2010; Moss, 2007; Abbildung 2 ①). Das *core* enthält bereits ein komplettes System für die Transkription früher Gene und ermöglicht dadurch den Beginn der Replikation im Zytoplasma ② unter Nutzung des zellulären Proteinsynthese-Apparates ③. Die Transkription läuft danach kaskadenartig ab, wobei etwa die Hälfte der Gene als frühe Gene bezeichnet wird, welche für Proteine der DNA-Synthese, die Transkription intermediärer Gene oder die Inhibition der Immunantwort kodieren. Einige dieser Proteine können dementsprechend früh im Verlauf der Infektion sezerniert werden ④. Simultan

wird das *core* aufgeschlossen und der Nukleoprotein-Komplex ins Zytoplasma entlassen ⑤. In dieser Phase wird die frühe virale Transkription beendet und die DNA-Replikation begonnen ⑥. Dies geschieht vollständig im Zytoplasma in definierten Virusfabriken. Jedes infektiöse Viruspartikel kann eine eigene Virusfabrik hervorrufen, weshalb deren Anzahl mit der *Multiplicity of infection* (MOI) korreliert. Abhängig vom Virus- und Zelltyp beginnt die DNA-Replikation 1–2 Stunden nach der Infektion und erzeugt beispielsweise bei VACV ~10.000 Genomkopien pro Zelle, von denen etwa die Hälfte in intakte Virionen verpackt wird. Ein *origin of replication* ist nicht bekannt. Die Replikation beginnt vermutlich an Strangbrüchen an den Enden des Genoms und bildet über *self-priming* Concatemere, die später auf Genomlänge geschnitten werden. Nur bei erfolgreicher DNA-Replikation wird das *Virion-assembly* durchgeführt.

Neu synthetisierte DNA dient als *template* für weitere DNA-Replikationszyklen ⑦ und die Transkription intermediärer Gene ⑧. Letztere erfordert virale Initiationsfaktoren, welche durch frühe Gene kodiert werden und der RNA-Polymerase die Spezifität für intermediäre Promotoren verleihen. Das zelluläre Protein Vitf2 wandert dabei vom Zellkern ins Zytoplasma. Die Ursache und der Zweck dieses Vorgangs sind nicht geklärt. Intermediäre RNAs kodieren für Proteine ⑨, die für die Expression späterer Gene notwendig sind ⑩, und spätere Gene wiederum für Proteine, welche in fertige Virionen verpackt werden (Roberts und Smith, 2008). Hierbei handelt es sich um Strukturproteine, aber auch um frühe Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen ⑪. Einige früh exprimierte Proteine (D9, D10) scheinen der Abschaltung der zelleigenen RNA-Synthese zu dienen, werden aber auch mit der frühen Abnahme der viralen frühen Transkripte in Verbindung gebracht (Broyles, 2003).

Die ersten Schritte des *assembly* von OPV-Virionen erfolgen ebenfalls in den elektronenmikroskopisch gut erkennbaren Virusfabriken im Zytoplasma ⑫ (Guarnierische Einschlusskörper oder *B-type inclusion bodies*). Zuerst bilden sich deutlich abgrenzbare offene Strukturen (*crescents*) und sphärische, unreife Virionen (*immature virions* IV, ⑬). Die Herkunft der IV-Membran konnte bislang nicht geklärt werden. Neben der Assoziation mit dem Golgi-Apparat wird die *de novo*-Synthese der Membranen diskutiert – beides ist jedoch nicht bewiesen. Die IV füllen sich mit Nukleoprotein und bilden die quaderförmige Struktur eines MV ⑭, der häufigsten infektiösen Form, die nur durch Lyse der Zelle frei wird ⑮.

Bei bestimmten OPV, wie zum Beispiel den CPXV oder ECTV, treten neben den *B-type inclusion bodies* ebenfalls *A-type inclusion bodies* auf, welche reife Virionen enthalten und im Komplex aus der Zelle nach der Lyse freigesetzt werden (*Downie bodies* oder *Marchal bodies*). Diese bestehen aus einem viralen Protein (ATI), welches in späten Stadien der Infektion bis zu 4% des Gesamtproteins in der Zelle ausmachen kann. Die *A-type inclusion bodies* werden zusammen mit den MV-Partikeln nach Lyse der Zelle freigesetzt. Ein nicht definierter Anteil der MV kann mit zwei weiteren Membranen umgeben werden, welche vom Virus-modifizierten trans-Golgi-Apparat stammen und EV-spezifische virale Proteine enthalten (z.B. B5, A33, A56, ⑯). Um an die Zellmembran zu gelangen, müssen die Viruspartikel aktiv

über Mikrotubuli transportiert werden. Dort fusioniert die äußere der beiden zusätzlichen EV-Membranen mit der Plasmamembran und entlässt ein EV-Partikel 17, welches nun zwei Membranen trägt, also eine Membran mehr als MV-Partikel. Interessanterweise verbleibt der Großteil der EV als *cell associated virus* (CEV) an der Plasmamembran. Wie viele EV in die Umgebung entlassen werden, hängt vom Virusstamm ab und wird auf eine Mutation in der putativen Lektin-Bindungsstelle im Protein A34 zurückgeführt (Blasco et al., 1993). Der Zell-Zell-Transport von EV geschieht letztlich über die Bildung so genannter Aktin-tails 18. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass zwei virale Proteine dafür verantwortlich sind, dass bereits infizierte Zellen neu auf dieselbe Zelle treffende Viren direkt an benachbarte Zellen „weitschleudern“ können und damit zu einer hoch effizienten Ausbreitung der Viren führen (Doceul et al., 2010; Moss, 2007; Roberts und Smith, 2008). Die VACV-Replikation ist in Abbildung 2 schematisch zusammengefasst.

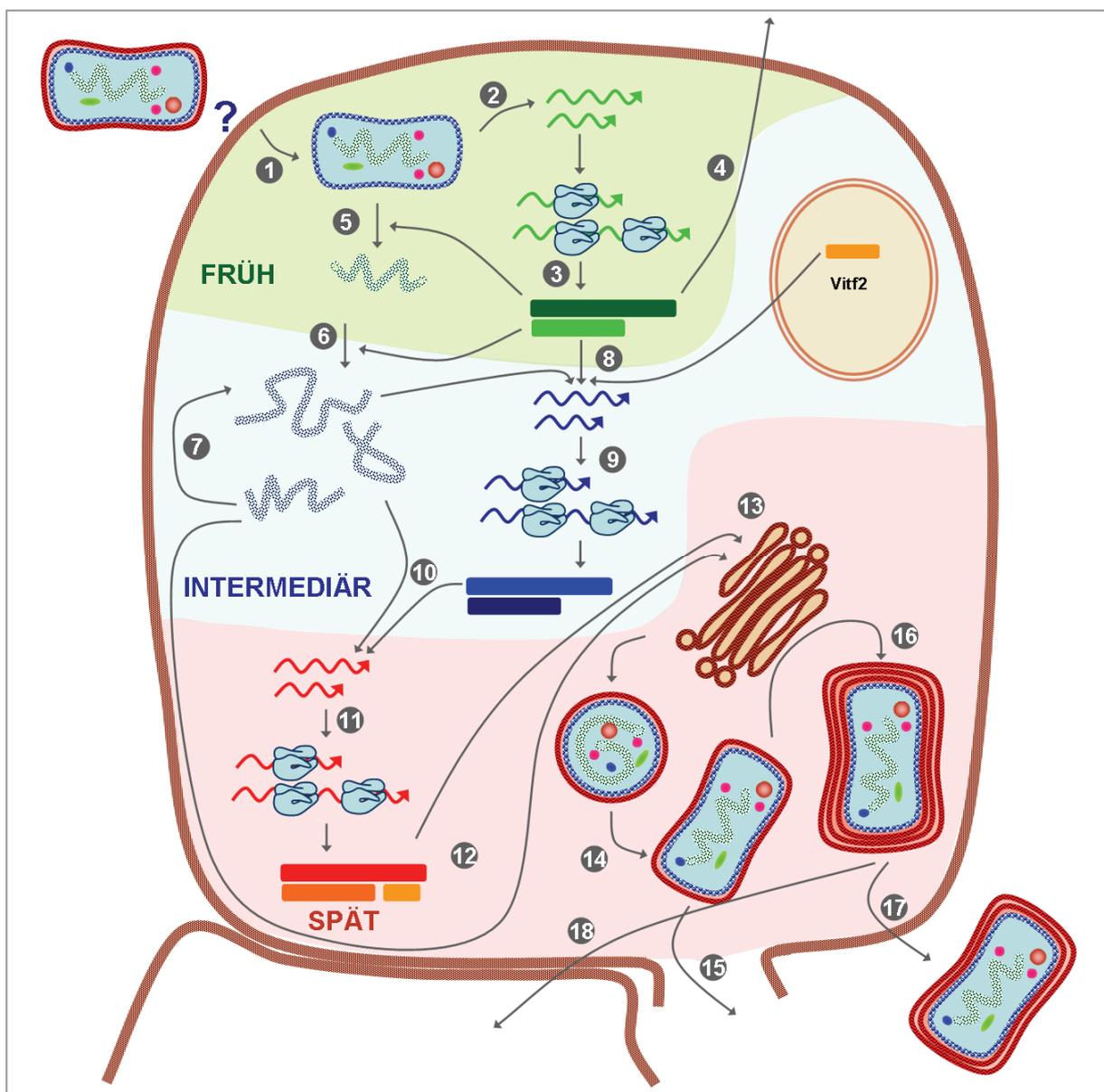


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Vaccinia-Virus (modifiziert nach Flint et al., 2003).

1.2.3 Immunmodulation durch Orthopockenviren

OPV kodieren für eine Reihe von Proteinen, die die Abwehrmechanismen des infizierten Wirtes ausschalten sollen. Man schätzt, dass die Hälfte der OPV-Gene, also ~100 Gene, diesem Zweck dient (Alcami und Koszinowski, 2000; Dunlop et al., 2003; Shchelkunov, 2003). Dabei werden diese immunmodulatorischen Proteine in drei Gruppen unterteilt. 1. Virokine, die von infizierten Zellen sezerniert werden und Zytokinen des Wirts ähneln (Evans, 1996; Seet und McFadden, 2002), 2. Virozeptoren, die Wirts-Rezeptoren ähneln, aber häufig durch Verlust der Transmembrandomäne zelluläre Faktoren nach der Sezernierung binden können und 3. Intrazelluläre Proteine, die in Signaltransduktionswege eingreifen (Alcami, 2003; Seet et al., 2003). Die verschiedenen OPV haben dabei unterschiedliche Strategien ausgebildet, die durch die Ko-Evolution der Viren und der Wirte bedingt sein kann. Nur der Vollständigkeit halber seien hier Proteine genannt, die Komplement-regulierend wirken (McKenzie et al., 1992), Homologe der Interferone des Typs I oder II darstellen (Sen, 2001) sowie ein IL-18-Bindungsprotein (Calderara et al., 2001; Xiang und Moss, 1999), Proteine, die TNF (Sedger et al., 2006; Smith et al., 1994) binden oder die Wirkung von Chemokinen inhibieren (Lalani et al., 1999). Vergleichsweise gut untersucht ist das VACV-Protein E3 (Beattie et al., 1996; Garcia et al., 2002; Jentarra et al., 2008; Langland und Jacobs, 2002), welches bei allen OPV ein Homolog besitzt. E3 bindet an dsRNA und hat dabei mindestens zwei Funktionen: 1. E3 inaktiviert die IFN-induzierte dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) und 2. E3 inaktiviert die 2'5'-Oligoadenylatsynthetase. Damit werden intrinsische antiviral wirkende Abwehrmechanismen der Zellen gezielt ausgeschaltet.

Eine große Gruppe von viralen Proteinen dient der Modulation der Apoptose (McFadden und Barry, 1998). Beispielsweise blockiert CrmA, ein Protein der Serin-Protease-Inhibitor Superfamilie (Serpine), extrinsisch induzierte Apoptose durch Fas oder TNF (Dbaibo et al., 1997; Tewari und Dixit, 1995; Tewari et al., 1995). Es inhibiert Caspase-1 und vermutlich Caspase-8 und bindet an Granzym B. Die Wirkungsvielfalt eines einzigen Apoptose-Modulators wird schon am Beispiel des CrmA gut erkennbar. Weitere Apoptose-modulierende Proteine sind das ECTV p28 (Brick et al., 2000; Huang et al., 2004; Nicholls und Gray, 2004), das VACV F1L (Kvansakul et al., 2008; Scagliarini et al., 2004; Stewart et al., 2005; Taylor et al., 2006; Wasilenko et al., 2005) und das kürzlich identifizierte VACV vGAAP (Gubser et al., 2007). Zelluläre Interaktionspartner sind für die Proteine noch nicht ausreichend identifiziert und deren Wirkungsweise nicht gut charakterisiert (Seet et al., 2003; Mahalingam und Karupiah, 2000).

1.2.4 Physikalische Eigenschaften von Pockenviren

Die Trockenmasse eines VACV-MV-Partikels wurde mittels *Atomic Force Microscopy* als 9,5 fg bestimmt, wobei 90% Protein, 5% Lipide und 3,2% DNA darstellen (Gupta et al., 2004; Zwartouw, 1964). Für umhüllte Viren sind OPV in Krusten und Sekreten sehr stabil und können über längere Zeit in der Umwelt infektiös bleiben (Ambrose, 2005). VARV

überlebte temperatur- und feuchtigkeitsabhängig in Krusten mehrere Wochen (3 Wochen bei 35°C und 65–68% Luftfeuchte, 12 Wochen bei 25,8–26,4°C und <10% Luftfeuchte [Huq, 1976]). In nicht stabilisierten Virus-Suspensionen wurde VACV innerhalb einer 15-minütigen Aufwärmperiode auf 65°C vollständig inaktiviert (Lelie et al., 1987). Weitere Arbeiten zeigten, dass VARV aus getrockneten und dunkel aufbewahrten Krusten, die von Pockenkranken gewonnen worden waren, sogar noch nach bis zu 13 Jahren (Wolff und Croon, 1968) re-isoliert werden konnte. Berechnungen ergaben, dass unter diesen Versuchsbedingungen der Titer in den Krusten nach etwa 3.000 Tagen nur um den Faktor 100 abgesunken war (Sinclair et al., 2008). Aufgetrocknet auf Objektträger gelang der Nachweis von infektiösem VARV noch nach etwa 3 Monaten (Downie et al., 1950). Auch in Aerosolen sind VARV relativ umweltresistent und können in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur und Luftfeuchte ≥ 24 h lang überleben (Harper, 1961; Sinclair et al., 2008). In umfangreichen Untersuchungen wurde die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf VARV und VACV gezeigt (Tanabe und Hotta, 1976). Als Beispiele seien nur wenige üblicherweise verwendete Desinfektionsmittel genannt: innerhalb einer Minute wurde VARV durch 50%–70% Ethanol bzw. 40%–50% Isopropanol, 0,1–2% Natriumhypochlorit oder 1% Formaldehyd bis unter die Nachweisgrenze inaktiviert (Reduktionsfaktor $\geq 10^6$). Kürzlich konnte auch für VACV eine hohe Stabilität in Lebensmitteln und in der Umwelt gezeigt werden (Essbauer et al., 2007).

1.2.5 Wirtsbereich und Zell-Tropismus von Orthopockenviren

Trotz hoher genetischer Homologie weisen die Pockenviren und OPV sehr unterschiedlich breite Wirtsbereiche auf (Essbauer et al., 2004; Essbauer et al., 2010; McFadden, 2005). Das wichtigste Beispiel ist sicherlich das VARV, das auf natürlichem Wege ausschließlich den Menschen infiziert und von dem kein weiteres natürliches Reservoir bekannt ist. Dieser Tatsache ist zu verdanken, dass durch gezielte Impfungen der Bevölkerung vor 30–40 Jahren die Ausrottung des VARV möglich war (Fenner et al., 1988). Ebenfalls ausschließlich humanpathogen ist das MOCV (vgl. 1.1). Infektionen mit diesem Virus werden vorwiegend in Kindern und Immunsupprimierten beobachtet, sind wenig pathogen und bleiben in der Regel lokal begrenzt. Ein weiteres Reservoir ist ebenso wenig bekannt wie die Infektionsursache beim Menschen (Hanson et al., 2003; Scholz et al., 1988). VARV und MOCV können demnach nur von Mensch zu Mensch übertragen werden. Interessanterweise besitzt das CMLV auf Genomebene die höchste Homologie zu VARV und hat ebenfalls nur einen natürlichen Wirt, nämlich Kamele (Afonso et al., 2002). Infektionen des Menschen mit CMLV sind nicht glaubhaft beschrieben, es handelt sich hierbei eher um Infektionen mit einem Parapockenvirus der Kamele.

Alle anderen Infektionen des Menschen mit Pockenviren sind Zoonosen (Essbauer et al., 2010). Von Zoonosen spricht man, wenn Infektionserreger vom Tier auf den Menschen (Zoonanthropozoonosen) oder vom Menschen auf das Tier übertragen werden (Anthropozoonosen). Zu Erregern solcher Zoonosen zählen unter anderem die Parapockenviren, die für gewöhnlich

direkt vom Tier auf den Menschen übertragen werden (siehe Tabelle 2) und hier nur lokal begrenzte Infektionen verursachen. Eine wesentlich wichtigere Rolle bei den Zooanthroposen spielen die Orthopockenviren (Baxby und Bennett, 1997b; Di Giulio und Eckburg, 2004; Essbauer et al., 2004; Essbauer et al., 2010; Frey und Belshe, 2004; Parker et al., 2007). Die höchste Letalität verursachen hier die Affenpockenviren (MPXV), die ihr Reservoir vermutlich in kleinen Nagetieren haben und verschiedenste Spezies wie auch den Menschen infizieren können (Di Giulio und Eckburg, 2004; Parker et al., 2007). Ähnlich verhält es sich bei den CPXV, die bereits über Katzen oder exotische Tiere auf den Menschen übertragen worden sind (Baxby und Bennett, 1997b; Bennett und Baxby, 1996). Das Reservoir für CPXV scheinen Nagetiere zu sein (Baxby und Hill, 1969; Bennett et al., 1997; Hazel et al., 2000). In Brasilien entdeckte Infektionen bei Menschen, aber auch bei Milchvieh, mit VACV-artigen Viren haben den Verdacht nahe gelegt, dass diese Viren seit der Impfära in der Natur in verschiedenen Spezies überlebt haben und nun sporadisch Menschen infizieren können (Moussatche et al., 2008; Nagasse-Sugahara et al., 2004).

Die molekularen Faktoren, die den Wirtsbereich bestimmen und darüber entscheiden, ob diverse oder einzelne Spezies infiziert werden können, sind weitgehend unverstanden. Während OPV *in vitro* in eine Reihe von Zellen eindringen können, sind sie nicht immer in der Lage dort auch zu replizieren. So ist für CPXV bekannt, dass das Protein CP77 (auch CHOhr) den Viren ermöglicht auf CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) zu wachsen (Spehner et al., 1988), was VACV mit dem deletierten oder disruptierten CP77-Gen nicht möglich ist (Ramsey-Ewing und Moss, 1996). Bei Fehlen des CP77-Gens kommt es zu einer schnellen Unterbrechung der viralen und Wirts-Proteinsynthese und zur Apoptose (Ink et al., 1995). Als Bindungspartner für CP77 wurde vorläufig das zelluläre Protein HMG20A identifiziert (Hsiao et al., 2006), was jedoch nur schwer in einen direkten Zusammenhang zur Überwindung der Wirtsbarriere in CHO-Zellen gebracht werden kann. Das CP77-Protein kann in VACV die Gene C7L und K1L komplementieren und die Replikation in CHO-Zellen ermöglichen (Ramsey-Ewing und Moss, 1996).

Der deutlich unterschiedliche Wirtsbereich der OPV hat verschiedene Konsequenzen. So ist es einerseits unmöglich ein Virus zu eradizieren, welches in natürlichen und zum Teil unbekanntem Reservoir-Wirten vorkommt. Andererseits besteht das Risiko, dass sich durch zeitgleich in verschiedenen Spezies zirkulierende Viren neue Varianten herausbilden, die eine verbesserte Übertragbarkeit auf den Menschen bei höherer Pathogenität aufweisen. Vermutlich sind so auch die VARV entstanden (Li et al., 2007; Shelukhina et al., 1979). Deren Ursprung ist zwar nicht bekannt, eine Übertragung vom Tier auf den Menschen mit anschließender Einschränkung auf den Menschen ist jedoch wahrscheinlich. Tabelle 2 fasst die Wirtsbereiche und geographische Verteilung humanpathogener Pockenviren zusammen.

1.2.6 Variola major und Variola minor

Die Variola-Viren verursachen die gefährlichste aller Pockenvirus-Infektionen, die Menschenpocken (Moore et al., 2006). Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Verlaufsformen, die durch Infektion entweder mit dem Variola major-Virus oder dem Variola minor-Virus (Alastrimvirus) hervorgerufen werden (Damon, 2007). Infektionen mit Variola major-Virus waren durch einen schweren Krankheitsverlauf und eine hohe Mortalität von 20–50% gekennzeichnet, während Infektionen mit dem Variola minor-Virus milder verliefen und lediglich eine Mortalität von ca. 1% beobachtet wurde.

Tabelle 2:
Wirtsbereich und geographische Verteilung von Pockenvirus-Genera mit humanpathogenen Pockenviren.

Genus	Spezies	Reservoir Wirt	Andere infizierte Wirte	Geographisches Vorkommen
Orthopockenvirus	Vaccinia-Virus	?	Mensch, Kaninchen, Kuh	?
	Variola-Virus	Mensch	Keine	Eradiziert, früher weltweit
	Affenpocken-Virus	? (Nagetiere)	Affe, Zootiere, Präriehund, Mensch	West- und Zentral-Afrika
	Kuhpocken-Virus	Nagetiere	Katze, Mensch, Kuh, Zootiere	Europa und West-Asien
	Mauspocken-Virus	Nagetiere	Keine	Europa
	Kamelpocken-Virus	Kamele	Keine	Afrika, Asien
	Taterapocken-Virus	Gerbil	Keine	West-Afrika
	Waschbärpocken-Virus	Waschbär	Keine	Ost-USA
Parapockenvirus	ORF-Virus	Schaf, Ziege	Wiederkäuer, Mensch	Weltweit
	Bovines Papuläres Stomatitis-Virus	Schlacht-Rind	Mensch	Weltweit
	Pseudokuhpocken-Virus	Milchvieh	Mensch	Weltweit
	Seehundpocken-Virus	Seehund	Mensch	Weltweit
Yatapockenvirus	Tanapocken-Virus	?	Mensch	Ost- und Zentral-Afrika
	Yaba Monkey Tumor-Virus	? (Primaten)	Mensch	West-Afrika
Molluscipocken-Virus	Molluscum contagiosum-Virus	Mensch	Keine	Weltweit

Die Übertragung erfolgte in der Regel direkt von Mensch zu Mensch über Kontakt mit Tröpfchen oder Aerosolen. Daher infizierte das Virus zuerst Zellen im Nasen-Rachenraum bzw. in der Mukosa des Respirationstraktes. Epidemiologische Untersuchungen belegen, dass nur wenige infektiöse Partikel notwendig waren, um eine Infektion auszulösen. Die weitere Vermehrung des Virus erfolgte in den regionalen Lymphknoten, gefolgt von der ersten Virämiephase am dritten bis vierten Tag nach Infektion, die weitgehend asymptomatisch verlief (CIDRAP, 2007; Fenner et al., 1988). Die zweite Virämiephase begann etwa am achten Tag nach Infektion, wobei infizierte Leukozyten das Virus in die Peripherie transportierten. Etwa am 12.–14. Tag nach Infektion entwickelten die Infizierten hohes Fieber mit Unwohlsein und Zeichen extremer Erschöpfung mit Kopf- und Rückenschmerzen. Es kam zur Ausbildung eines makulopapulösen Erythems (*macula*) auf der Mukosa des Mundes und des Rachens, das sich über das Gesicht und die Unterarme und anschließend auf den Rumpf und die Beine ausbreitete. Aus dem Exanthem entwickelten sich etwa am achten bis neunten Tag nach Auftreten des Ausschlages Vesikel (*papula*) und anschließend Pusteln (*pustula*). Die Pusteln waren üblicherweise rund und tief in die Haut eingebettet. Es bildeten sich Krusten (*crusta*), die während der Genesungsphase unter Narbenbildung ausheilten. Alle Vesikel und Pusteln hatten bei einem Infizierten dasselbe Stadium, verschiedene Stadien traten nicht auf. Durch die ulzerierenden Läsionen im Rachenraum gelangten große Virusmengen in den Speichel. Auch im Urin waren Viren nachweisbar. In dieser ersten Woche der klinischen Symptomatik waren die Patienten besonders infektiös. Ein Teil der Patienten starb etwa in der zweiten Krankheitswoche durch toxische Reaktionen. Als Komplikation konnte eine Enzephalitis auftreten. Zwei Formen der Pockenvirusinfektion verliefen in der Regel tödlich: die hämorrhagischen und die malignen Pocken. Inwieweit dies auf eine unterschiedliche Virulenz von VARV-Stämmen zurückzuführen ist, ist unklar (Fenner et al., 1988; Moore et al., 2006; Thomssen, 2003). Es ist zu bemerken, dass im Vergleich zu anderen viralen Infektionen wie Masern und Influenza eine Weiterübertragung der Pockenerreger erst bei Auftreten klinischer Symptome (etwa 14–17 Tage nach Infektion) erfolgte. Folglich waren bei Pockenausbrüchen häufig nur Haushaltsmitglieder, Pflegepersonal oder andere Personen mit engem Kontakt zu Pockenerkrankten betroffen. Hier lag die *second attack rate* in nicht geimpften Personen bei ~55%, in geimpften Personen jedoch noch immer bei 3,8% der nahen Kontakte (Damon, 2007). Um die Erkennung von Variola-Infektionen während der Eradikation zu vereinfachen, hatte die WHO eine *smallpox recognition card* veröffentlicht, die typische Symptome einer VARV-Infektion zeigt (Abbildung 3).

In Anbetracht der Tatsache, dass nach der Eradikation VARV-Infektionen in Laboratorien stattfanden, und der Gefahr, dass diese sogar aus den Laborbereichen herausgetragen werden könnten und es so zu einem *re-emerging* kommen könnte, veranlasste die WHO und die nationalen Behörden die Vernichtung aller VARV. Alternativ konnten diese an die von der WHO benannten *Collaborating Centres* in den USA bzw. in der vormaligen UdSSR (jetzt Russland) abgegeben werden (WHO, 2002). Seit 1984 lagern die bekannten VARV in den



Abbildung 3: Smallpox recognition card. Diese Karten wurden während der Eradikation zur Erkennung von Variola-Infektionen verwendet. Quelle: WHO.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta und am *Research Institute of Viral Preparations* in Moskau, von wo sie im Jahre 1994 zum *State Research Center of Virology and Biotechnology (The Vector Institute)* in Koltsovo (Region Novosibirsk, Russland) verlagert wurden. Forschungsprojekte mit lebenden Viren oder VARV-Genomen bzw. VARV-Genen werden seit Beginn der 1990er Jahre durch ein Expertenkomitee der WHO (*WHO Advisory Committee on Variola Virus Research*; <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/research/en/index.html>) begutachtet und entweder empfohlen, mit Auflagen versehen oder abgelehnt. Unter anderem dürfen für wissenschaftliche Untersuchungen außerhalb der Referenzzentren höchstens 20% des Gesamtgenoms eingesetzt werden (WHO, 2008). Eine weitere Auflage ist, dass ohne Genehmigung der WHO nicht mehr als 500 bp einer VARV-Sequenz synthetisiert oder mutiert werden dürfen und solche Arbeiten streng von Arbeiten mit anderen OPV-Spezies getrennt werden. Auch wenn die Gefahr des Freisetzens von VARV aus Laboren oder ein natürliches Freisetzen aus z.B. Permafrost-Leichen als gering eingeschätzt wird, wären die Konsequenzen in der immunologisch zunehmend naiven Bevölkerung als katastrophal einzuschätzen (Whitley, 2003). Bei allen Vorsichtsmaßnahmen gilt es zu bedenken, dass die letzten bekannten Todesfälle durch VARV auf einen Laborunfall zurückzuführen sind (Anonymous, 1978; Geddes, 2006).

1.2.7 Kuhpockenviren

Die Kuhpockenviren (CPXV) stellen möglicherweise den Ursprung aller OPV dar. Neben der hohen Ko-Linearität der Genome besitzen CPXV das kompletteste Genom, und auch die variableren Gene an den Genomenden sind im Vergleich zu anderen OPV am vollständigsten (Gubser et al., 2004). Infektionen beim Menschen erfolgen in den meisten Fällen über die Haut durch direkten Kontakt mit infektiösem Gewebe oder Sekreten von Katzen oder anderen infizierten Tieren (Baxby et al., 1994; Kurth et al., 2008b). An der Infektionsstelle bilden sich nach 7–12 Tagen Papeln, die sich zu Vesikeln und anschließend zu schmerzhaften hämorrhagischen Pusteln und schwarzen Krusten entwickeln. Dies geschieht häufig an der Kontaktstelle zum Virus, in der Regel der Hand, der Schulter oder, auch durch Autoinokulation, im

Gesicht. Infizierte Personen zeigen Grippe-ähnliche Symptome, Übelkeit und Muskelschmerzen. In der Regel treten die Vesikel zwar lokal begrenzt auf, es wird aber auch über schwere Verläufe berichtet, die eine Hospitalisierung der Patienten erfordern (Baxby et al., 1994; Bonnekoh et al., 2008). Infektionen im Bereich der Augen sind beschrieben und vermutlich auf Schmierinfektionen zurückzuführen (Tryland et al., 1998; Wolfs et al., 2002). Oft beobachtet man eine Lymphadenopathie der regionalen Lymphknoten. Nach etwa sechs bis acht Wochen trocknen die Pusteln/Krusten ab, wobei Narben zurückbleiben können und gerade im Gesicht korrigierende chirurgische Eingriffe nicht unüblich sind (Bonnekoh et al., 2008). Abbildung 4 zeigt typische Kuhpocken bei einer Katze und beim Menschen.

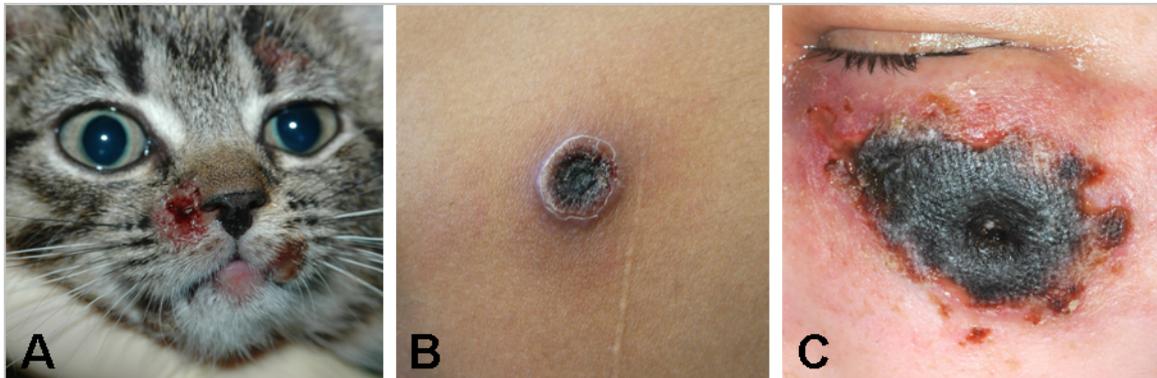


Abbildung 4: Klinische Symptome von Kuhpockeninfektionen. A: Katze, B, C: Typische Hautläsion beim Menschen mit dermal-subkutaner Gewebedestruktion (C).

Bei Immunsupprimierten und bei Patienten mit gestörter lokaler zellulärer Immunantwort kann es zu generalisierten Exanthenen und schweren systemischen Erkrankungen mit letalem Ausgang kommen, die einer VARV-Infektion ähnlich sind. Einen Todesfall gab es bei einem Asthma-Patienten unter immunsuppressiver Therapie (Czerny et al., 1997; Eis-Hubinger et al., 1990; Pfeiff et al., 1991).

Kuhpockenviren wurden bisher nur in Europa und den angrenzenden Westasiatischen Ländern nachgewiesen (Vorou et al., 2008). In Deutschland und anderen europäischen Ländern wurden in den letzten Jahrzehnten keine CPXV-Infektionen bei Rindern beschrieben (Nitsche und Pauli, 2007). In Großbritannien wurden seit 1968 lediglich drei humane Fälle auf Kontakt zu Kühen zurückgeführt, Infektionen mit CPXV in Kühen seit 1976 aber nicht mehr diagnostiziert. Dafür beobachtet man zunehmend Kuhpocken-Erkrankungen bei Katzen, die das Virus dann auch auf den Menschen übertragen können, weshalb man in diesen Fällen auch von „Katzenpocken“ sprach (Bennett und Begon, 1997). Katzen infizieren sich vermutlich bei der Jagd auf infizierte Nagetiere. Aus den Niederlanden wurde von einer direkten Übertragung von einer Ratte auf ein Mädchen berichtet (Wolfs et al., 2002).

CPXV haben ein breites Wirtsspektrum, und letale CPXV-Infektionen wurden in einer Vielzahl von Tieren nachgewiesen (Essbauer et al., 2010). So hat man z.B. Ausbrüche in Zoologischen Gärten beobachtet, in denen eine Vielzahl verschiedener Tierarten betroffen war (Bennett und Baxby, 1996; Kurth et al., 2009; Kurth und Nitsche, 2011).

Die genetische Analyse von CPXV zeigt, dass diese Viren im Gegensatz zu VARV, MPXV, CMLV und ECTV nicht eine eng verwandte Spezies darstellen, sondern eine für OPV unerwartet hohe genetische Variabilität aufweisen, was eine Einteilung in verschiedene, phylogenetisch getrennte Gruppen möglich macht. Diese Eingruppierung ist teilweise vom untersuchten Genombereich abhängig (Gubser et al., 2004; Kaysser et al., 2009; Matz-Rensing et al., 2006; Pelkonen et al., 2003). Die hohe Variabilität der CPXV und die Vielzahl von CPXV-Erkrankungen in verschiedenen Tierspezies lassen die Frage von Unterschieden bei der Pathogenität im Zusammenhang mit der Virus–Wirt-Wechselwirkung offen. Interessanterweise wurde beobachtet, dass ein CPXV-Virus-Isolat aus einem Ausbruch bei Neuweltaffen in einem privaten Zoo (Matz-Rensing et al., 2006) reproduzierbar letal verlaufende Infektionen bei Marmosets (*Callithrix jacchus*) auslöst (Kramski et al., 2010), jedoch in der Maus nicht pathogen ist.

Kuhpocken können ebenso wie Affenpocken als eine *emerging disease* angesehen werden. Daher wird auch in diesem Zusammenhang die Entwicklung von sichereren OPV-Impfstoffen und von Chemotherapeutika diskutiert. Tatsächlich scheint auch in Deutschland die Anzahl der beschriebenen CPXV-Infektionen bei Mensch und Tier in den letzten Jahren anzusteigen. Unklar ist, ob dies primär auf eine gesteigerte Aufmerksamkeit der Ärzte oder auf eine sinkende Immunität gegen die Viren zurückzuführen ist, nachdem in den 1970er Jahren die Impfung gegen humane Pocken eingestellt wurde (Baxby, 1994; Nitsche und Pauli, 2007). Die Erkrankung und der Nachweis von CPXV beim Menschen sind derzeit nicht meldepflichtig.

1.2.8 Infektionen mit anderen Orthopockenviren

Affenpocken

Seit Ausrottung der Menschenpocken sind Affenpocken die für den Menschen pathogenste OPV-Infektion (Marennikova et al., 1989; Parker et al., 2007). In den tropischen Regenwäldern Zentral- und Westafrikas sind MPXV endemisch und führen zu sporadischen Ausbrüchen beim Menschen. Das Reservoir der MPXV sind vermutlich afrikanische Erdhörnchen und Nagetiere (Kulesh et al., 2004b). Zuerst beschrieben wurden die MPXV nach einem Ausbruch bei Versuchsaffen in Dänemark im Jahr 1958 (von Magnus et al., 1959). Infektionen beim Menschen kennt man seit 1970 (Di Giulio und Eckburg, 2004; Parker et al., 2007). Vom klinischen Bild her ähneln Affenpocken den Menschenpocken. Im Gegensatz zu den Menschenpocken beobachtet man häufig eine ausgeprägte unilaterale oder bilaterale Lymphadenopathie. Der weitere Verlauf ist ähnlich wie bei Menschenpocken, wobei hämorrhagische Verläufe bisher nicht beobachtet wurden (Parker et al., 2007).

Die Mortalität bei Primärinfektionen des Menschen liegt bei ~17% mit einer Übertragungsrate von 9% (Breman et al., 1980; Jezek et al., 1988). Die längste dabei beobachtete Infektionskette umfasste sechs Übertragungen (Learned et al., 2005). Seroepidemiologische Untersuchungen zeigen in den Regionen, in denen Affenpocken auftreten, eine erhöhte Sero-

prävalenz gegen OPV, was darauf hinweist, dass nicht erkannte Infektionen mit MPXV bzw. anderen OPV stattfinden. Bei retrospektiven Studien ist allerdings eine laborgestützte Unterscheidung von Windpocken notwendig, da deren Erreger in Afrika häufig Infektionen mit hoher Übertragungsrate verursacht und klinisch nicht immer klar identifiziert wird.

Im Juni 2003 wurden erstmals Affenpocken bei Menschen in den USA diagnostiziert (Centers for Disease Control and Prevention, 2003). Tierhändler „importierten“ MPXV durch infizierte afrikanische Nagetiere, wie z.B. Gambische Hamsterratten, aus Ghana in die USA. In den Tierhandlungen wurde das Virus auf Präriehunde übertragen, welche in verschiedene Bundesstaaten verkauft wurden und dort nachfolgend 81 Personen infizierten (Guarner et al., 2004). Konsequenterweise hat man daher ein internationales Embargo für den Import von möglichen Reservoirtieren für MPXV veranlasst. Der Krankheitsverlauf war bis auf zwei Ausnahmen im Vergleich zu Erkrankungen in Afrika milde, was als Hinweis auf unterschiedlich virulente Virusstämme angesehen wird (Likos et al., 2005). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu Stämmen aus der Demokratischen Republik Kongo die Mortalität und die Mensch-zu-Mensch-Übertragung als deutlich niedriger einzuschätzen sind. In Europa (NL, DK, F) wurde das MPXV ausschließlich bei importierten Affen beobachtet (Arita et al., 1972).

Vaccinia-Virus und verwandte Erreger

Vaccinia-Viren dienen als Prototyp im Genus OPV und wurden zur Impfung gegen Menschenpocken eingesetzt (Damon, 2007). Neben der Verwendung als Impfstoff können VACV auch natürlich auftreten (Silva-Fernandes et al., 2009). VACV weisen ein breites Wirtsspektrum auf und können in einer Vielzahl von Säugetieren zu schweren Erkrankungen führen. Ein natürliches Reservoir für VACV ist nicht bekannt. VACV und Derivate werden nicht nur für die Impfung gegen VARV verwendet (Paran und Sutter, 2009), sondern dienen als Vektor in der Molekularbiologie und als Ausgang für die Entwicklung von modernen Impfstoffen gegen Infektionserreger, aber auch in der Krebstherapie (Drexler et al., 2004; Gomez et al., 2008; Shen und Nemunaitis, 2005). Laborinfektionen mit VACV bei nicht-immunisierten Personen werden gelegentlich berichtet (Lewis et al., 2006; Moussatche et al., 2003; Wlodaver et al., 2004).

Natürliche Infektionen mit VACV-ähnlichen Viren stellen insbesondere in Indien und Brasilien für Mensch und Tier mit engem Kontakt zu Büffeln und Milchkühen ein gesundheitliches Problem dar (Baxby und Hill, 1969; Moussatche et al., 2003; Moussatche et al., 2008; Singh et al., 2007). In Brasilien wurden in den letzten Jahrzehnten zunehmend solche Infektionen mit VACV-ähnlichen Isolaten beobachtet (Damaso et al., 2000; Drumond et al., 2008; Leite et al., 2005; Trindade et al., 2006). Infizierte Menschen entwickelten hauptsächlich an den Händen, Armen und im Gesicht Vesikel, begleitet von Fieber, Kopfschmerzen, Schweißausbrüchen und vergrößerten axillären Lymphknoten (Nagasse-Sugahara et al., 2004). Die klinischen Symptome weisen darauf hin, dass zumindest bei einem Teil der Patienten eine virä-

mische Phase auftritt. Nagetiere werden als Reservoir für diese Erreger angesehen, da vergleichbare Viren aus Ratten und Mäusen isoliert werden konnten und eine hohe Seroprävalenz in Nagern nachgewiesen wurde.

Brasilianische Isolate wurden im Genus OPV unter der Speziesbezeichnung BRZ-VACV bzw. BR-VACV zusammengefasst, die sich auch durch phylogenetische Analysen in zwei voneinander abtrennbare *clades* eingruppierten lassen. Der Ursprung der BRZ-VACV ist unbekannt (Moussatche et al., 2008). Einerseits weist die enge phylogenetische Verwandtschaft der Isolate mit Impfviren darauf hin, dass es sich bei BRZ-VACV um Impfviren handelt, die sich in der Natur z.B. in der Nagerpopulation landesweit ausgebreitet haben. Wann VACV in die Nager gelangte und ob es multiple Eintragungen gab, ist unklar (Trindade et al., 2004). Tabelle 3 fasst die klinischen Charakteristika der humanen OPV-Infektionen zusammen.

Tabelle 3: Zusammenfassung klinischer Charakteristika humaner OPV-Infektionen.

Charakteristikum	VARV	CPXV	MPXV	VACV
Übertragung				
durch:	Aerosole, direkten Kontakt	direkten Kontakt, Haut-Läsionen	direkten Kontakt, Haut-Läsionen, <i>bushmeat?</i>	Aerosole, direkten Kontakt, Haut- Läsionen
Mensch-zu-Mensch	ja	nicht gezeigt	ja	ja
Inkubationszeit	12–14 Tage	1–2 Wochen	1–2 Wochen	3 Tage bis 6 Wochen
Infektion	systemisch	lokal, sehr selten systemisch	systemisch	lokal, sehr selten systemisch
Symptome	Fieber, Mattigkeit, Gliederschmerzen	regionale Lymphadenitis	Fieber, Mattigkeit, Lymphadenopathie	Fieber, Lymphadenopathie
Letalität	10–50%	nur bei Immunsupprimierten schwere Verläufe	1–10%	nur bei Immunsupprimierten schwere Verläufe
Krankheitsdauer	4 Wochen	4–8 Wochen	2–3 Wochen	1–2 Wochen

1.3 Diagnostik von Pockenviren

Differentialdiagnostisch müssen bei Verdacht auf eine OPV-Infektion verschiedene Krankheiten ausgeschlossen werden (Fenner, 2006). Dazu zählen Ecthyma contagiosum, Melkernoten, Herpesinfektionen, Aktinomykosen und Milzbrand, Scabies, Arzneimittel-Nebenwirkungen, Insektenstiche, Impetigo und Molluscum contagiosum. Zu Zeiten der VARV-Eradikation war die häufigste Differentialdiagnose die der Windpocken, verursacht durch das

Varizella-Zoster-Virus. Windpocken lassen sich in späteren Phasen der Infektion klinisch gut von Menschenpocken unterscheiden, da der Ausschlag bevorzugt am Körperstamm auftritt und nicht wie bei Menschenpocken an der Peripherie, vor allem den Sohlen und Handflächen (Fenner et al., 1988). Die Läsionen bei Windpocken sind oberflächlicher als bei Menschenpocken und können im Gegensatz dazu in unterschiedlichen Entwicklungsstadien auftreten. Da zu Zeiten der Eradikation Infektionen mit anderen Pockenviren nur wenig Bedeutung beigemessen wurde, war die Unterscheidung von Windpocken häufig ausreichend. Diese Unterscheidung ist mit dem EM anhand der unterschiedlichen Morphologien von Herpesviren (Varizella-Zoster-Virus, Windpocken) und OPV leicht und schnell möglich. Zu Beginn der 1980er Jahre wurde jedoch in Afrika systematisch das Risiko von Erkrankungen mit Affenpocken untersucht, um den Erfolg der Menschenpocken-Eradikation durch Verwechslungen nicht zu gefährden. Hierfür war eine verlässliche Differenzierung der OPV notwendig, die auf den unterschiedlichen biologischen Charakteristika der humanpathogenen OPV basierte (Tabelle 4).

Tabelle 4: Biologische Charakteristika der humanpathogenen OPV, früher für die Diagnostik verwendet.

Charakteristikum	VARV	CPXV	MPXV	VACV
Wirtsbereich	eng	breit	breit	breit
Pocken auf der CAM ¹	klein, opaque, weiß	groß, hämorrhagisch	klein, opaque, hämorrhagisch	variabel ³ , weiß oder hämorrhagisch
<i>Ceiling</i> Temperatur ² [°C]	37,5–38,5	40	39	41
Letalität für				
Maus	niedrig	variabel ³	hoch	hoch/sehr hoch
Hühnerembryo	niedrig	hoch	mittel	sehr hoch
<i>A-type inclusion bodies</i>	nein	ja	nein	nein
<i>B-type inclusion bodies</i>	ja	ja	ja	ja

¹ Chorioallantoismembran, ² bestes Wachstum auf der CAM, ³ Stamm-abhängig.

Nach der Eradikation der Menschenpocken haben die Pockenviren insgesamt kaum Aufmerksamkeit in der Diagnostik und Forschung erhalten. Nur wenige Labore weltweit haben sich mit der Pathogenese und Therapie von Pockenvirusinfektionen über VARV und VACV hinaus befasst, wobei die Entwicklung neuer, besser verträglicher Impfstoffe im Mittelpunkt stand (Cohen et al., 2006). Erst die Ereignisse um die Anschläge mit Anthraxsporen im Oktober 2001 in den USA haben die Pockenviren als potentielle Kandidaten für bioterroristische Anschläge der breiten Öffentlichkeit (und der Politik) in das Gedächtnis gerufen. Deshalb werden nun seit ca. 8–10 Jahren vermehrt diagnostische Verfahren für VARV und deren Differenzierung von anderen Pockenviren und klinisch relevanten Bakterien entwickelt und der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt.

1.3.1 Virusanzucht

Die Diagnostik und Differentialdiagnostik der Pockenviren erfolgte ursprünglich durch Verimpfung von klinischen Proben auf die Chorioallantoismembran (CAM) 11 Tage alter embryonierter Hühnereier (siehe Tabelle 4) (Kurth und Nitsche, 2007). Anhand der Vermehrungsfähigkeit der Viren auf der CAM bei definierten Temperaturen, der Morphologie der entstehenden Pocken und histologischer Untersuchungen konnten verschiedene OPV voneinander und von VARV sowie Herpesviren differenziert werden (Fenner, 2006). Diese Methode war der Goldstandard der WHO während der Eradikation, wird heute aber nur noch in Speziallaboren eingesetzt. Die Virusanzucht geschieht dagegen routinemäßig in Zellkulturen auf verschiedenen Zelllinien (Kurth und Nitsche, 2007). Infizierte Zellen lassen sich mit Orthopockenvirus-spezifischen Antikörpern durch immunzytologische Färbung schnell und einfach nachweisen. Verglichen mit anderen Methoden bleibt die Virusanzucht der beste Weg replikationsfähige Viren nachzuweisen, ist aber zeit- und arbeitsintensiv.

1.3.2 Elektronenmikroskopie (EM)

Zu Zeiten der Variola-Eradikation war die Elektronenmikroskopie die schnellste Methode um VARV als Orthopockenvirus von Varizella-Zoster-Virus, einem Herpesvirus, anhand der deutlich unterschiedlichen Morphologie abgrenzen zu können (Biel und Gelderblom, 1999). Sie ermöglicht aus klinischen Proben mit Hilfe der Negativkontrastierung innerhalb von 30–60 Minuten eine Differenzierung von anderen Erregern, die Hautveränderungen induzieren können und dadurch differentialdiagnostisch abgeklärt werden müssen, wie PPV- und Herpesviren, aber auch Bakterien wie *Bacillus anthracis*. Die EM bietet damit eine Erreger-unabhängige Diagnostik des offenen Blicks. Eine Differenzierung der verschiedenen Spezies innerhalb des Genus OPV ist mit der EM allerdings nicht möglich, da alle OPV die gleichen morphologischen Eigenschaften aufweisen (Curry et al., 2006; Long et al., 1970). Fehlt also eine typische klinische Symptomatik, eine verlässliche Anamnese oder werden Umweltproben untersucht, bedeutet dies, dass bei einem positiven Befund für OPV immer eine weitere Typisierung erforderlich ist.

1.3.3 Serologie

Der Nachweis einer OPV-Infektion kann mit serologischen Testmethoden wie dem ELISA und dem Immunfluoreszenz-Test erbracht werden. Der Nachweis von OPV-spezifischen IgM ist ein Hinweis auf eine akute OPV-Infektion, die durch ein zweites, in einem Abstand von 10–14 Tagen gewonnenes Serum weiter abgeklärt werden kann (Essbauer et al., 2004; Kurth und Nitsche, 2007). Ein Aviditäts-Test kann ebenfalls Hinweise auf eine akute Infektion geben, ist jedoch nicht routinemäßig verfügbar (Pelkonen et al., 2003). Die serologische Differenzierung der Immunantwort gegen OPV-Spezies ist bisher nicht sicher möglich, was durch die enge Antigenverwandtschaft innerhalb des Genus bedingt ist. Aufwendige Prä-Adsorptionen von Seren mit Antigenen verschiedener OPV-Spezies und anschließende Unter-

suchungen auf die Reaktivität ermöglichen in begrenztem Umfang eine Differenzierung (Dubois und Slifka, 2008; Goldberg et al., 2008). So ist die Differenzierung von neutralisierenden Antikörpern gegen verschiedene OPV-Spezies auf Grund der engen Antigenverwandtschaft ebenfalls nicht möglich. Der Neutralisationstest kann jedoch zur Verfolgung der Immunantwort nach Impfung, zur Bestimmung des Immunstatus oder als Bestätigungstest in der Serologie eingesetzt werden.

1.3.4 Nukleinsäurenachweismethoden

Als besonders geeignet haben sich PCR-basierte Verfahren erwiesen, die neben einer schnellen und sensitiven Identifizierung auch die Differenzierung von verschiedenen OPV-Spezies zulassen (Loparev et al., 2001; Meyer et al., 1997; Ropp et al., 1995). Darüber hinaus ist die Differentialdiagnostik innerhalb der *Poxviridae* (OPV, PPV und MOCV) und zu anderen Viren wie Varizella-Zoster- und Herpes Simplex-Virus, aber auch zu Bakterien wie *Bacillus anthracis* möglich (Kurth und Nitsche, 2007). Während früher PCR-Verfahren in Kombination mit Restriktionsfragmentlängenanalyse eine Differenzierung von OPV erlaubten (Esposito und Knight, 1985), haben sich in den letzten Jahren real-time-PCR-Verfahren durchgesetzt (Kurth und Nitsche, 2007; Pfeffer und Meyer, 2007). Bedingt durch das hohe Bedrohungspotential, welches die VARV für die Bevölkerung besitzen (Tegnell et al., 2002), sind im Verdachtsfall besonders hohe Anforderungen an die Analyse-Zeit, die Sicherheit, die Spezifität und die Sensitivität der diagnostischen Methoden zu stellen (Madeley, 2003).

1.4 Prävention und Therapie von Pockenvirus-Infektionen

1.4.1 Die Pockenimpfung

Die Impfung mit Kuhpockenviren oder Vaccinia-Viren bietet die Möglichkeit am erfolgreichsten vor einer VARV-Infektion zu schützen (Fenner et al., 1988; Fulginiti et al., 2003a). Allerdings verwendeten die ersten gezielten Versuche um Infektionen mit Menschenpocken zu verhindern nicht CPXV oder VACV, sondern Material von Menschenpocken-Erkrankten. Vermutlich ausgehend von China wurde bei der so genannten Variolation Krustenmaterial von Pockenkranken in die Haut von Gesunden geritzt oder getrocknetes Krustenmaterial auf die Nasenschleimhaut gerieben. Dieses Verfahren führte in der Regel zu einem milden Krankheitsverlauf, jedoch noch bei 1–2% der behandelten Personen zum Tode (Grundy, 2000). Im 18. Jahrhundert beobachteten dann Edward Jenner und Benjamin Jesty, dass Melkfrauen, die durch das Melken eine Pockeninfektion des Rindes durchgemacht hatten, gegen die Menschenpocken geschützt waren. Jenner infizierte zuerst zwei gesunde Jungen, die noch keine Pockeninfektion erlebt hatten, mit den Pocken vom Rind und später mit Menschenpocken. Die Jungen blieben gesund (Jenner, 1799; Jenner, 1800; Jenner, 1878). Diese Erfolge führten weltweit zu mehr oder weniger systematischen Impfprogrammen. Der Vorgang der Impfung wurde Vakzination genannt, abgeleitet von lat. *vacca*, die Kuh. Das verwendete Virus wurde später analog als Vaccinia-Virus bezeichnet.

Der Erfolg der Vakzination war beeindruckend. Bayern führte beispielsweise bereits 1807 die Pocken-Impfpflicht ein, Preußen und das Deutsche Reich hingegen erst 1874. Dementsprechend starben im Jahr 1871 in München nur 89, in Berlin dagegen 623 Menschen pro 100.000 Einwohner an den Menschenpocken. Lokale Impfprogramme zeigten in verschiedenen Regionen der Welt auch unterschiedliche Erfolge. So war Europa bereits im Jahr 1953 Menschenpocken-frei (Fenner et al., 1988). Da die Pocken trotzdem weltweit regelmäßig große Zahlen an Todesopfern forderten, beschloss die World Health Assembly im Jahr 1967 auf intensiven Wunsch der Sowjetunion ein weltweites Impfprogramm durchzuführen (Henderson, 1976; Henderson, 1980). Über 10 Jahre wurden unter Federführung der WHO weltweit umfassende Impfprogramme und bei Ausbrüchen sorgfältige Quarantänemaßnahmen durchgeführt. Die Impfung führte in der Regel zu einer lokalen Impfreaktion, die auch als Marker (*take*) für eine erfolgreiche Impfung angesehen werden konnte und den Erfolg damit kontrollierbar machte. Wesentlich für den Durchbruch der Impfung war die Bereitstellung eines gefriergetrockneten Impfstoffs, der damit besser lager- und transportfähig war. Der letzte natürliche Menschenpockenfall mit *Variola major* wurde 1975 in Südafrika und mit *Variola minor* 1977 in Somalia beschrieben (Ladnyi und Breman, 1978). Ein Jahr später wurde von zwei letalen VARV-Infektionen nach einem Laborunfall in Großbritannien berichtet (Anonymous, 1978; Geddes, 2006). Seitdem sind keine Infektionen mit Menschenpocken mehr bekannt. Am 8. Mai 1980 wurden die Menschenpocken von der WHO für ausgerottet erklärt (WHO, 1980). Der Impfstoff zeigte aber eine Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen, u.a. die generalisierte *Vaccinia*, das *Eczema vaccinatum*, sowie die Progressive *Vaccinia* (*Vaccinia gangraenosum*) und bakterielle Kontaminationen mit nachfolgenden Super-Infektionen. Sehr selten traten die Impfenzephalitis (1:100.000) bzw. Todesfälle (1:1.000.000) auf (Cono et al., 2003; Fulginiti et al., 2003b). Daher wurde weltweit die Impfpflicht zwar zeitnah, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgehoben. In der Bundesrepublik Deutschland war dies das Jahr 1977, in der Deutschen Demokratischen Republik 1980.

Theoretisch ist auch heute eine prophylaktische Impfung gegen OPV mit den vormals zugelassenen oder auch in der Entwicklung befindlichen VACV-Impfstoffen möglich. So wurden in den USA nach dem 11. September 2001 bestimmte Personengruppen, wie das Militär und der Gesundheitsdienst, mit VACV immunisiert (Thomssen, 2003). Neue attenuierte Impfstoffe der dritten Generation, wie der replikationsdefiziente MVA (Modified Vacciniavirus Ankara) oder der replikationskompetente japanische Impfstamm LC16m8, werden die erfolgreich eingesetzten Impfstoffe der zweiten Generation für prophylaktische Impfungen zukünftig ersetzen (Bonilla-Guerrero und Poland, 2003; Paran und Sutter, 2009). Der Impfstoff LC16m8 ist in Japan zugelassen worden, und eine Zulassung von MVA oder MVA-Derivaten steht bevor (Kenner et al., 2006; Parrino et al., 2007; Saito et al., 2009). Am weitesten fortgeschritten ist hierbei die klinische Prüfung des MVA-Impfstoffes IMVAMUNE in den USA (Jones, 2008; Kennedy et al., 2009). Neue Daten aus unterschiedlichen Tiermodellen lassen den Schluss zu, dass durch MVA-Immunsierung kurzfristig, evtl.

sogar postexpositionell, ein wirksamer Schutz gegen OPV-Infektionen erzielt werden kann (Earl et al., 2007; Paran et al., 2009). In Ausbruchsgeschehen dagegen wird von der WHO bislang davon ausgegangen, dass weiterhin die belastbaren Impfstoffe der zweiten Generation eingesetzt werden.

Interessanterweise ist die Herkunft eines der effizientesten Impfstoffe in der Geschichte der Infektionsmedizin nicht bekannt. Heute weiß man, dass die zur Eradikation eingesetzten VACV eine eigene Spezies im Genus der Orthopockenviren darstellen und nicht mit den vermutlich von Edward Jenner verwendeten CPXV identisch sind. Der genaue Zeitpunkt des Wechsels von CPXV zu VACV und deren Ursprung sind unbekannt. Neben der Idee eines veränderten CPXV oder VARV gilt es als möglich, dass VACV von einem Pockenvirus des Pferdes abstammen (Symons et al., 2002).

Seit der Einstellung der Impfungen ist in Deutschland über den Serostatus der Bevölkerung nichts bekannt. Untersuchungen in verschiedenen Ländern der Welt haben gezeigt, dass vormals geimpfte Personen Antikörper gegen VACV aufweisen können, auch neutralisierende Antikörper. Epidemiologische Studien legen dar, dass nach etwa 3 Jahren 90% der Geimpften noch einen ausreichenden Schutz aufwiesen, der im Laufe der Jahre weiter abnahm. Was der Nachweis von Antikörpern nach 30 Jahren für den Schutz vor einer erneuten Infektion bedeutet, ist allerdings unklar (Paran und Sutter, 2009; Thomssen, 2003). Da für den Erfolg der Impfung die starke immunologische Kreuzreaktivität innerhalb der OPV entscheidend war, spielten andere OPV, wie die MPXV oder CPXV, für den Menschen in dieser Zeit nur eine untergeordnete Rolle und wurden höchstens bei Verdacht auf eine VARV-Infektion zur Differentialdiagnose in Erwägung gezogen.

1.4.2 Therapie

Die Entwicklung von Chemotherapeutika zur Behandlung von OPV-Infektionen wurde insbesondere im Hinblick auf potenzielle bioterroristische Anschläge mit VARV vor dem Hintergrund der hohen Nebenwirkungsraten des verfügbaren Impfstoffes vorangetrieben (Bray und Roy, 2004; Howell et al., 2007). Da eine klinische Prüfung der Wirksamkeit am Menschen nicht möglich ist, müssen neu identifizierte Substanzen in mindestens zwei unabhängigen Tiermodellen Wirksamkeit gegen VARV/OPV gezeigt haben (Jordan und Hruby, 2006).

Zurzeit gibt es zwei vielversprechende Kandidaten. Cidofovir ist ein azyklisches Nukleosidphosphat und hemmt die DNA-Polymerisation verschiedener DNA-Viren. Es wird zur Therapie der Cytomegalovirus-bedingten Retinitis bei HIV-Infizierten verwendet und hemmt auch die Replikation von OPV (De Clercq, 2002; Sliva und Schnierle, 2007). Auf Grund seiner hohen Nephrotoxizität und der intravenösen Applikation kann Cidofovir nur in begrenztem Umfang eingesetzt werden. Ein Lipid-konjugiertes Derivat von Cidofovir (Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001) zeigt eine höhere Aktivität gegen dsDNA-Viren, ist oral bioverfügbar und zeigt keine Nephrotoxizität. In diversen Tiermodellen hat es Wirksamkeit gegen OPV bewiesen (Parker et al., 2008).

Eine Neuentdeckung stellt die Substanz ST-246 dar. ST-246 ist ein *small molecule compound*, das spezifisch mit dem OPV-Hüllprotein (F13L) interagiert und so die Bildung von EV und damit den Austritt von OPV aus infizierten Zellen effektiv hemmen kann (Yang et al., 2005). In Tierexperimenten hat sich die Behandlung mit ST-246 sogar noch als wirksam erwiesen, wenn bereits Krankheitssymptome aufgetreten sind (Quenelle et al., 2007a). Auch die gleichzeitige Impfung mit MVA oder ACAM2000 führt zu einer zellulären und humoralen Immunantwort, die Mäuse gegen eine Überinfektion mit pathogenem VACV schützt (Grosenbach et al., 2007). CMX001 wies in Kombination mit ST-246 einen synergistischen Effekt bei der Behandlung von experimentellen OPV-Infektionen auf (Quenelle et al., 2007b). ST-246 wurde kürzlich erfolgreich zur Behandlung eines 28 Monate alten Kindes eingesetzt, das durch seinen VACV-geimpften Vater infiziert wurde und schwer an einem *Eczema vaccinatum* erkrankte (Vora et al., 2008). In Deutschland steht ST-246 für den so genannten *compassionate use* zur Verfügung, ist aber noch nicht für die Therapie zugelassen. Eine weitere Möglichkeit der Therapie ist die passive Impfung mit Immunglobulinpräparationen (Vaccinia IgG; VIG). Sie wird bisher nur bei Auftreten von Impfkomplicationen empfohlen. VIG-Präparate stehen jedoch weltweit nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung (Wittek, 2006).

2 Zielsetzung

Nach der Eradikation der Variola-Viren vor 30 Jahren sind Pockenviren aus dem Fokus von Wissenschaft und Gesundheitspolitik gerückt. Erst seit den Anthrax-Anschlägen in den USA im Oktober 2001, die interessanterweise häufig im Zusammenhang mit den Anschlägen auf das World Trade Center am 11. September 2001 genannt werden, jedoch tatsächlich in keinerlei Zusammenhang stehen, wird den Pockenviren wieder mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Dabei spielen zwei Aspekte eine größere Rolle: 1. Das Wiederauftreten von Variola-Viren, sowohl im Rahmen bioterroristischer Ereignisse als auch auf natürlichem Wege im Sinne einer *re-emerging disease*, und 2. Das Auftreten neuer zoonotischer Pockenvirus-Varianten, die als *emerging diseases* den Wirtswechsel vom Tier auf den Menschen geschafft haben und ein hohes pathogenes Potential für den Menschen besitzen. Hier scheinen Kuhpockenviren aufgrund ihres breiten Wirtsbereiches und ihrer genetischen Ausstattung eine besondere Rolle zu spielen.

Diese Arbeit befasst sich daher zunächst mit Fragen der Diagnostik von Pockenviren, der sicheren Differenzierung von Variola-Viren von anderen Orthopockenviren und darüber hinaus mit der Erkennung von Kuhpockenviren. Dabei sollten für die Primärdiagnostik von Pockenvirus-Infektionen verlässliche und schnelle Verfahren etabliert werden, um sowohl möglicherweise *re-emerging* Variola-Viren in klinischen und Umweltproben aus bioterroristischen Anschlägen zu erkennen als auch *emerging* Kuhpockenviren aus Infektionen bei Mensch und Tier. Damit sollte die Situation in Deutschland bezüglich des Auftretens von (Kuh-)Pockenvirus-Infektionen erfasst werden können. Die Herausforderung stellt hier die schlechte Informationslage bezüglich verfügbarer Sequenzen und verfügbarer DNA als Kontrollen für die PCR dar.

Schließlich sollten für eine Risikobewertung von Pockenvirus-Infektionen in Deutschland folgende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es regelmäßig Infektionen mit OPV in Deutschland?
- Bei welchen Spezies außer dem Menschen treten diese Infektionen auf?
- Wie variabel sind die an den Geschehen beteiligten Pockenviren?
- Durch welche Spezies werden Pockenviren auf den Menschen übertragen?
- Gibt es bei diesen Infektionen Übertragungen von Mensch zu Mensch?

Die große genetische Heterogenität der Kuhpockenviren und deren individuelle Interaktion mit spezifischen Wirtsspezies und daraus resultierenden variierenden Pathogenitäten werfen die Frage auf, ob Kuhpockenviren zukünftig die ökologische Nische besetzen werden können, welche die Variola-Viren nach der Eradikation offen gelassen haben.

3 Eigene Arbeiten

3.1 Diagnostik von Orthopockenviren: Identifizierung und Differenzierung in klinischen Proben

3.1.1 Einführung und Stand der Forschung

Vor der Eradikation des VARV spielte die Differenzierung der Orthopockenviren eine untergeordnete Rolle. Priorität hatten zunächst die Identifizierung von OPV, was nahezu immer eine VARV-Infektion bedeutete, und die Unterscheidung von OPV und Herpesviren, zur Abgrenzung von Windpocken (Varizella-Zoster-Virus). Dies konnte schnell und sicher mit Hilfe der Elektronenmikroskopie durchgeführt werden, die anhand morphologischer Kriterien eine klare Unterscheidung von OPV und Herpesviren in ~15 Minuten nach der Probennahme zulässt (Biel und Gelderblom, 1999). Auch die vergleichsweise hohe Nachweisgrenze der EM stellte aufgrund der hohen Viruslasten in klinischen Verdachtsproben normalerweise kein Problem dar. Nach der Eradikation der VARV hat sich die Situation verändert. Der Nachweis von VARV bedeutet heute entweder die wissentliche Ausbringung von VARV zu bioterroristischen Zwecken oder das natürliche Wiederauftreten der VARV. Es ist bekannt, dass VARV zu Zeiten des Kalten Krieges für die biologische Kriegsführung angezüchtet und in großen Mengen gelagert wurden (Alibek und Handelmann, 1999). Berichten zufolge soll die Sowjetunion Mittelstreckenraketen mit VARV beschickt haben. Gerade in der nicht-(mehr) geimpften und damit überwiegend immunologisch naiven Bevölkerung hätte ein Ausbruch mit VARV katastrophale Auswirkungen. Darüber hinaus ist nicht bekannt, wie die Letalität und die Ausbreitung in der heutigen Bevölkerung vor dem Hintergrund eines ständig wachsenden Anteils immunsupprimierter Personen und eines hohen Reiseaufkommens zu bewerten ist. Deshalb sind die VARV in verschiedenen Bewertungslisten für biologische Gefahrstoffe jeweils in die höchste Kategorie der Gefährlichkeit eingestuft worden. Abgesehen von der Tatsache, dass Arbeiten mit VARV nur an zwei von der WHO kontrollierten Instituten zugelassen sind (WHO, 2002), erfordern sie die höchste Labor-Sicherheitsstufe 4. Von Experten wird die Wahrscheinlichkeit eines bioterroristischen Anschlags mit VARV als gering eingestuft, die Konsequenzen für die Bevölkerung, das Gesundheitssystem und die Wirtschaftssysteme jedoch als maximal, was nach der Formel „Risiko = Eintrittswahrscheinlichkeit × Folgen“ ein hohes Risiko bedeutet (Alibek, 2004; Beeching et al., 2002; Gottschalk und Preiser, 2005). Ein natürliches Wiederauftreten von VARV ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, wobei man recht sicher davon ausgehen kann, dass es kein Reservoir-Tier gibt, in welchem VARV seit 30 Jahren unbemerkt zirkulieren konnte. Eher hat die hohe Tenazität der Pockenviren Diskussionen angestoßen, ob ein „Überleben“ der Viren in Permafrost-Leichen oder in mumifizierten Leichen möglich ist und zum Beispiel durch das Abtauen von Gletschern VARV freigesetzt werden könnten (Lewin, 1985). Bislang gibt es jedoch keinen Hinweis darauf.

Heutzutage ist nicht nur die Differenzierung von Varizella-Zoster-Virus und anderen relevanten Erregern notwendig, sondern vielmehr auch die Differenzierung der OPV-Spezies untereinander (Kurth und Nitsche, 2007). Nach der VARV-Eradikation beobachtet man vermehrt Infektionen mit anderen OPV, wie in Afrika mit MPXV und in Europa mit CPXV. Eine verlässliche Diagnostik von OPV sollte daher folgende Kriterien erfüllen.

- hohe Sensitivität
- hohe Spezifität für OPV und VARV
- kurze Nachweiszeit

Trotz hoher genetischer Homologie ist die sichere Differenzierung der OPV nur anhand charakteristischer Sequenzabschnitte bzw. *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) möglich. Hier bietet die real-time PCR Möglichkeiten des schnellen und sensitiven Nachweises und darüber hinaus die Differenzierung mit Hilfe Spezies-spezifischer Oligonukleotide (Mackay, 2004).

Daher wurden in der Studie verschiedene OPV-spezifische real-time PCR-Systeme etabliert, die parallel einen hocho sensitiven Nachweis von allen OPV und eine Typisierung der Viren, auch von VARV, durch anschließende Schmelzkurven-Analyse erlauben. Die parallele Untersuchung verschiedener Bereiche des Genoms erhöht die Verlässlichkeit der Aussage. Um in Mischungen von OPV auch VARV noch mit hoher Sensitivität nachweisen zu können, wurde ebenfalls ein VARV-spezifisches real-time PCR-System etabliert. Die Herausforderung im Design dieser Systeme lag in den nur wenigen bekannten Sequenzinformationen (13 OPV-Genome).

Publikation: Nitsche, A., Ellerbrok, H., Pauli, G. *Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. J Clin Microbiol, 42, 2004, 1207-1213.*

3.2 Diagnostik von Orthopockenviren: Umweltproben

3.2.1 Einführung und Stand der Forschung

Die diagnostische PCR bietet eine Reihe von Vorteilen, welche die PCR zum Goldstandard in der heutigen Infektionsdiagnostik gemacht haben. In der Regel können gut etablierte PCR-Systeme sehr geringe Erregermengen von <10 Genomen/Reaktion nachweisen, der Nachweis ist mit 3–4 Stunden inklusive DNA-Präparation schnell und kann je nach Anforderung hochspezifisch sein. Ein großer Nachteil der PCR war über Jahre die Gefahr der so genannten *carry over*-Kontaminationen durch selbst erzeugte PCR-Produkte bei der anschließenden Gelanalyse (Borst et al., 2004). Ein weiterer Nachteil ist die unzureichende Möglichkeit der Quantifizierung, da die Standard-PCR ein Endpunktverfahren ist (Heid et al., 1996). Gerade durch die Weiterentwicklung der PCR zur real-time PCR sind diese beiden Nachteile aufgehoben worden (Mackay et al., 2002). Die real-time PCR bietet die Möglichkeit des *on-line*-Monitorings der PCR-Reaktion und macht damit die post-PCR-Gelanalyse unnötig. Dadurch müssen PCR-Produkte nicht offen gehandhabt werden, und eine Kontamination ist nahezu ausgeschlossen. Zusätzlich wird die Zeit bis zum Ergebnis stark verkürzt und diagnostische PCR-Systeme können Resultate in weniger als einer Stunde liefern. Wenn auch nicht für alle diagnostischen Fragestellungen erforderlich, bietet die real-time PCR darüber hinaus den Vorteil der vergleichsweise exakten Quantifizierung, was beispielsweise zur Überwachung von antiviralen Therapien essentiell ist.

Trotzdem besitzt die diagnostische PCR weiterhin einen Nachteil, der auch durch die real-time PCR nicht verbessert werden kann: PCR bedeutet immer den Nachweis eines Teils des Genoms eines Erregers, niemals dessen Infektiosität oder Replikationskompetenz (Mackay et al., 2002; Mackay, 2004). Bei klinischen Proben stellt dies in der Regel kein Problem dar, da der Erregernachweis mit einer klinischen Symptomatik und weiteren klinischen Parametern korreliert werden kann. Viren, die eine klinische Symptomatik hervorrufen, müssen replikationskompetent sein. Bei Umweltproben hingegen kann das die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Als Umweltproben bezeichnet man diagnostische Proben, die aus einer Begleitsubstanz und möglicherweise aus einem Erreger bestehen. Bei den Begleitsubstanzen handelt es sich häufig um feste Stoffe, wie Erde, Zucker o.ä., sowie Flüssigkeiten, seltener um Lebensmittel. Diese Begleitsubstanzen können nun einen Einfluss auf die Infektiosität der Erreger, aber auch auf deren verlässlichen Nachweis besitzen. Im besten Fall ist die Infektiosität reduziert oder aufgehoben, der Nachweis aber möglich. Im schlechtesten Fall ist der Nachweis inhibiert, die Erreger bleiben aber infektiös. Das bedeutet, dass für die Diagnostik von Umweltproben Methoden eingesetzt werden müssen, welche die Effekte der Begleitsubstanzen einerseits kompensieren können, sowie Methoden, die andererseits die Replikationskompetenz des Erregers beweisen können. Grundsätzlich kann nur die Anzucht der Viren in der Zellkultur oder im Versuchstier die Replikationskompetenz beweisen, was jedoch zeitintensiv ist. In den beiden folgenden Studien wurden zunächst die Effekte beschrieben, die eine Auswahl von möglichen Begleitsubstanzen auf den Nachweis von VACV als Modell-

virus für VARV in der EM, der Zellkultur und in der real-time PCR besitzen. Für die PCR wurden in den folgenden Publikationen Lösungswege entwickelt um inhibitorische Effekte dieser Substanzen zu minimieren. Des Weiteren wurde ein real-time PCR-basiertes System zum Nachweis der Replikationskompetenz von OPV etabliert, welches den Nachweis früh exprimierter viraler RNA-Moleküle nach kurzer Kultivierung nutzt. Diese RNAs werden nur dann gebildet, wenn die Viren tatsächlich replizieren. Durch Auswahl früh und hoch exprimierter RNAs konnte die Nachweisgrenze deutlich herabgesetzt werden.

Publikation: Kurth, A., Achenbach, J., Miller, L., Mackay, I.M., Pauli, G., Nitsche, A. *Orthopoxvirus detection in environmental specimens during suspected bioterror attacks: inhibitory influences of common household products. Appl Environ Microbiol, 74, 2008a, 32-37.*

Publikation: Nitsche, A., Stern, D., Ellerbrok, H., Pauli, G. *Detection of Infectious Poxvirus Particles. Emerg Infect Dis, 12, 2006, 1139-1141.*

3.3 Probleme bei der Diagnostik von Orthopockenvirus-Infektionen des Menschen

3.3.1 Einführung und Stand der Forschung

Nach der Eradikation der Menschenpocken herrscht bei behandelnden Ärzten verbreitet die Meinung vor, dass es keine Pockenvirus-Infektionen beim Menschen mehr gibt. Dabei werden die zwar noch seltenen, aber zahlenmäßig stetig zunehmenden Infektionen mit Kuhpockenviren und Infektionen mit Parapockenviren nicht beachtet (Baxby et al., 1994; Nitsche und Pauli, 2007). Ebenso sind heutzutage importierte Pockenvirus-Infektionen möglich (Dhar et al., 2004). Trotz einer erhöhten Aufmerksamkeit in Bezug auf VARV-Infektionen im Zusammenhang mit möglichen bioterroristischen Ereignissen stellen diese oft nicht die erste klinische Diagnose dar. Wie die im Jahr 2003 in den USA aufgetretenen Affenpocken-Infektionen gezeigt haben, gab damals die diagnostische EM erste Hinweise auf eine Infektion mit Orthopockenviren, worauf die Typisierung molekularbiologisch erfolgte (Hutson et al., 2007). Häufig sind bereits diverse Krankheitsbilder ausgeschlossen, die nicht erkannten Kuhpocken-Läsionen operativ entfernt oder die Patienten prophylaktisch mit Antibiotika behandelt worden, bis eine Diagnostik für Orthopockenviren angefordert wird. Dies bedeutet, dass unter den behandelnden Ärzten, gerade den zuerst konsultierten Dermatologen, eine höhere Aufmerksamkeit gefordert werden muss. So können unnötige Therapieversuche erspart und die Patienten, wenn zurzeit auch nur durch Präventivmaßnahmen, vor dem Weitertragen der Infektion geschützt werden. Wesentlich für die rechtzeitige Erkennung von Pockenvirus-Infektionen ist die Anamnese. Da außer Infektionen mit MOCV und VARV alle anderen humanpathogenen Pockenviren Zoonosen sind, ist der Kontakt zu Tieren abzuklären. Während der Kontakt zu Schafen oder Kühen auf Infektionen mit Parapockenviren (Melkerknoten, *Ecthyma contagiosum*) hindeutet, ist für eine Infektion mit OPV der Kontakt zu Nagetieren, bei Kuhpocken aber auch zu Katzen oder exotischen Tieren ein wichtiger anamnestischer Hinweis. Sollten serologische Nachweisverfahren eingesetzt werden, ist in jedem Fall der Impfstatus gegen VARV zu erfragen. Ist dies nicht möglich, kann eine Interpretation der erhaltenen Titer nur unter Berücksichtigung des Alters erfolgen, und der Nachweis von IgM-Antikörpern ist zwingend.

Weitere klassische Differentialdiagnosen sind Herpesvirus-Infektionen, z.B. mit Herpes-Simplex- oder Varizella-Zoster-Virus. Auch bakterielle Infektionen können vom klinischen Bild her gerade im Frühstadium einer Pocken-Infektion ähneln. Dazu zählen durch Aktinomyzeten hervorgerufene Aktinomykosen, Staphylokokken-Infektionen (*Impetigo contagiosa*), Infektionen mit *Bartonella henselae* (Katzenkratzkrankheit) und nicht zuletzt der durch *Bacillus anthracis* bedingte Milzbrand. Seltener kommen Scabies, Arzneimittel-Nebenwirkungen oder Insektenstiche in Betracht (Fenner, 2006).

In den folgenden Publikationen wird zunächst die Problematik der nicht erkannten „Kuhpocken-Infektion“ dargestellt. Bei dieser Patientin wurden neben bakteriellen Erregern zunächst Leishmanien ausgeschlossen. Nur durch die Aufmerksamkeit der Bakteriologen, die für eine Diagnostik von *Francisella tularensis* einbezogen wurden und denen die Kuhpocken-

Problematik bekannt war, wurde letztlich die Infektion mit CPXV diagnostiziert. Vergleichbar wird in einer weiteren Publikation gezeigt, wie wesentlich eine belastbare Primärdiagnostik ist. In diesem Fall wurde bei einem Landwirt (geboren 1960) nach Kontakt zu verschiedenen Tieren, unter anderem Schafen, elektronenmikroskopisch eine Infektion mit OPV diagnostiziert. Diese wurde serologisch bestätigt. Sowohl die Interpretation der aus der EM erhaltenen Partikelabbildungen und die der Serologie waren falsch. Da die Ergebnisse jedoch kohärent schienen, wurde eine Infektion mit OPV befundet. Auch bei einem möglichen bioterroristischen Ereignis würde eine derartige Fehldiagnose zumindest kurzfristig Konsequenzen für die Patienten und das Gesundheitssystem nach sich ziehen. Daher wird empfohlen für eine Bestätigung immer ein auf seltene Erreger spezialisiertes Labor in die Diagnostik mit einzubeziehen, welches in der Regel mehrere unabhängige Verfahren parallel einsetzen kann.

Publikation: *Strenger, V., Muller, M., Richter, S., Revilla-Fernandez, S., Nitsche, A., Klee, S.R., Ellerbrok, H., Zenz, W. A 17-year-old girl with a black eschar. Cowpox virus infection. Clin Infect Dis, 48, 2009, 91-92, 133-134.*

Publikation: *Nitsche, A., Gelderblom, H.R., Eisendle, K., Romani, N., Pauli, G. Pitfalls in diagnosing human poxvirus infections. J Clin Virol, 38, 2007, 165-168.*

3.4 Risikopotential von Kuhpockenvirus-Infektionen beim Menschen

3.4.1 Einführung und Stand der Forschung

Die Virämie bei Infektionen mit OPV scheint von der Pathogenese im Wirt und der Viruspezies abhängig zu sein. Untersuchungen zur Pathogenese von VARV-Infektionen haben gezeigt, dass es zwei virämische Phasen gibt, die es dem Virus gestatten sich im infizierten Individuum auszubreiten (Damon, 2007). Nach der Infektion über den Respirationstrakt oder die Haut kommt es dort zur lokalen Virus-Replikation für bis zu drei Tage. Bei der primären Virämie erreicht das Virus die benachbarten Lymphknoten, die Milz und seltener das Knochenmark. Nach Replikation in den lymphoiden Organen gelangt das Virus in das Blut, und es kommt zur sekundären Virämie, die mit Fieber einher geht. Durch diese sekundäre Virämie gelangt das Virus in die oropharyngealen Regionen und die Epidermis, wo es zum Exanthem kommt. Der Nachweis replikationsfähiger VARV war während dieser Phase der Infektion aus Vollblut infizierter Patienten möglich (Downie et al., 1950; Siegert und Schulz, 1953). Die Virämie ist also aus Sicht des Virus für eine effiziente Verteilung im Körper erforderlich.

Bei Infektionen mit Affenpockenviren ist das Auftreten einer Virämie nicht sicher geklärt. So konnte bei den im Jahre 2003 in den USA aufgetretenen Affenpocken-Infektionen nur bei 3 von 12 Patienten eine Virämie/DNAämie nachgewiesen werden, wobei alle 12 Patienten nur lokale Läsionen aufwiesen (Likos et al., 2005). Bei generalisierten Affenpocken-Infektionen in Afrika konnte sporadisch eine Virämie vier bis sieben Tage nach Auftreten des Exanthems nachgewiesen werden (Saijo et al., 2008; Saijo et al., 2009).

Bei VACV-geimpften Personen mit einer lokal begrenzten Infektion ohne Impfkomplicationen scheint eine Virämie drei bis sieben Tage nach der Impfung extrem selten mit der PCR nachweisbar zu sein (Cummings et al., 2004; Klote et al., 2006), womit es sich streng genommen um eine DNAämie handelt. Es scheint jedoch sicher, dass Nebenwirkungen und besonders generalisierende Komplikationen mit einer Virämie assoziiert sind (Fulginiti et al., 2003b). Dadurch können verschieden schwere Krankheitsbilder hervorgerufen werden (siehe 1.2.8). Dies geschieht häufiger bei immunschwachen Impfungen oder deren Kontaktpersonen. So wurde beispielsweise der 28 Monate alte Sohn mit atopischer Dermatitis durch seinen VACV-geimpften Vater nach direktem Kontakt infiziert und entwickelte das Krankheitsbild des *Eczema vaccinatum*. Der Patient zeigte eine deutliche Virämie, die mit der quantitativen PCR zum Therapie-Monitoring genutzt werden konnte. Während Therapieversuche mit Cidofovir und Vaccinia-Immunglobulin scheiterten, wurde der Patient durch den ersten klinischen Einsatz einer neuen anti-orthopockenviralen Substanz, ST-246, erfolgreich behandelt (Vora et al., 2008).

Kuhpocken beim Menschen sind in der Regel auf die Infektionsstelle begrenzte, selbstlimitierende Infektionen (Bennett und Baxby, 1996). Bei immunsupprimierten Patienten kann die Infektion jedoch generalisieren und zu schweren Verläufen führen (Czerny et al., 1997). So ist

die letale Infektion eines 18-jährigen, nicht VACV-geimpften Patienten mit atopischer Dermatitis unter Steroidtherapie beschrieben (Eis-Hubinger et al., 1990). Dieser Fall lässt einen Vergleich zu Fällen mit unerwünschten Nebenwirkungen der VACV-Impfung zu. Bei Kuhpocken ist über die Virämie nichts bekannt. Auch bei den beschriebenen schweren Verläufen wurden keine Untersuchungen zur Virämie durchgeführt. Um das Risiko von durch die Virämie disseminierenden Infektionen mit schweren Verläufen einschätzen zu können, wurden Patienten mit Kuhpocken-Infektionen bezüglich der Virämie untersucht.

Publikation: *Nitsche, A., Kurth, A., Pauli, G. Viremia in human Cowpox virus infection. J Clin Virol, 40, 2007, 160-162.*

3.5 Risikopotential von Kuhpockenvirus-Infektionen beim Tieren

3.5.1 Einführung und Stand der Forschung

Die Kuhpockenviren besitzen ein sehr breites Wirtsspektrum, und die Anzahl der auf natürlichem Wege infizierbaren Säugetier-Spezies scheint nicht begrenzt zu sein (Essbauer et al., 2010; Kurth und Nitsche, 2011). Infektionen des Menschen finden fast immer durch direkten Kontakt zum infizierten Tier statt. Dies war zu Zeiten Edward Jenners vermutlich die Übertragung von der Kuh, was heute ein sehr seltenes Ereignis zu sein scheint, da Infektionen mit Kuhpocken bei Kühen seit Jahrzehnten nicht mehr beobachtet werden. Heute sind es in der Regel Katzen, die sich vermutlich beim Jagen und Verzehren von Nagetieren an diesen infizieren können und dann die Infektion auf den Menschen übertragen (Bennett und Baxby, 1996; Bonnekoh et al., 2008; Coras et al., 2005). Die meisten Patienten erinnern sich daran, von einer Katze gekratzt worden zu sein und entwickeln dort die charakteristischen Kuhpocken-Läsionen. Mittlerweile sind über 400 Fälle von Kuhpocken bei Hauskatzen beschrieben (Essbauer et al., 2010). Allerdings ist auch die Auto-Inokulation durch Berühren der infizierten Stelle und „Weitertragen“ z.B. in die Augen möglich.

Neben der Infektion an Katzen wurden in den letzten 2 Jahren in Deutschland auch häufiger Infektionen beim Menschen nach direktem Kontakt zu Kuschel- und Futterratten beobachtet (Becker et al., 2009; Kuczka et al., 2009). Während nach Kontakt zu Kuschelratten der Infektionsweg dem durch Katzen gleicht, ist kürzlich jedoch auch ein Fall in einem Reptilienzoo ohne direkten Kontakt zu Tieren aufgetreten (Kurth et al., 2009). Dies lässt auf die hohe physikalische Belastbarkeit/Tenazität unter Erhalt der Infektiosität wie bei den Variola-Viren schließen und wirft die Frage nach Infektionsrisiken durch direkten Kontakt zu Zootieren auf, wie er in Streichelzoos üblich ist.

Außer Infektionen von Menschen, Katzen und Nagetieren werden in Deutschland und Europa auch vermehrt Infektionen bei exotischen Tieren beobachtet. Beispielfhaft seien hier Infektionen beim Lama, Okapi, Panda, Löwen, Schwarzen Panther, Puma, Jaguar, Ozelot, Nashorn, Ameisenbär und Elefant genannt (Essbauer et al., 2010). Zudem wurden Übertragungen von CPXV in Freigehegen auf Alt- und Neuweltaffen berichtet (Martina et al., 2006; Matz-Rensing et al., 2006). Sicherlich gibt es zahlreiche Spezies, bei denen eine CPXV-Infektion stattfindet, die aber nicht als solche diagnostiziert wird. Dabei ist interessanterweise das Auftreten von Kuhpocken in der Veterinärmedizin häufig bekannter als in der Humanmedizin und wird von den behandelnden Veterinären, wenn auch immer noch selten, anhand klinischer Symptomaten erkannt. Dies mag damit zusammenhängen, dass in vielen Spezies eine CPXV-Infektion letal verläuft und dadurch gerade in Zoos die Bestände exotischer, seltener und damit wertvoller Tiere gefährdet sind. Woran sich die Zootiere infizieren ist nicht bewiesen, aber auch hier werden Nagetiere als Reservoir und Überträger vermutet. Neben diesen Zooanthroponosen wurden aber auch schon Anthroozoonosen beobachtet. So erkrankte und verstarb während der Eradikation im Berliner Zoo ein Elefant an einer Pockenvirus-Infektion,

die zunächst als Elefantenpocken bzw. Kuhpocken diagnostiziert wurde. Es stellte sich jedoch heraus, dass ein Tierpfleger mit einer frischen VACV-Impfung den Elefanten infiziert hatte (persönliche Mitteilung Hermann Meyer).

Die folgenden Publikationen zeigen das erste Mal eine Infektionskette mit demselben Virusstamm von wildlebenden Ratten auf den Elefanten und vom Elefanten auf den Menschen.

In einer weiteren Publikation sind Kuhpocken-Infektionen in Zebramangusten nachgewiesen worden, die nicht durch in diesem Zoo wildlebende Ratten, sondern durch Futterratten verursacht worden sind. Durch diese Futterratten kam es in Deutschland auch zur Infektion von Menschen.

Publikation: Kurth, A., Wibbelt, G., Gerber, H.P., Petschaelis, A., Pauli, G., Nitsche, A. *Rat-to-Elephant-to-Human Transmission of Cowpox Virus. Emerg Infect Dis, 14, 2008b, 670-671.*

Publikation: Kurth, A., Straube, M., Kuczka, A., Dunsche, A.J., Meyer, H., Nitsche, A. *Cowpox virus outbreak in banded mongooses (*Mungos mungo*) and jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) with a time-delayed infection to humans. PLoS ONE, 4, 2009, e6883.*

4 Diskussion

4.1 Diagnostik von Pockenviren

Nach der Eradikation der Menschenpocken ist die Diagnostik von Pockenviren auf sehr wenige Speziallabore beschränkt gewesen (Kurth und Nitsche, 2007). Daher haben sich auch diagnostische Verfahren zum Nachweis von Pockenviren nicht annähernd so weiterentwickelt, wie es für klinische Routine-Erreger in den letzten Jahren geschehen ist (Kurth und Nitsche, 2007; Meyer et al., 2004; Pfeffer und Meyer, 2007). Erst als Folge der Diskussionen um VARV als mögliches bioterroristisch verwendbares Agens ist das Interesse an Pockenviren in der Wissenschaft und der Politik wieder gewachsen (Beeching et al., 2002; Mayr, 2003; Rotz et al., 2003). Trotzdem gibt es bislang nur ein einziges real-time PCR-basiertes Kit mit Fertigreagenzien, welches den Nachweis von OPV und die Differenzierung von VARV ermöglicht (ehemals Artus, jetzt Qiagen). Die Produktion dieses Kits wird voraussichtlich im kommenden Jahr eingestellt und die Ursachen dafür sind offensichtlich: Es gibt aufgrund der geringen Fallzahlen für den Nachweis von Pockenviren zurzeit keinen Markt, der die kostenintensive Produktion und Vorhaltung eines Kits rechtfertigt. Dies gilt vergleichbar für nahezu alle Nachweissysteme für eine Reihe anderer seltener und hochpathogener Erreger (Nitsche, 2007b). Daher ist die Entwicklung eigener, so genannter *in-house*-Reagenzien für die verlässliche Diagnostik dieser Erreger zwingend notwendig (Nitsche, 2007a).

Für die Diagnostik hochpathogener Erreger hat sich die real-time PCR zum Goldstandard entwickelt. Die Vorteile der real-time PCR sind evident und häufig beschrieben worden (Mackay, 2004): Real-time PCR ist schnell, spezifisch, minimiert das Risiko von PCR-Kontaminationen, kann mit inaktiviertem, nicht infektiösem Material und sowohl als Multiplex-Verfahren als auch im Hochdurchsatzformat durchgeführt werden (Espy et al., 2006). Damit erfüllt sie (fast) alle Anforderungen einer belastbaren Diagnostik für hochpathogene Erreger. Darüber hinaus liefert sie semi-quantitative Ergebnisse, was für die Primärdiagnostik dieser Erreger eine untergeordnete Rolle spielt (Mackay et al., 2002; Nitsche, 2007b).

Welche Bedingungen müssen nun erfüllt sein, damit ein real-time PCR-Test alle diese Anforderungen erfüllt? Zuerst sind für das Design eines real-time PCR-Tests die Sequenzinformationen des Erregers essentiell. Darauf aufbauend werden entweder Primer für die spezifische Amplifikation oder die generische Amplifikation ausgewählt, welche spezifische Detektionssonden für die Typisierung erfordern. Häufig kann nur ein *single nucleotide polymorphism* (SNP), d.h. eine einzelne Base, verwendet werden, um eine Unterscheidung von Virustypen zu ermöglichen. Da durch das geringe Interesse an Pockenviren die öffentlichen Datenbanken noch vor einigen Jahren nur sehr wenige Sequenzinformationen über Pockenviren enthielten, war die Grundlage für die Entwicklung von SNP-basierten Verfahren nicht solide.

Dies konnte beispielsweise bei der ersten Publikation eines VARV-spezifischen real-time PCR-Verfahrens beobachtet werden (Espy et al., 2002), welches anhand von post-PCR Schmelzkurven-Analysen VARV von anderen OPV unterscheiden können sollte. Bereits theoretische Betrachtungen von noch nicht veröffentlichten CPXV-Sequenzen des Ziel-Gens

Hämagglutinin zeigten, dass etliche CPXV-Stämme zu falsch positiven Ergebnissen für VARV führen würden. Im Ernstfall hätte solch ein falsches Ergebnis weit reichende Folgen. Diese und vergleichbare Erfahrungen führten zu einer Reihe von Konsequenzen für die Diagnostik. Es wurde schnell deutlich, dass eine diagnostische PCR für Erreger wie VARV, deren positiver Nachweis solch weit reichende Folgen nicht nur für den Einzelnen, sondern für die Bevölkerung nach sich ziehen würde, nicht auf dem PCR-Nachweis eines Gens alleine beruhen kann. Vielmehr sollten verschiedene Bereiche des Genoms in einer *multi-target PCR* erfasst werden (Kulesh et al., 2004a; Loveless et al., 2009; Nitsche et al., 2004; Sofi Ibrahim et al., 2003) und nach Möglichkeit neben dem Nukleinsäurenachweis noch weitere Verfahren, wie ein Antigen- oder Partikelnachweis, eingesetzt werden. Der VARV-spezifische Antigen- oder Partikelnachweis ist wegen der morphologischen und antigenetischen Ähnlichkeit zu allen anderen OPV allerdings schwer darstellbar. So gibt es bis heute keine VARV-spezifischen monoklonalen Antikörper, welche beispielsweise für die EM oder Antigen-Capture-Verfahren eingesetzt werden könnten.

Für die diagnostische PCR gilt: Je weniger Sequenzen als Grundlage einer PCR bekannt sind, desto höher ist das Risiko von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen. Um falsch negative Ergebnisse so gut wie möglich auszuschließen, ist ein generischer Ansatz der Amplifikation mit anschließender Typisierung der beste Lösungsweg. Allerdings müssen die zur Typisierung verwendeten SNPs bzw. Sequenzabschnitte belastbar sein, was in der Qualität durch die Anzahl der bekannten Sequenzen bestimmt wird (Nitsche, 2007a). Daher ist es gerade bei Pockenviren mit einem großen Genom ratsam, dieses Verfahren parallel für unterschiedliche unabhängige Genombereiche durchzuführen, um eine größere Ergebnissicherheit zu erzielen. Ein Nachteil des generischen Ansatzes mit anschließender Typisierung ist das Risiko von falsch negativen Ergebnissen in Mischungen verschiedener Viren. In Afrika wurden im letzten Jahrhundert beispielsweise Doppelinfektionen mit VARV und MPXV beobachtet (Fenner, 2000). Auch in bioterroristischen Szenarien ist die Verwendung von Virusgemischen zur Erschwerung der Diagnostik vorstellbar. Die hier beschriebenen post-PCR-Schmelzanalysen lassen jedoch gerade eine Erkennung von noch 30% des eines Typs (z.B. von VARV) in einem Gemisch mit anderen OPV zu. Neuere Methoden wie die Pyrosequenzierung könnten hier noch 5–10% des minoritären Typs erkennen. Sensitivere Techniken wie das *deep sequencing* erreichen zwar noch deutlich bessere Werte von unter 1%, sind jedoch aufgrund des Zeitaufwands für eine Primärdiagnostik (noch) nicht geeignet. Daher sollte zusätzlich eine spezifische Amplifikation für VARV durchgeführt werden, die unabhängig von der Anwesenheit anderer OPV ausschließlich VARV-DNA amplifiziert.

Die hier vorgestellte Publikation *Detection of Orthopoxvirus DNA by Real-Time PCR and Identification of Variola Virus DNA by Melting Analysis* (vgl. 3.1.2) (Nitsche et al., 2004) beschreibt eine Zusammenstellung aus verschiedenen PCR-Systemen, die sowohl den generischen Ansatz mit folgender Typisierung als auch den spezifischen Ansatz beinhalten. Der spezifische Ansatz nutzt zusätzlich eine post-PCR-Typisierung von VARV und bietet daher

eine extrem große Nachweissicherheit. Eine weitere wesentliche Voraussetzung für die Etablierung verlässlicher *in-house*-Diagnostikteste ist der Zugriff auf Material für die praktische Validierung, idealerweise klinisches Material. Nach der Eradikation ist der Besitz von VARV oder auch VARV-DNA (mehr als 20% eines Genoms) außerhalb der beiden Referenzzentren CDC und VECTOR strengstens untersagt. Selbst die Verwendung von VARV-identischen kurzen Sequenzen <500 bp z.B. in Kontroll-Plasmiden muss der WHO bekannt gegeben werden (WHO, 2008). Für die hier beschriebenen Testsysteme konnte die Belastbarkeit der verwendeten SNPs und Sequenzbereiche in der Praxis im Rahmen von Laborkursen an den CDCs in Atlanta, USA, mit DNA verschiedener VARV-Stämme bewiesen werden. Alle PCRs können parallel in einem Lauf durchgeführt werden und bieten damit eine hohe Verlässlichkeit innerhalb einer Stunde nach der Probenpräparation. Analog zum Nachweis von VARV sind vergleichbare Verfahren für den Nachweis von verschiedenen VACV-Stämmen (Nitsche et al., 2005) und MPXV (nicht veröffentlicht) entwickelt worden, die differentialdiagnostisch bei Verdacht auf VARV eingesetzt werden können. Eine Reihe vergleichbarer Verfahren ist mittlerweile für OPV publiziert (Carletti et al., 2005; Olson et al., 2004; Panning et al., 2004).

Seit mehreren Jahren nimmt die Anzahl von Sequenzen in öffentlichen Datenbanken zu, die regelmäßig genutzt werden müssen, um die Validität der etablierten PCR-Verfahren zu kontrollieren. Hierfür ist ein Programm in der Entwicklung, welches für die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen automatische Homologie-Vergleiche zur Datenbank macht und eine Bewertung der Sequenzen bezüglich der Erkennung der gewünschten Viren durchführt. Gerade bei RNA-Viren wie Influenza-Viren, die sich wesentlich schneller verändern als DNA-Viren (Biere et al., 2009), wird dieses Programm eine deutliche Erleichterung bieten. Nach aktuellem Stand sind Sequenzen von 82 OPV-Gesamtgenomen öffentlich verfügbar. Diese setzen sich aus 16 VACV-, 9 MPXV-, 1 TATV-, 2 ECTV-, 2 CMLV- und 3 CPXV-Sequenzen sowie 49 VARV-Sequenzen zusammen. Letztere durften nach Diskussion über das *dual-use*-Potential der VARV-Sequenzen nach Beschluss der WHO kürzlich publiziert werden.

Die Vorteile der PCR-basierten Diagnostik sind evident, da eine schnelle verlässliche Möglichkeit der OPV-Detektion geschaffen wurde. Jedoch hat die PCR als diagnostisches Werkzeug auch ihre Grenzen. Ein wesentlicher Nachteil der PCR ist der Nachweis der Nukleinsäure eines Erregers und nicht von dessen Replikationsfähigkeit, d.h. Infektiosität (Mackay, 2004). Bei klinischen Proben mit entsprechender Symptomatik ist dieser Nachweis sicherlich hinreichend, gerade bei Infektionen mit Pockenviren. Bei bioterroristischen Szenarien ist jedoch von Umweltproben auszugehen (Song et al., 2005). Gerade für Pockenviren mit ihrer hohen mechanischen Belastbarkeit und Stabilität spielen Umweltproben eine große Rolle. Diese bestehen aus den Erregern, vermischt mit so genannten Begleitsubstanzen, zumeist in Form von Pulver oder anderen festen, aber auch flüssigen Substanzen. Für die Diagnostik bedeutet das zweierlei: 1. die Detektion kann durch die Begleitsubstanzen stark inhibiert wer-

den und man erhält falsch negative Ergebnisse (Sutlovic et al., 2005), 2. der Nachweis der Infektiosität der Erreger in dieser Begleitsubstanz ist erforderlich.

Während es für diverse klinische Proben standardisierte kommerzielle Verfahren zur Probenpräparation gibt, ist das Feld der möglichen Umweltproben groß und nicht vorhersehbar. Häufig ist nicht klar, um was für eine Matrix es sich bei der Begleitsubstanz handelt, und die verwendeten Verfahren sollten auf ein breites Spektrum dieser Begleitsubstanzen anwendbar sein. Für definierte Substanzen wie Blumenerde gibt es mittlerweile Fertigreagenzien für die Nukleinsäure-Präparation. Eine generelle standardisierte Lösung existiert bisher jedoch nicht. Auch hier spielt sicher eine Rolle, dass es nur einen kleinen Markt für diese Art der Probenbearbeitung gibt, während der Markt für klinische Proben und selbst Lebensmittelproben deutlich größer ist. Daher hat sich die Publikation *Orthopoxvirus detection in environmental specimens during suspected bioterror attacks: Inhibitory influences of common household products* (Kurth et al., 2008a) der Etablierung eines Standard-Protokolls zum PCR-Nachweis von OPV in Umweltproben gewidmet. Es konnte gezeigt werden, dass ein vormals publiziertes Präparationsverfahren (Boom et al., 1990) nach geringen Modifikationen geeignet ist, um Inhibitoren aus 10 verschiedenen Umweltsubstanzen deutlich abzureichern. In Kombination mit der Verwendung höherer Konzentrationen von Taq-DNA-Polymerase konnten für mittlere Virusmengen inhibitorische Effekte aufgehoben werden, was einen deutlichen Vorteil für die Diagnostik darstellt. Ein Nachweis der Infektiosität mit der PCR ist nach wie vor nicht möglich. Daher wurden Lösungen entwickelt um mit niedriger Nachweisgrenze in kurzer Zeit die Replikationsfähigkeit von OPV belegen zu können. Der bislang einzige Weg zum Nachweis der Replikationsfähigkeit eines Virus ist dessen Vermehrung, meist in Zellkultur. Dies erfordert im Anschluss an die Zellkultur spezifische Methoden, häufig Antigen-Nachweise, um die Produktion neuer Viruspartikel zu beweisen. In der Publikation *Detection of infectious poxvirus particles* (Nitsche et al., 2006) wurden die Vorteile der Zellkultur mit denen der real-time RT-PCR verknüpft. Durch Zentrifugation der Proben auf die Zellen wurde die Infektionseffizienz erhöht. Zum Nachweis der Virus-Replikation wurde nicht Virus-DNA, sondern Virus-RNA nachgewiesen. Dazu wurden Gene ausgewählt, die bereits kurze Zeit nach der Infektion deutlich hoch reguliert werden (Faktor >1.000 in 15 Minuten p.i.). Diese wurden dann mit der one-step real-time RT-PCR spezifisch detektiert. Innerhalb von 5 Stunden konnten so zwischen 3 und 6 infektiöse VACV-Partikel (*Plaque Forming Units, PFU*) nachgewiesen werden. Diese enorm niedrige Nachweisgrenze erlaubt nun verdächtige Umweltproben in seriellen Verdünnungen in dieses Verfahren einzusetzen um inhibitorische Substanzen ebenfalls zu verdünnen. Beispielsweise wären bei einer Verdünnung potenzieller PCR-Inhibitoren um den Faktor 100 noch 300 bzw. 600 PFU nachweisbar. Mittlerweile sind so genannte Lyse-Puffer für die PCR erhältlich, bei denen die RNA-Präparation entfällt. Diese Puffer werden zur Lyse der infizierten Zellen verwendet und können direkt in die PCR eingesetzt werden, was die Zeit des Nachweises noch einmal um ~45 Minuten verkürzt.

Für die PCR-Diagnostik sowohl von klinischen Proben als auch von Umweltproben hat sich in den letzten Jahren die Verwendung von internen Kontrollen als sinnvoll erwiesen (Barkham und Hoorfar, 2004; Hoorfar et al., 2004). Interne Kontrollen, entweder Viren oder DNA, werden der Probe vor der Präparation der Nukleinsäure zugesetzt und zusammen mit der Nukleinsäure des Erregers mit einer dafür spezifischen PCR im Multiplex-Ansatz nachgewiesen. Dabei wird die interne Kontrolle in ihrer Konzentration so eingesetzt, dass deren Amplifikation den Nachweis des Erregers nicht beeinflusst. In der Praxis bedeutet das den Einsatz sehr geringer Mengen der internen Kontrolle, die nur bei Erreger-negativen oder schwach positiven Proben amplifiziert wird. Bei stark Erreger-positiven Proben jedoch kann die interne Kontrolle, bedingt durch die Konkurrenz der Erreger-PCR, nicht amplifiziert werden. Damit dient diese interne Kontrolle der Absicherung von Erreger-negativen Proben und schließt falsch negative Ergebnisse durch eine gescheiterte Nukleinsäure-Präparation oder die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren aus (Fedele et al., 2006).

4.2 Infektionen mit Pockenviren in Deutschland

Infektionen mit Pockenviren traten in den letzten Jahren in Deutschland und Europa sporadisch auf. Dabei handelte es sich zumeist um Infektionen mit Parapockenviren bei Landwirten oder um Kuhpocken. Aufgrund der geringen Bekanntheit dieser Tatsache sind jedoch hohe Dunkelziffern und eine Reihe von Fehldiagnosen zu erwarten. Wie in der Publikation *A 14-Year-Old Girl with a Vesicle on her Finger and Lymphadenitis* (Schupp et al., 2010) gezeigt, werden auf der einen Seite anstelle von Pocken auch bakterielle Infektionen vermutet. Auf der anderen Seite werden bei Landwirten zumeist Parapocken „diagnostiziert“, weil es sich dabei um eine bei Landwirten bekannte Infektion handelt – im Gegensatz zu Kuhpocken. Daher ist eine laborgestützte Diagnostik in allen verdächtigen Fällen von Pocken angeraten (Madeley, 2003; Meyer et al., 2004; Pfeffer und Meyer, 2007). Diese beschränkt sich allerdings auf sehr wenige Speziallabore, die einen regelmäßigen Umgang mit solchen Proben pflegen und damit eine verlässliche Erfahrung vorweisen können. Wie die Publikation *Pitfalls in diagnosing human poxvirus infections* zeigt, ist es ratsam verschiedene Nachweisverfahren parallel einzusetzen (siehe 4.1) um Proben-spezifische Artefakte und falsche Interpretationen ausschließen zu können. In dem in *Pitfalls in diagnosing human poxvirus infections* beschriebenen Fall wurde neben der EM die Serologie eingesetzt. Nachdem Präparationsartefakte der EM fälschlicherweise als OPV-Partikel interpretiert wurden, führte dann ein anti-OPV-Antikörper-Titer des Patienten zur Bestätigung der OPV-Infektion. Da der Patient vormals VACV-geimpft war, hätte zumindest eine Verlaufprobe untersucht werden müssen um einen serologischen Nachweis der OPV Infektion zu erlauben. Die Bestätigungsdiagnostik im RKI zeigte dann mit Hilfe der PCR und der EM, dass es sich um eine Infektion mit Parapockenviren handelte. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Relevanz der Pockenvirus-Diagnostik ist hier eine Standardisierung eminent wichtig. Daher bietet das Konsiliarlabor für Pockenviren in Deutschland regelmäßig Kurse zur Labordiagnostik von Pockenviren an.

Während für die Primärdiagnostik von Pockenvirus-Infektionen die PCR den besten Kompromiss aus Aussagekraft, Sensitivität und Zeit darstellt, können für epidemiologische und retrospektive Fragestellungen serologische Verfahren eingesetzt werden. Dazu werden entweder infizierte Zellen oder rekombinante Virusproteine im ELISA oder im Immunfluoreszenz-Test nachgewiesen. Obwohl es auch hier keine kommerziell erhältlichen Fertigreagenzien gibt, sind im ZBS 1 des RKI verschiedene serologische Verfahren etabliert worden, die nun im Rahmen der Diagnostik des deutschen Konsiliarlabors für Pockenviren und für Studien zur Seroprävalenz von OPV in Deutschland eingesetzt werden.

Allerdings weisen die OPV in diesem Zusammenhang einige Besonderheiten auf. Wie in 1.2.1 geschildert, gibt es verschiedene infektiöse Formen von OPV-Partikeln, MV und EV, die eine Immunantwort und die Bildung von Antikörpern hervorrufen. Da sich MV und EV in der Ausstattung der Hüll-Proteine unterscheiden, müssen für den serologischen Nachweis Proteine beider Partikelformen beachtet werden. Da die äußere Hülle von EV grundsätzlich labil ist und sich EV-Partikel nicht in großen Mengen präparieren und für ELISA-Teste nutzen lassen, können als Ersatz für EV nur rekombinante EV-Proteine eingesetzt werden. Diese Proteine sind bereits ausgewählt, z.B. das A33R, die Verfahren etabliert und werden zurzeit zur Untersuchung der Seroprävalenz von OPV in der gesunden Bevölkerung und in Risikogruppen für OPV-Infektionen eingesetzt (wie Tierärzte und Waldarbeiter). Des Weiteren gibt es bezüglich der Analyse der erhobenen serologischen Daten bei den OPV eine Besonderheit. Wie bereits erwähnt, wurde die Pocken-Pflichtimpfung in der Bundesrepublik Deutschland 1977 und in der Deutschen Demokratischen Republik 1980 eingestellt. Daher ist seitdem von einer Zunahme des Anteils immunologisch naiver Personen in der Bevölkerung auszugehen. Trotzdem besitzt ein substantieller Anteil der Bevölkerung, bedingt durch die VACV-Impfung, heute noch einen nachweisbaren Antikörper-Titer gegen OPV. Dies betrifft weltweit alle Personen, die vor Einstellung der Impfungen in den 70er Jahren geboren und geimpft wurden. Außerdem bleiben durch eine Infektion erworbene anti-VARV-Antikörper-Titer lange nachweisbar und führen bei Personen mit durchgemachter VARV-Infektion ebenfalls zu seropositiven Ergebnissen. In Japan und Italien konnten in Abhängigkeit von der Altersgruppe OPV-Seroprävalenzen von bis zu 90% (IgG positiv im ELISA) gefunden werden (Putz et al., 2005; Hatakeyama et al., 2005). Interessanterweise werden anti-OPV-Antikörper auch regelmäßig im jüngeren, nicht mehr VACV-geimpften Teil der Bevölkerung detektiert, was auf unbemerkte Kontakte zu OPV und auf subklinische Infektionen hindeutet.

Über die Seroprävalenz von OPV in Deutschland gibt es aktuell keine belastbaren Daten, weder in der humanen Bevölkerung noch in der Tierpopulation (Czerny et al., 1996; Henning et al., 1995; Muller et al., 1996). In finnischen wildlebenden Nagetieren lag die Seroprävalenz zwischen 0 und 92%, abhängig von der Region und der Zeit der Probennahme (Pelkonen et al., 2003). Ältere Studien beschreiben eine Seroprävalenz in Deutschland von bis zu 16% bei Katzen (Juncker-Voss et al., 2004), die aller Wahrscheinlichkeit nach mit dem Reservoir, den Nagetieren, in enger Verbindung stehen. Anhand vorläufiger Daten aus begrenzten Proben-

kollektiven kann man für die deutsche Bevölkerung sagen, dass die Seroprävalenz bei ~50% liegt und dass nicht VACV-geimpfte Personen anti-OPV-Antikörper besitzen. Woher diese Antikörper stammen ist unklar. Unbemerkte Infektionen mit Kuhpocken-artigen Viren sind aber vorstellbar.

Denn während die bekannten Fälle von Infektionen mit Parapockenviren scheinbar konstant selten auftreten, nimmt die Anzahl der Infektionen mit CPXV offensichtlich zu (Nitsche und Pauli, 2007). Dies kann verschiedene Ursachen haben. Wahrscheinlich ist, dass es tatsächlich mehr Infektionen mit CPXV in Überträgern gibt, welche dann auch beim Menschen diagnostiziert werden. Zum anderen nimmt der Anteil der VACV-Geimpften in der Bevölkerung ab und ermöglicht häufiger klinisch apparente CPXV-Infektionen. Zudem scheint die Aufmerksamkeit bei den behandelnden Ärzten bezüglich der Pockenviren im Laufe der letzten Jahre gestiegen zu sein, und früher undiagnostizierte Fälle werden nun als Kuhpocken erkannt (Baxby, 1994). Da aber eine mögliche erhöhte Aufmerksamkeit der Ärzte bei den Parapocken zu keiner Zunahme der Fallzahlen führt und dies als Erklärung für die Zunahme von CPXV-Infektionen unwahrscheinlich macht, scheinen der Impfstatus und die tatsächlich vermehrte Zirkulation von CPXV eine Rolle zu spielen. So werden die meisten, wenn auch nicht alle Infektionen mit CPXV in ungeimpften Personen diagnostiziert und treten etwas häufiger im Spätsommer und Herbst auf, was mit der wildlebenden Nagetier-Population korrelieren könnte. Wahrscheinlich ist jedoch eine Kombination aus allen drei Faktoren für die Zunahme der Diagnose „Kuhpocken“ verantwortlich.

Der häufigste Infektionsweg für den Menschen ist in Deutschland zurzeit die Ansteckung an infizierten Katzen (Coras et al., 2005; Kaysser et al., 2009). Hier gibt es geschätzt 20 bis 30 Fälle pro Jahr mit steigender Tendenz. Neben einer steigenden Anzahl von Kuhpocken-Infektionen beim Menschen wurde auch eine Zunahme bei Tieren beobachtet, wobei das Spektrum der infizierten Tiere breit ist (Essbauer et al., 2010; Kurth und Nitsche, 2011; von Bomhard et al., 2010). Dies beinhaltet Ausbrüche in Zoos unter Callithrix-Affen (Matz-Rensing et al., 2006), Zeboramangusten (Kurth et al., 2009; Schmiedeknecht et al., 2010) und Pampashasen (Kik et al., 2006; Kurth et al., nicht veröffentlicht). Darunter waren jedoch auch gehäuft Infektionen von so genannten Kuschelratten, die ihre Halter direkt angesteckt haben (Becker et al., 2009; Campe et al., 2009; Kuczka et al., 2009; Ninove et al., 2009). Die Übertragung von CPXV durch Ratten auf den Menschen war bislang nur selten und nicht sicher nachweisbar in der Literatur beschrieben worden (Wolfs et al., 2002). Das in Becker et al. (2009) beschriebene Geschehen hat bisher in Deutschland und Frankreich insgesamt über 20 Patienten betroffen, die alle Kontakt zu teilweise kranken Ratten hatten und eine Infektion mit demselben CPXV-Stamm zeigten. Dies ist äußerst ungewöhnlich, da die CPXV eine sehr heterogene Population darstellen und alle bisher diagnostizierten Fälle von Kuhpocken durch unterschiedliche CPXV-Stämme verursacht wurden (Kurth et al., 2009). Daher war der Nachweis desselben Virus-Stammes ein Hinweis auf eine gemeinsame Infektionsquelle für die involvierten Ratten. Durch intensive Recherchen und mit Unterstützung durch das Friedrich-

Löffler-Institut (Prof. Thomas C. Mettenleiter) konnte ein Großhändler im europäischen Ausland identifiziert werden, der die Zoohandlungen in Deutschland belieferte, welche nachgewiesenermaßen an Kuhpocken erkrankte Ratten verkauft hatten. Insgesamt lieferte dieser Großhändler in einem Jahr ~400.000 Ratten an verschiedene Händler in Deutschland, was eine systematische Untersuchung der importierten Tiere unmöglich machte. Um die breite Öffentlichkeit der Ärzte bezüglich dieser Problematik zu sensibilisieren, wurden die Daten im *Deutschen Ärzteblatt* und im *Deutschen Tierärzteblatt* publiziert (Becker et al., 2009; Kuczka et al., 2009). Die Resonanz war insofern interessant, als dadurch Fälle bekannt wurden, die zur selben Zeit und ebenfalls nach Kontakt mit Ratten nicht als Kuhpocken erkannt worden waren, aber eine typische Symptomatik zeigten. Seit einem Jahr sind keine weiteren durch Kuschelratten verursachten Infektionen bekannt geworden.

Vergleichbar zu den beschriebenen direkten Übertragungen von CPXV durch Kuschelratten auf den Menschen wurden auch CPXV-Übertragungen von so genannten Futterratten auf den Menschen und andere Tiere beobachtet (Kurth et al., 2009). In einem Zoo in Krefeld erkrankten bzw. verstarben 13 Zebramangusten und ein Jaguarundi gleichzeitig an Kuhpocken. Die serologische Untersuchung acht anderer exotischer Spezies im Zoo zeigte, dass es vorher bereits unbemerkte oder subklinische Infektionen mit OPV gegeben haben muss. Dieses Geschehen trat zur gleichen Zeit und in derselben Region auf wie die Infektionen von Menschen nach Kontakt zu infizierten Kuschelratten (siehe 4.3). Interessanterweise handelte es sich bei der Ursache beider Infektionsgeschehen nicht um denselben Virusstamm, obwohl das durch die zeitliche und räumliche Nähe nicht unerwartet gewesen wäre. Daher wurde zunächst vermutet, dass die Infektion durch wildlebende Nagetiere in den Zoo eingetragen wurde.

Sieben Monate später wurden im Raum Karlsruhe (~300 km entfernt) in einem Reptilienzoo Kuhpocken bei einer Büromitarbeiterin diagnostiziert. Ein direkter Kontakt der Patientin zu Nagetieren war nicht bekannt (Kurth et al., 2009)! Überraschenderweise war der isolierte Virusstamm identisch mit dem aus den Zebramangusten isolierten CPXV in Krefeld. Weitere sieben Monate später wurden in der Nähe von Heidelberg (~80 km entfernt) Kuhpocken bei einem jungen Mädchen diagnostiziert, welches Nagetiere an Greifvögel verfütterte. Wieder konnte derselbe Virusstamm identifiziert werden (Schupp et al., 2010). Bereits der erste Fall im Karlsruher Reptilienzoo hatte den Verdacht nahe gelegt, dass die Infektion durch Futterratten verursacht worden war, was durch den zweiten Fall bestätigt wurde. Alle Beteiligten nutzten denselben Zulieferer von Futterratten. Die Quelle für die Infektion ließ sich bis in eine Tierzucht nach Polen zurückverfolgen, wo von 50 getesteten Tieren 60% PCR-positiv für CPXV waren und genau den bei den Patienten isolierten Stamm trugen. Woher die Infektion stammt und wie sie in die Zucht gelangt ist, konnte nicht gezeigt werden. Wildlebende Nagetiere sind hier sehr wahrscheinlich.

4.3 Risikopotential von Orthopockenvirus-Infektionen

Die Variola-Viren sind ausgerottet, die in Laboratorien verbliebenen Bestände vernichtet oder an eines der beiden Referenzzentren CDC oder VECTOR übergeben worden (WHO, 2002; WHO, 1980). Damit scheint ein erneutes Auftreten von VARV extrem unwahrscheinlich (Wittek, 2004). Dennoch gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie es zu einem Wiederauftreten (*re-emerging*) von VARV, auch in Deutschland, kommen könnte. Häufig diskutiert ist die Verwendung von VARV als bioterroristisches Agens (Rotz et al., 2003; Tegnell et al., 2002; Whitley, 2003). Aufgrund ihrer Eigenschaften sind die VARV von den CDCs in der Liste der bioterroristisch nutzbaren Agenzien in die Kategorie A mit dem höchsten Gefährdungspotential eingeteilt worden. Diese Kategorie bedeutet eine leichte Verbreitung, was bei der hohen Tenazität der OPV gegeben ist, eine gute Mensch-zu-Mensch-Übertragung, hohe Morbidität und Mortalität sowie hohe Anforderungen an das Gesundheitswesen und ein hohes Panik-Potential. In einer nicht mehr geimpften Bevölkerung ohne verlässliche Therapieansätze wäre daher das Auftauchen einer VARV-Infektion fatal. Ob eine realistische Gefahr besteht, dass unberechtigte Personengruppen Zugang zu VARV haben und bioterroristische Anschläge planen, ist ungewiss, jedoch auch nicht sicher auszuschließen (Alibek et al., 1999; Alibek, 2004), da die Befolgung der Aufforderungen der WHO bezüglich der Vernichtung oder Übergabe von VARV-Beständen nicht kontrollierbar ist.

Ein natürliches Auftreten von VARV ist hingegen sehr unwahrscheinlich, da ein anderes Reservoir als der Mensch nicht bekannt ist. Ein weiteres Reservoir hätte die Eradikation durch Impfung der humanen Bevölkerung unmöglich gemacht, und vermutlich wären in den letzten 30 Jahren erneut Fälle von Menschenpocken aufgetreten, wie man es ähnlich bei VACV in Südamerika beobachtet (Moussatche et al., 2008). Als weitere Möglichkeit wird diskutiert, dass VARV aus im Permafrost eingeschlossenen Leichen isoliert werden könnte, was bei der hohen physikalischen Belastbarkeit der OPV nicht unmöglich wäre (Lewin, 1985). Bisher sind solche Versuche nicht erfolgreich gewesen. Um aber das verbleibende minimale Risiko von Laborunfällen in den VARV-Referenzlaboren und einer unbeabsichtigten Ausbringung von VARV ebenfalls auszuschließen, strebt die WHO nun die zeitnahe Vernichtung aller VARV-Isolate an. Ob diese Maßnahme das Problem lösen kann ist umstritten, da die neue Disziplin der Synthetischen Biologie die Synthese von Viren der Größe von VARV kurzfristig ermöglichen wird. Zurzeit geht man davon aus, dass sich alle 2 Jahre die Kosten für eine DNA-Synthese halbieren und die Syntheselängen verdoppeln.

Weder die Gründe für die Spezifität der VARV für den Menschen noch deren hohe Pathogenität sind bisher verstanden. Daher ist es auch nicht möglich das von sehr ähnlichen, anderen OPV ausgehende Risiko verlässlich zu bewerten. Ein Kandidat für die potentielle Entwicklung von hochpathogenen OPV für den Menschen sind die CPXV. Kuhpocken können in Deutschland zu den *emerging diseases* gezählt werden. Die Anzahl der Infektionen nimmt bei Tier und Mensch zu und bisher seltene Übertragungswege scheinen sich zu etablieren.

Welchen Beitrag liefern nun die hier beschriebenen Daten zu einer Risikobewertung von CPXV für den Menschen? Zuerst wird deutlich, dass Kuhpocken in Deutschland keine ungewöhnliche Erkrankung mehr darstellen. Neben einer steigenden Anzahl von Infektionen bei Mensch und Tier konnte gezeigt werden, dass zur gleichen Zeit und am gleichen Ort verschiedene CPXV-Stämme ko-zirkulieren können. Da die genetische Rekombination bei OPV bekannt ist, könnten so neue Varianten mit verändertem pathogenem Potential entstehen. Des Weiteren wird deutlich, dass CPXV sehr stabile Viren sind, die sowohl durch tiefgekühlte als auch lebende Ratten direkt auf den Menschen und auf Tiere übertragen werden können. Der Fall der Büromitarbeiterin des Reptilienzoos zeigt darüber hinaus, dass für eine Infektion kein direkter Kontakt zu den Tieren erforderlich ist, was die hohe Stabilität der CPXV unterstreicht und deren Gefahrenpotential deutlich erhöht.

Die Kombination aus einem CPXV-Stamm und dem damit infizierten Wirt scheint ebenfalls eine sehr entscheidende Rolle für die Pathogenese zu spielen. Während die hier beschriebenen CPXV-Infektionen im Menschen einen selbstlimitierenden, lokalen Verlauf hatten, führten dieselben CPXV-Stämme in bestimmten Tierspezies, wie Zebramangusten und Jaguarundis, zu Infektionen mit letalem Ausgang. Ähnlich unterschiedliche Verläufe sind für weitere CPXV–Wirtsspezies-Kombinationen beobachtet worden. So führte der bei einem CPXV-Ausbruch in Callithrix-Affen isolierte CPXV-Stamm in diesen Affen reproduzierbar zu letalen Infektionen, während andere CPXV-Stämme nur Infektionen mit mildem Verlauf in den Callithrix-Affen hervorrufen. Diese Infektion ist reproduzierbar bereits mit kleinen Virusdosen möglich, so dass daraus ein Tiermodell zur Untersuchung von Impfstoffen und antiviralen Substanzen entwickelt wurde (Kramski, 2009). Interessanterweise lassen sich Mäuse mit diesem Virusstamm nicht symptomatisch infizieren.

Eine einfache Erklärung für diese *host-range*-Phänomene gibt es nicht. Sicherlich spielt die genetische Heterogenität der CPXV im Zusammenspiel mit dem Proteom des Wirts eine entscheidende Rolle bei der Virus–Wirt-Interaktion (siehe 1.2.3 und 1.2.5). Erste Studien zur Interaktion von OPV mit dem zellulären Proteom werden zurzeit durchgeführt. Dabei konnten durch die Infektion der Zelle regulierte zelluläre und virale Proteine auf Proteom-Ebene identifiziert werden (Döllinger, 2009).

Die Erkennung bestimmter CPXV-Stämme ist wesentlich für eine Einschätzung der Pathogenität in einem Wirt. Für die schnelle Typisierung klinischer OPV-Isolate wird in der Regel der Offene Leserahmen des Hämagglutinin-(HA-)Gens sequenziert, von dem es für Vergleiche zurzeit ~400 Einträge in der Genbank gibt. Die Sequenzen des HA-Gens unterscheiden sich bei den in Deutschland gefundenen CPXV-Stämmen um 1–5%, was für DNA-Viren deutliche Unterschiede darstellt. Andere Gene, wie das A27L, das Thymidinkinase-Gen oder das *crmB*-Gen zeigen ebenfalls deutliche Unterschiede in der Sequenz. Um diese Unterschiede besser interpretieren zu können, werden zurzeit Sequenzierungen der Vollgenome von 17 CPXV-Isolaten aus Infektionsgeschehen der letzten Jahre in Deutschland durchgeführt. Die CPXV-Isolate sind so ausgewählt, dass sie überwiegend aus unterschiedlichen Spezies

stammen. Erste Daten zeigen auch für die bekannten immunmodulatorischen und *host-range*-Gene eine große Heterogenität. Während manche Gene gar nicht exprimiert werden können, sind andere verkürzt und deren Funktionsfähigkeit nicht bekannt. Auch wenn die Anzahl der CPXV-Isolate aus den einzelnen Wirtsspezies gering ist, könnten mit Hilfe dieser Analysen eventuell Rückschlüsse auf den Wirtsbereich anhand der genetischen Ausstattung der CPXV getroffen werden.

Darüber hinaus werden diese Daten zeigen, ob die CPXV nicht besser als Kuhpocken-artige Viren bezeichnet werden sollten. Früher wurden die Pockenviren anhand der Wirtsspezies, in denen sie nachgewiesen wurden, als Kuhpockenviren, Katzenpockenviren, Biberpockenviren oder auch Elefantenpockenviren bezeichnet. Molekulare Analysen haben nun gezeigt, dass es sich bei all diesen Viren um mit CPXV verwandte Viren handelt. Vorläufige phylogenetische Analysen von 8 CPXV-Vollgenomen zeigen, dass es mindestens zwei Gruppen von CPXV gibt (persönliche Mitteilung Prof. Hermann Meyer). Eine Gruppe ähnelt mehr den VARV und den CMLV, die andere Gruppe mehr den MPXV und allen VACV. Innerhalb dieser beiden Gruppen sind die bekannten Genome jedoch sehr heterogen, so dass man bis zu 5 Spezies definieren könnte. Eine Zuordnung der Sequenzen zu den Wirten, aus denen die CPXV isoliert wurden, lässt sich bisher nicht treffen.

Die große Heterogenität der CPXV-Genome erhöht jedoch das Risiko, dass eine für den Menschen höher pathogene CPXV-Variante auftritt. Denn dass ein einzelnes Gen dramatische Konsequenzen für die Pathogenität eines Pockenvirus besitzen kann, wurde eher zufällig anhand des ECTV gezeigt (Jackson et al., 2001). Die Expression des murinen IL-4-Gens durch ein rekombinantes ECTV machte aus einem apathogenen Virus ein hochpathogenes Virus, welches gegen Wildtyp-ECTV immune Labormäuse tötete. Auch durch dieses Beispiel wird deutlich, dass der Wirt eine entscheidende Rolle für die Pathogenität spielt, da eine Erhöhung der Pathogenität durch die zusätzliche Expression eines murinen Wirts-Interleukins hervorgerufen wurde.

Auf den Menschen bezogen weiß man, dass Infektionen mit Pockenviren dann schwerer verlaufen, wenn sie generalisieren und zu systemischen Erkrankungen führen (Damon, 2007; Fenner, 2006). Dies war bei Infektionen mit VARV immer der Fall. Bei unerwünschten Nebenwirkungen der VACV-Impfung scheinen schwerere Verläufe mit einer Generalisierung einherzugehen, wofür die Virämie ein wichtiger Prozess ist. Bei Infektionen mit CPXV konnte an wenigen Patienten eine Virämie bzw. DNAämie mit der PCR detektiert werden. Dies würde auf die Gefahr einer systemischen Infektion durch CPXV hindeuten, wie es bei VARV der Fall ist. Dass die wenigen Fälle letaler CPXV-Infektionen bei immunschwachen Personen aufgetreten sind (Eis-Hubinger et al., 1990), lässt darauf schließen, dass ein immunkompetenter Patient trotz der Virämie die Infektion offensichtlich immunologisch kontrollieren kann, was dem immunsupprimierten Patienten nicht gelingt. Dies stellt ein zusätzliches Risiko dar, da der Anteil der Immunschwachen in der Bevölkerung durch Allergien, Transplantationen und HIV-Infektionen stetig zunimmt. Die CPXV-Infektion einer Patientin nach

Nierentransplantation verlief allerdings ohne Generalisierung vergleichbar wie bei immun-kompetenten Patienten. Ob bestimmte Arten der Grunderkrankung eine Rolle spielen, kann aufgrund der geringen Fallzahlen nicht beurteilt werden.

Ein weiterer Faktor für die Risikobewertung bezüglich der Pathogenität der CPXV ist die Übertragbarkeit. Katzen scheinen sich gegenseitig nicht effizient anzustecken (Essbauer et al., 2010), und auch eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung konnte bisher nicht beobachtet werden, auch wenn die Gelegenheit dazu vermutlich selten besteht. Im Fall eines Kuhpocken-Patienten mit einer Läsion auf dem Bauch und engem Körperkontakt zu seiner Lebensgefährtin hatte die Partnerin weder eine Serokonversion noch klinische Symptome. Da alle OPV-Infektionen des Menschen von Mensch zu Mensch übertragbar sind (Damon, 2007), ist dies ungewöhnlich. In Pakistan sind nosokomiale Infektionen mit Büffelpocken dokumentiert (Zafar et al., 2007). Auch die Übertragung von VACV nach Impfung ist mehrfach berichtet worden, wie bereits für die Übertragung von einem Vater auf den Sohn geschildert (Vora et al., 2008). Interessanterweise war dieser Sohn, der ein *Eczema vaccinatum* entwickelte, an einer atopischen Dermatitis erkrankt, was auch die Grunderkrankung einer beim Menschen beschriebenen letalen CPXV-Infektion darstellte (Eis-Hubinger et al., 1990). Da Pockenviren epitheliotrope Viren sind, könnten insbesondere Erkrankungen der Haut eine Rolle in deren Pathogenese spielen. Vermutlich ist für den Verlauf der Infektion der Infektionsweg wesentlich, was auch in verschiedenen Tiermodellen beobachtet wurde (Hooper et al., 2004; Kramski, 2009). Wie in der Publikation *Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus* beschrieben (Kurth et al., 2008b), konnte für CPXV eine Infektionskette über drei beteiligte Glieder nachgewiesen werden. Hier fand eine CPXV-Übertragung von Ratten auf einen Elefanten und von dort auf einen Menschen statt. Dies zeigt, dass eine Übertragung desselben CPXV-Stamms zwischen verschiedenen Spezies effizient möglich ist. Zumindest im Falle der CPXV-Übertragung von Elefant zu Mensch bestand ein enger Kontakt bei der Pflege des erkrankten Tieres.

Nach Betrachtung der hier diskutierten Fakten ist die Frage des Risikopotentials von CPXV für den Menschen nicht zu beantworten. Auf der einen Seite gibt es CPXV bereits seit vielen Jahrhunderten ohne größere Konsequenzen für den Menschen. Im Gegenteil, die CPXV wurden zuerst erfolgreich für die Impfung eingesetzt und trugen so sicher zur einzigen Eradikation einer Infektionskrankheit bis heute bei. Auf der anderen Seite haben sich seit dieser Zeit vermutlich die Viren, die Reservoirs und Überträger, aber auch der Mensch verändert. Die Häufung von CPXV-Infektionen im Spätsommer und Herbst lässt einen Zusammenhang mit der Population der Nagetiere vermuten. Daher können auch populationsdynamische Veränderungen bei Nagetieren die Verbreitung von CPXV beeinflussen. Wesentlich erscheint allerdings die große Heterogenität der CPXV in Kombination mit den gefundenen unterschiedlich pathogenen Virus-Wirt-Wechselwirkungen. Daher sollten in Zukunft diese Interaktionen intensiv untersucht werden um Faktoren zu identifizieren, die den CPXV eine effi-

ziente Überschreitung von Speziesbarrieren ermöglichen und eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung zulassen. Nur so ist es möglich zu beurteilen, ob die CPXV die ökologische Nische besetzen können, die die VARV nach der Eradikation geöffnet haben.

5 Literatur

- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Zsak, L., Sandybaev, N.T., Kerembekova, U.Z., Zaitsev, V.L., Kutish, G.F., Rock, D.L. The genome of camelpox virus. *Virology*, 295, 2002, 1-9.
- Alcami, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol*, 3, 2003, 36-50.
- Alcami, A. and Koszinowski, U.H. Viral mechanisms of immune evasion. *Mol Med Today*, 6, 2000, 365-372.
- Alibek, K. Smallpox: A disease and a weapon. *Int J Infect Dis*, 8 Suppl 2., 2004, S3-S8.
- Alibek, K. and Handelmann, S. Biohazard: the chilling true story of the largest covert biological weapons program in the world. Told from inside by the man who ran it. New York: Random House Inc., 1999, 281.
- Ambrose, C.T. Osler and the infected letter. *Emerg Infect Dis*, 11, 2005, 689-693.
- Anonymous. Smallpox in Birmingham. *Br Med J*, 16, 1978, 837-838.
- Arita, I., Gispén, R., Kalter, S.S., Wah, L.T., Marennikova, S.S., Netter, R., Tagaya, I. Outbreaks of monkeypox and serological surveys in nonhuman primates. *Bull World Health Org*, 46, 1972, 625-631.
- Barkham, T. and Hoorfar, J. Internal amplification control for PCR should not be mandatory in the clinical medical environment. *J Clin Microbiol*, 42, 2004, 3379-3380.
- Baxby, D. Cowpox: increased incidence or interest? *Lancet*, 343, 1994, 543.
- Baxby, D. and Bennett, M. Cowpox: a re-evaluation of the risks of human cowpox based on new epidemiological information. *Arch Virol Suppl*, 13, 1997a, 1-12.
- Baxby, D. and Bennett, M. Poxvirus zoonoses. *J Med Microbiol*, 46, 1997b, 17-33.
- Baxby, D. and Hill, B.J. Buffalopox virus. *Vet Rec*, 85, 1969, 315-316.
- Baxby, D., Bennett, M., Getty, B. Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases. *Br J Dermatol*, 131, 1994, 598-607.
- Beattie, E., Kauffman, E.B., Martinez, H., Perkus, M.E., Jacobs, B.L., Paoletti, E., Tartaglia, J. Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. *Virus Genes*, 12, 1996, 89-94.
- Becker, C., Kurth, A., Hessler, F., Kramp, H., Gokel, M., Hoffmann, R., Kuczka, A., Nitsche, A. Cowpox virus infection in pet rat owners: not always immediately recognized. *Dtsch Arztebl Int*, 106, 2009, 329-334.
- Beeching, N.J., Dance, D.A., Miller, A.R., Spencer, R.C. Biological warfare and bioterrorism. *BMJ*, 324, 2002, 336-339.
- Bennett, M. and Baxby, D. Cowpox. *J Med Microbiol*, 45, 1996, 157-158.
- Bennett, M. and Begon, M.E. Virus zoonoses--a long-term overview. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 20, 1997, 101-109.
- Bennett, M., Crouch, A.J., Begon, M., Duffy, B., Feore, S., Gaskell, R.M., Kelly, D.F., McCracken, C.M., Vicary, L., Baxby, D. Cowpox in British voles and mice. *J Comp Pathol*, 116, 1997, 35-44.
- Biel, S.S. and Gelderblom, H.R. Electron Microscopy of Viruses. In: Cann, A. ed. *Virus Cell Culture - A Practical Approach*. Oxford University Press, 1999, pp. 11-47.
- Biere, B., Schweiger, B., Nitsche, A. Influenza A H1N1 diagnostics: the first, the fastest, and the most reliable. *Lancet Infect Dis*, 9, 2009, 721-722.
- Blasco, R., Sisler, J.R., Moss, B. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *J Virol*, 67, 1993, 3319-3325.
- Bonilla-Guerrero, R. and Poland, G.A. Smallpox vaccines: current and future. *J Lab Clin Med*, 142, 2003, 252-257.
- Bonnekoh, B., Falk, K., Reckling, K.F., Kenklies, S., Nitsche, A., Ghebremedhin, B., Pokrywka, A., Franke, I., Thriene, B., König, W., Pauli, G., Gollnick, H. Cowpox infection transmitted from a domestic cat. *J Dtsch Dermatol Ges*, 6, 2008, 210-213.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28, 1990, 495-503.
- Borst, A., Box, A.T., Fluit, A.C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23, 2004, 289-299.
- Bray, M. and Roy, C.J. Antiviral prophylaxis of smallpox. *J Antimicrob Chemother*, 54, 2004, 1-5.
- Breman, J.G., Kalisa, R., Steniowski, M.V., Zannotto, E., Gromyko, A.I., Arita, I. Human monkeypox, 1970-79. *Bull World Health Organ*, 58, 1980, 165-182.
- Brick, D.J., Burke, R.D., Minkley, A.A., Upton, C. Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. *J Gen Virol*, 81, 2000, 1087-1097.
- Broyles, S.S. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol*, 84, 2003, 2293-2303.
- Calderara, S., Xiang, Y., Moss, B. Orthopoxvirus IL-18 binding proteins: affinities and antagonist activities. *Virology*, 279, 2001, 22-26.
- Campe, H., Zimmermann, P., Glos, K., Bayer, M., Bergemann, H., Dreweck, C., Graf, P., Weber, B.K., Meyer, H., Buttner, M., Busch, U., Sing, A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg Infect Dis*, 15, 2009, 777-780.

- Carletti, F., Di Caro, A., Calcaterra, S., Grolla, A., Czub, M., Ippolito, G., Capobianchi, M.R., Horejsh, D. Rapid, differential diagnosis of orthopox- and herpesviruses based upon real-time PCR product melting temperature and restriction enzyme analysis of amplicons. *J Virol Methods*, 129, 2005, 97-100.
- CDC. Laboratory-acquired vaccinia exposures and infections--United States, 2005-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 57, 2008, 401-404.
- Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of monkeypox-Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 52, 2003a, 537-540.
- Chantrey, J., Meyer, H., Baxby, D., Begon, M., Bown, K.J., Hazel, S.M., Jones, T., Montgomery, W.I., Bennett, M. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect*, 122, 1999, 455-460.
- Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S., Chang, W. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 72, 1998, 1577-1585.
- CIDRAP. Smallpox: Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prophylaxis. Minneapolis, MN: CIDRAP, 2007, <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/smallpox/biofacts/smlpx-summary.html>.
- Cohen, H.W., Gould, R.M., Sidel, V.W. Smallpox vaccinations and adverse events. *JAMA*, 295, 2006, 1897-1898.
- Cono, J., Casey, C.G., Bell, D.M. Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians. *MMWR Recomm Rep*, 52, 2003, 1-28.
- Coras, B., Essbauer, S., Pfeffer, M., Meyer, H., Schroder, J., Stolz, W., Landthaler, M., Vogt, T. Cowpox and a cat. *Lancet*, 365, 2005, 446.
- Cummings, J.F., Polhemus, M.E., Hawkes, C., Klote, M., Ludwig, G.V., Wortmann, G. Lack of vaccinia viremia after smallpox vaccination. *Clin Infect Dis*, 38, 2004, 456-458.
- Curry, A., Appleton, H., Dowsett, B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron*, 37, 2006, 91-106.
- Czerny, C.P., Wagner, K., Gessler, K., Mayr, A., Kaaden, O.R. A monoclonal blocking-ELISA for detection of orthopoxvirus antibodies in feline sera. *Vet Microbiol*, 52, 1996, 185-200.
- Czerny, C.P., Zeller-Lue, C., Eis-Hubinger, A.M., Kaaden, O.R., Meyer, H. Characterization of a cowpox-like orthopox virus which had caused a lethal infection in man. *Arch Virol Suppl*, 13, 1997, 13-24.
- Damaso, C.R., Esposito, J.J., Condit, R.C., Moussatche, N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*, 2000, 439-449.
- Damon, I. Poxviruses. In: D.M. Knipe et al. (eds.), *Field's Virology*, 5th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp. 2946-2975.
- Damon, I. and Esposito, J.J. Poxviruses that infect humans. In: Murray, P.R. et al. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Vol. 2. Washington, DC: ASM Press, 2003, pp. 1583-1592.
- Dbaiibo, G.S., Perry, D.K., Gamard, C.J., Platt, R., Poirier, G.G., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. Cytokine response modifier A (CrmA) inhibits ceramide formation in response to tumor necrosis factor (TNF)-alpha: CrmA and Bcl-2 target distinct components in the apoptotic pathway. *J Exp Med*, 185, 1997, 481-490.
- De Clercq E. Cidofovir in the therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections. *Trends Pharmacol Sci*, 23, 2002, 456-458.
- Dhar, A.D., Werchniak, A.E., Li, Y., Brennick, J.B., Goldsmith, C.S., Kline, R., Damon, I., Klaus, S.N. Tanapox infection in a college student. *N Engl J Med*, 350, 2004, 361-366.
- Di Giulio, D.B. and Eckburg, P.B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis*, 4, 2004, 15-25.
- Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L., Smith, G.L. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science*, 327, 2010, 873-876.
- Döllinger, J. Proteomanalyse Pocken infizierter Zellen: Modulation der Expression Apoptose relevanter Proteine. Universität Erlangen, Diplomarbeit, 2009.
- Downie, A.W., McCarthy, Y.K., MacDonald, A. Viraemia in smallpox. *Lancet*, 2, 1950a, 513-514.
- Drexler, I., Staib, C., Sutter, G. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr Opin Biotechnol*, 15, 2004, 506-512.
- Drumond, B.P., Leite, J.A., da Fonseca, F.G., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect*, 10, 2008, 185-197.
- Dubois, M.E. and Slifka, M.K. Retrospective Analysis of Monkeypox Infection. *Emerg Infect Dis*, 14, 2008, 592-599.
- Dunlop, L.R., Oehlberg, K.A., Reid, J.J., Avci, D., Rosengard, A.M. Variola virus immune evasion proteins. *Microbes Infect*, 5, 2003, 1049-1056.
- Earl, P.L., Americo, J.L., Wyatt, L.S., Eller, L.A., Montefiori, D.C., Byrum, R., Piatak, M., Lifson, J.D., Amara, R., Robinson, H.L., Huggins, J.W., Moss, B. Recombinant modified vaccinia virus Ankara provides durable protection against disease caused by an immunodeficiency virus as well as long-term immunity to an orthopoxvirus in a non-human primate. *Virology*, 366, 2007, 84-97.
- Eis-Hubinger, A.M., Gerritzen, A., Schneeweis, K.E., Pfeiff, B., Pullmann, H., Mayr, A., Czerny, C.P. Fatal cowpox-like virus infection transmitted by cat. *Lancet*, 336, 1990, 880.

- Esposito, J.J. and Knight, J.C. Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*, 143, 1985, 230-251.
- Espy, M.J., Cockerill III, F.R., Meyer, R.F., Bowen, M.D., Poland, G.A., Hadfield, T.L., Smith, T.F. Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol*, 40, 2002, 1985-1988.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., III, Smith, T.F. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 19, 2006, 165-256.
- Essbauer, S., Pfeffer, M., Meyer, H. Zoonotische Pockenviren. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2004, 671-679.
- Essbauer, S., Meyer, H., Porsch-Ozcurumez, M., Pfeffer, M. Long-lasting stability of vaccinia virus (orthopoxvirus) in food and environmental samples. *Zoonoses Public Health*, 54, 2007, 118-124.
- Essbauer, S., Pfeffer, M., Meyer, H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol*, 140, 2010, 229-236.
- Evans, C.H. Cytokines and viral anti-immune genes. *Stem Cells*, 14, 1996, 177-184.
- Fedele, C.G., Negro, A., Molero, F., Sanchez-Seco, M.P., Tenorio, A. Use of internally controlled real-time genome amplification for detection of variola virus and other orthopoxviruses infecting humans. *J Clin Microbiol*, 44, 2006, 4464-4470.
- Fenner, F., Henderson, D.A., Arita, I., Jezek, Z., Ladnyi, I.D. *Smallpox and its Eradication*. Geneva: World Health Organization, 1988.
- Fenner, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol Rev*, 24, 2000, 123-133.
- Fenner, F. Poxviridae, in: D. E. White and Frank J. Fenner (eds.), *Medical Virology*, 4th edition, San Diego: Academic Press, 2006.
- Fenner, F., Wittek, R., Dumbell, K.R. *The Orthopoxviruses*. San Diego, CA: Academic Press, 1989.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*. 2nd edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003.
- Frey, S.E. and Belshe, R.B. Poxvirus zoonoses--putting pocks into context. *N Engl J Med*, 350, 2004, 324-327.
- Fulginiti, V.A., Papier, A., Lane, J.M., Neff, J.M., Henderson, D.A. Smallpox vaccination: a review, part I. Background, vaccination technique, normal vaccination and revaccination, and expected normal reactions. *Clin Infect Dis*, 37, 2003a, 241-250.
- Fulginiti, V.A., Papier, A., Lane, J.M., Neff, J.M., Henderson, D.A. Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events. *Clin Infect Dis*, 37, 2003b, 251-271.
- Garcia, M.A., Guerra, S., Gil, J., Jimenez, V., Esteban, M. Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L. *Oncogene*, 21, 2002, 8379-8387.
- Garon, C.F., Barbosa, E., Moss, B. Visualization of an inverted terminal repetition in vaccinia virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 1978, 4863-4867.
- Geddes, A.M. The history of smallpox. *Clin Dermatol*, 24, 2006, 152-157.
- Goldberg, T.L., Chapman, C.A., Cameron, K., Saj, T., Karesh, W.B., Wolfe, N.D., Wong, S.W., Dubois, M.E., Slifka, M.K. Serologic Evidence for Novel Poxvirus in Endangered Red Colobus Monkeys, Western Uganda. *Emerg Infect Dis*, 14, 2008, 801-803.
- Gomez, C.E., Najera, J.L., Krupa, M., Esteban, M. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther*, 8, 2008, 97-120.
- Gottschalk, R. and Preiser, W. Bioterrorism: is it a real threat? *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 194, 2005, 109-114.
- Grosenbach, D.W., Jordan, R., King, D.S., Berhanu, A., Warren, T.K., Kirkwood-Watts, D.L., Tyavanagimatt, S., Tan, Y., Wilson, R.L., Jones, K.F., Hruby, D.E. Immune responses to the smallpox vaccine given in combination with ST-246, a small-molecule inhibitor of poxvirus dissemination. *Vaccine*, 26, 2007, 933-46.
- Grundy, I. Montagu's variolation. *Endeavour*, 24, 2000, 4-7.
- Guarner, J., Johnson, B.J., Paddock, C.D., Shieh, W.J., Goldsmith, C.S., Reynolds, M.G., Damon, I.K., Regnery, R.L., Zaki, S.R. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. *Emerg Infect Dis*, 10, 2004, 426-431.
- Gubser, C., Hue, S., Kellam, P., Smith, G.L. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol*, 85, 2004, 105-117.
- Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., van Kuppeveld, F.J., Smith, G.L. A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog*, 3, 2007, e17.
- Gupta, A.K., Akin, D., Bashir, R. Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness. *Appl Phys Letters*, 84, 2004, 1976-1978.
- Hanson, D. and Diven, D.G. *Molluscum contagiosum*. *Dermatol Online J*, 9, 2003, 2.
- Harper, G.J. Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses. *J Hyg (Lond)*, 59, 1961, 479-486.
- Hatakeyama, S., Moriya, K., Saijo, M., Morisawa, Y., Kurane, I., Koike, K., Kimura, S., Morikawa, S. Persisting humoral antiviral immunity within the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12, 2005, 520-524.
- Hazel, S.M., Bennett, M., Chantrey, J., Bown, K., Cavanagh, R., Jones, T.R., Baxby, D., Begon, M. A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: cowpox and wild rodents. *Epidemiol Infect*, 124, 2000, 551-562.

- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 1996, 986-994.
- Henderson, D.A. The eradication of smallpox. *Sci Am*, 235, 1976, 25-33.
- Henderson, D.A. Smallpox eradication. *Public Health Rep*, 95, 1980, 422-426.
- Henning, K., Czerny, C.P., Meyer, H., Muller, T., Kramer, M. A seroepidemiological survey for orthopox virus in the red fox (*Vulpes vulpes*). *Vet Microbiol*, 43, 1995, 251-259.
- Hooper, J.W., Thompson, E., Wilhelmssen, C., Zimmerman, M., Ichou, M.A., Steffen, S.E., Schmaljohn, C.S., Schmaljohn, A.L., Jahrling, P.B. Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. *J Virol*, 78, 2004, 4433-4443.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., Fach, P. Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. *Lett Appl Microbiol*, 38, 2004, 79-80.
- Howard, A.R., Weisberg, A.S., Moss, B. Congregation of orthopoxvirus virions in cytoplasmic A-type inclusions is mediated by interactions of a bridging protein (A26p) with a matrix protein (ATIp) and a virion membrane-associated protein (A27p). *J Virol*, 84, 2010, 7592-7602.
- Howell, M.D., Streib, J.E., Leung, D.Y. Antiviral activity of human beta-defensin 3 against vaccinia virus. *J Allergy Clin Immunol*, 119, 2007, 1022-1025.
- Hsiao, J.C., Chung, C.S., Chang, W. Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain. *J Virol*, 72, 1998, 8374-8379.
- Hsiao, J.C., Chung, C.S., Chang, W. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol*, 73, 1999, 8750-8761.
- Hsiao, J.C., Chao, C.C., Young, M.J., Chang, Y.T., Cho, E.C., Chang, W. A poxvirus host range protein, CP77, binds to a cellular protein, HMG20A, and regulates its dissociation from the vaccinia virus genome in CHO-K1 cells. *J Virol*, 80, 2006, 7714-7728.
- Huang, J., Huang, Q., Zhou, X., Shen, M.M., Yen, A., Yu, S.X., Dong, G., Qu, K., Huang, P., Anderson, E.M., Daniel-Issakani, S., Buller, R.M., Payan, D.G., Lu, H.H. The poxvirus p28 virulence factor is an E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 279, 2004, 54110-54116.
- Huq, F. Effect of temperature and relative humidity on variola virus in crusts. *Bull World Health Organ*, 54, 1976, 710-712.
- Hutson, C.L., Lee, K.N., Abel, J., Carroll, D.S., Montgomery, J.M., Olson, V.A., Li, Y., Davidson, W., Hughes, C., Dillon, M., Spurlock, P., Kazmierczak, J.J., Austin, C., Miser, L., Sorhage, F.E., Howell, J., Davis, J.P., Reynolds, M.G., Braden, Z., Kareem, K.L., Damon, I.K., Regnery, R.L. Monkeypox zoonotic associations: insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state US outbreak. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 2007, 757-768.
- Ink, B.S., Gilbert, C.S., Evan, G.I. Delay of vaccinia virus-induced apoptosis in nonpermissive Chinese hamster ovary cells by the cowpox virus CHOhr and adenovirus E1B 19K genes. *J Virol*, 69, 1995, 661-668.
- Jackson, R.J., Ramsay, A.J., Christensen, C.D., Beaton, S., Hall, D.F., Ramshaw, I.A. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J Virol*, 75, 2001, 1205-1210.
- Jenner, E. Further Observations on the Variolæ Vaccinæ, or Cow-Pox. London: Sampson Low, 1799.
- Jenner, E. A Continuation of Facts and Observations Relative to the Variolæ Vaccinæ, or Cow-Pox. London: Sampson Low, 1800.
- Jenner, E. An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolæ Vaccinæ, as disease discovered in some western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox. London: Sampson Low, 1878.
- Jentarra, G.M., Heck, M.C., Youn, J.W., Kibler, K., Langland, J.O., Baskin, C.R., Ananieva, O., Chang, Y., Jacobs, B.L. Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: Scarification vaccination. *Vaccine*, 26, 2008, 2860-2872.
- Jezeq, Z., Grab, B., Szczeniowski, M.V., Paluku, K.M., Mutombo, M. Human monkeypox: secondary attack rates. *Bull World Health Organ*, 66, 1988, 465-470.
- Jones, T. IMVAMUNE, an attenuated modified vaccinia Ankara virus vaccine for smallpox infection. *Curr Opin Mol Ther*, 10, 2008, 407-417.
- Jordan, R. and Hruby, D. Smallpox antiviral drug development: satisfying the animal efficacy rule. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 4, 2006, 277-289.
- Juncker-Voss, M., Prosl, H., Lussy, H., Enzenberg, U., Auer, H., Lassnig, H., Muller, M., Nowotny, N. [Screening for antibodies against zoonotic agents among employees of the Zoological Garden of Vienna, Schonbrunn, Austria]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 117, 2004, 404-409.
- Kaysser, P., von Bomhard W., Dobrzykowski, L., Meyer, H. Genetic diversity of feline cowpox virus, Germany 2000-2008. *Vet Microbiol*, 141, 2009, 282-288.
- Kennedy, R.B., Ovsyannikova, I., Poland, G.A. Smallpox vaccines for biodefense. *Vaccine*, 27 Suppl 4, 2009, D73-D79.
- Kenner, J., Cameron, F., Empig, C., Jobs, D.V., Gurwith, M. LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine*, 24, 2006, 7009-7022.

- Kik, M.J., Liu, P.L., van Asten, J.A. Cowpoxvirus infection in the Patagonian cavy (*Dolichotis patagonum*) emerging disease in an educational animal park the first reported case. *Vet Q*, 28, 2006, 42-44.
- Klote, M.M., Engler, R.J., Martin, B.L., Cummings, J.F., Wortmann, G.W., Ludwig, G.V. Vaccinia DNA in blood after smallpox vaccination. *JAMA*, 296, 2006, 1350-1351.
- Kramski, M. Infections of common marmosets with calpox virus: A model for smallpox virus infections. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin, Biologie (Virologie), 2009.
- Kramski, M., Matz-Rensing, K., Stahl-Hennig, C., Kaup, F.J., Nitsche, A., Pauli, G., Ellerbrok, H. A novel highly reproducible and lethal nonhuman primate model for orthopox virus infection. *PLoS ONE*, 5, 2010, e10412.
- Kuczka, A., Nitsche, A., Höveler, R., Becker, C., Kurth, A. Seltene Zoonose vermehrt in Deutschland nachgewiesen. *Deutsches Tierärzteblatt*, 3, 2009, 316-319.
- Kulesh, D.A., Baker, R.O., Loveless, B.M., Norwood, D., Zwiers, S.H., Mucker, E., Hartmann, C., Herrera, R., Miller, D., Christensen, D., Wasieloski, L.P., Jr., Huggins, J., Jahrling, P.B. Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the roche LightCycler and the Cepheid smart Cyler platforms. *J Clin Microbiol*, 42, 2004a, 601-609.
- Kulesh, D.A., Loveless, B.M., Norwood, D., Garrison, J., Whitehouse, C.A., Hartmann, C., Mucker, E., Miller, D., Wasieloski, L.P., Jr., Huggins, J., Huhn, G., Miser, L.L., Imig, C., Martinez, M., Larsen, T., Rossi, C.A., Ludwig, G.V. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Lab Invest*, 84, 2004b, 1200-1208.
- Kurth, A. and Nitsche, A. Fast and reliable diagnostic methods for the detection of human poxvirus infections. *Future Virology*, 2, 2007, 467-479.
- Kurth, A. and Nitsche, A. Cowpox in Zoo Animals. In: Miller RE, Fowler ME (eds.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*. Volume 7, Philadelphia, PA: Elsevier/Mosby/Saunders, 2011 (in press).
- Kurth, A., Achenbach, J., Miller, L., Mackay, I.M., Pauli, G., Nitsche, A. Orthopoxvirus detection in environmental specimens during suspected bioterror attacks: inhibitory influences of common household products. *Appl Environ Microbiol*, 74, 2008a, 32-37.
- Kurth, A., Wibbelt, G., Gerber, H.P., Petschaelis, A., Pauli, G., Nitsche, A. Rat-to-Elephant-to-Human Transmission of Cowpox Virus. *Emerg Infect Dis*, 14, 2008b, 670-671.
- Kurth, A., Straube, M., Kuczka, A., Dunsche, A.J., Meyer, H., Nitsche, A. Cowpox virus outbreak in banded mongooses (*Mungos mungo*) and jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) with a time-delayed infection to humans. *PLoS ONE*, 4, 2009, e6883.
- Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C., Colman, P.M. Vaccinia virus anti-apoptotic FIL is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ*, 15, 2008, 1564-1571.
- Ladnyi, I.D. and Breman, J.G. Smallpox eradication: progress and problems. *Dev Biol Stand*, 41, 1978, 281-290.
- Lalani, A.S., Masters, J., Zeng, W., Barrett, J., Pannu, R., Everett, H., Arendt, C.W., McFadden, G. Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science*, 286, 1999, 1968-1971.
- Langland, J.O. and Jacobs, B.L. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology*, 299, 2002, 133-141.
- Learned, L.A., Reynolds, M.G., Wassa, D.W., Li, Y., Olson, V.A., Karem, K., Stempora, L.L., Braden, Z.H., Kline, R., Likos, A., Libama, F., Moudzeo, H., Bolanda, J.D., Tarangonia, P., Boumandoki, P., Formenty, P., Harvey, J.M., Damon, I.K. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. *Am J Trop Med Hyg*, 73, 2005, 428-434.
- Leite, J.A., Drumond, B.P., Trindade, G.S., Lobato, Z.I.P., da Fonseca, F.G., dos Santos, J.R., Madureira, M.C., Guedes, M.I.M.C., Ferreira, J.M.S., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 11, 2005, 1935-1938.
- Lelie, P.N., Reesink, H.W., Lucas, C.J. Inactivation of 12 viruses by heating steps applied during manufacture of a hepatitis B vaccine. *J Med Virol*, 23, 1987, 297-301.
- Letai, A.G. Smallpox and smallpox vaccination. *N Engl J Med*, 348, 2003, 1920-1925.
- Lewin, P.K. Mummified, frozen smallpox: is it a threat? *JAMA*, 253, 1985, 3095-
- Lewis, F.M., Chernak, E., Goldman, E., Li, Y., Karem, K., Damon, I.K., Henkel, R., Newbern, E.C., Ross, P., Johnson, C.C. Ocular vaccinia infection in laboratory worker, Philadelphia, 2004. *Emerg Infect Dis*, 12, 2006, 134-137.
- Lewis-Jones, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr Opin Infect Dis*, 17, 2004, 81-89.
- Li, Y., Carroll, D.S., Gardner, S.N., Walsh, M.C., Vitalis, E.A., Damon, I.K. On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2007, 15787-15792.
- Likos, A.M., Sammons, S.A., Olson, V.A., Frace, A.M., Li, Y., Olsen-Rasmussen, M., Davidson, W., Galloway, R., Khristova, M.L., Reynolds, M.G., Zhao, H., Carroll, D.S., Curns, A., Formenty, P., Esposito, J.J., Regnery, R.L., Damon, I.K. A tale of two clades: monkeypox viruses. *J Gen Virol*, 86, 2005, 2661-2672.

- Lin, C.L., Chung, C.S., Heine, H.G., Chang, W. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol*, 74, 2000, 3353-3365.
- Long, G.W., Nobel, J., Jr., Murphy, F.A., Herrmann, K.L., Lourie, B. Experience with electron microscopy in the differential diagnosis of smallpox. *Appl Microbiol*, 20, 1970, 497-504.
- Loparev, V.N., Massung, R.F., Esposito, J.J., Meyer, H. Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region. *J Clin Microbiol*, 39, 2001, 94-100.
- Loveless, B.M., Mucker, E.M., Hartmann, C., Craw, P.D., Huggins, J., Kulesh, D.A. Differentiation of Variola major and Variola minor variants by MGB-Eclipse probe melt curves and genotyping analysis. *Mol Cell Probes*, 23, 2009, 166-170.
- Mackay, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, 10, 2004, 190-212.
- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 30, 2002, 1292-1305.
- Madeley, C.R. Diagnosing smallpox in possible bioterrorist attack. *Lancet*, 361, 2003, 97-98.
- Mahalingam, S. and Karupiah, G. Modulation of chemokines by poxvirus infections. *Curr Opin Immunol*, 12, 2000, 409-412.
- Marennikova, S.S., Shelukhina, E.M., Matsevich, G.R., Ezek, Z., Khodakevich, L.N., Zhukova, O.A., Yanova, N.N., Chekunova, E.V. Monkey pox in humans: current results. *Acta Virol*, 33, 1989, 246-253.
- Martina, B.E., van Doornum, G., Dorrestein, G.M., Niesters, H.G., Stittelaar, K.J., Wolters, M.A., van Bolhuis, H.G., Osterhaus, A.D. Cowpox virus transmission from rats to monkeys, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 12, 2006, 1005-1007.
- Matz-Rensing, K., Ellerbrok, H., Ehlers, B., Pauli, G., Floto, A., Alex, M., Czerny, C.P., Kaup, F.J. Fatal poxvirus outbreak in a colony of New World monkeys. *Vet Pathol*, 43, 2006, 212-218.
- Mayr, A. Smallpox vaccination and bioterrorism with pox viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 26, 2003, 423-430.
- McFadden, G. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol*, 3, 2005, 201-213.
- McFadden, G. and Barry, M. How Poxviruses Oppose Apoptosis. *Sem Virol*, 8, 1998, 429-442.
- McKenzie, R., Kotwal, G.J., Moss, B., Hammer, C.H., Frank, M.M. Regulation of complement activity by vaccinia virus complement-control protein. *J Infect Dis*, 166, 1992, 1245-1250.
- Mercer, J. and Helenius, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 320, 2008, 531-535.
- Meyer, H., Ropp, S.L., Esposito, J.J. Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *J Virol Methods*, 64, 1997, 217-221.
- Meyer, H., Damon, I.K., Esposito, J.J. Orthopoxvirus Diagnostics. *Methods Mol Biol*, 269, 2004, 119-134.
- Moore, Z.S., Seward, J.F., Lane, J.M. Smallpox. *Lancet*, 367, 2006, 425-435.
- Moss, B. Poxviridae: The Viruses and their Replication. In: DM Knipe and PM Howley (eds.), *Fields Virology*. 5th edition, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp. 2905-2945.
- Moussatche, N., Tuyama, M., Kato, S.E., Castro, A.P., Njaine, B., Peralta, R.H., Peralta, J.M., Damaso, C.R., Barroso, P.F. Accidental infection of laboratory worker with vaccinia virus. *Emerg Infect Dis*, 9, 2003, 724-726.
- Moussatche, N., Damaso, C.R., McFadden, G. When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond. *J Infect Dev Ctries*, 2, 2008, 156-173.
- Muller, T., Henning, K., Kramer, M., Czerny, C.P., Meyer, H., Ziedler, K. Seroprevalence of orthopox virus specific antibodies in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the Federal State Brandenburg, Germany. *J Wildl Dis*, 32, 1996, 348-353.
- Nagasse-Sugahara, T.K., Kisielius, J.J., Ueda-Ito, M., Curti, S.P., Figueiredo, C.A., Cruz, A.S., Silva, M.M., Ramos, C.H., Silva, M.C., Sakurai, T., Salles-Gomes, L.F. Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46, 2004, 315-322.
- Nicholls, R.D. and Gray, T.A. Cellular source of the poxviral N1R/p28 gene family. *Virus Genes*, 29, 2004, 359-364.
- Ninove, L., Domart, Y., Vervel, C., Voinot, C., Salez, N., Raoult, D., Meyer, H., Capek, I., Zandotti, C., Charrel, R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg Infect Dis*, 15, 2009, 781-784.
- Nitsche, A. Oligonucleotide Design for In-House Real-Time PCR Applications in Microbiology. In: I.M. Mackay (ed.), *Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterisation*. Norwich: Horizon Scientific Press, 2007a, pp. 41-70.
- Nitsche, A. Rapid Detection of Bioterror Agents. In: Mackay IM (ed.), *Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization*. Wymondham, UK: Caister Academic Press, 2007b, pp. 319-356.
- Nitsche, A. and Pauli, G. Sporadic human cases of cowpox in Germany. *Euro Surveill*, 12, 2007, E070419.
- Nitsche, A., Ellerbrok, H., Pauli, G. Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J Clin Microbiol*, 42, 2004, 1207-1213.
- Nitsche, A., Steger, B., Ellerbrok, H., Pauli, G. Detection of vaccinia virus DNA on the LightCycler by fluorescence melting curve analysis. *J Virol Methods*, 126, 2005, 187-195.
- Nitsche, A., Stern, D., Ellerbrok, H., Pauli, G. Detection of Infectious Poxvirus Particles. *Emerg Infect Dis*, 12, 2006, 1139-1141.

- Olson, V.A., Laue, T., Laker, M.T., Babkin, I.V., Drosten, C., Shchelkunov, S.N., Niedrig, M., Damon, I.K., Meyer, H. Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J Clin Microbiol*, 42, 2004, 1940-1946.
- Panning, M., Asper, M., Kramme, S., Schmitz, H., Drosten, C. Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopox viruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clin Chem*, 50, 2004, 702-708.
- Paran, N. and Sutter, G. Smallpox vaccines: New formulations and revised strategies for vaccination. *Hum Vaccin*, 5, 2009, 824-831.
- Paran, N., Suezer, Y., Lustig, S., Israely, T., Schwantes, A., Melamed, S., Katz, L., Preuss, T., Hanschmann, K.M., Kalinke, U., Erez, N., Levin, R., Velan, B., Lower, J., Shafferman, A., Sutter, G. Postexposure Immunization with Modified Vaccinia Virus Ankara or Conventional Lister Vaccine Provides Solid Protection in a Murine Model of Human Smallpox. *J Infect Dis*, 199, 2009, 39-48.
- Parker, S., Nuara, A., Buller, R.M., Schultz, D.A. Human monkeypox: an emerging zoonotic disease. *Future Microbiol*, 2, 2007, 17-34.
- Parker, S., Touchette, E., Oberle, C., Almond, M., Robertson, A., Trost, L.C., Lampert, B., Painter, G., Buller, R.M. Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether-lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antiviral Res*, 77, 2008, 39-49.
- Parrino, J., McCurdy, L.H., Larkin, B.D., Gordon, I.J., Rucker, S.E., Enama, M.E., Koup, R.A., Roederer, M., Bailer, R.T., Moodie, Z., Gu, L., Yan, L., Graham, B.S. Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax challenge in vaccinia-naïve and vaccinia-immune individuals. *Vaccine*, 25, 2007, 1513-1525.
- Pelkonen, P.M., Tarvainen, K., Hynninen, A., Kallio, E.R., Henttonen, K., Palva, A., Vaheri, A., Vapalahti, O. Cowpox with severe generalized eruption, Finland. *Emerg Infect Dis*, 9, 2003, 1458-1461.
- Pfeffer, M. and Meyer, H. Poxvirus diagnostics In: Mercer AA, Schmidt A, Weber O (eds.), *Poxviruses*. Basel: Birkhäuser Verlag, 2007, pp. 355-374.
- Pfeiff, B., Pullmann, H., Eis-Hubinger, A.M., Gerritzen, A., Schneeweis, K.E., Mayr, A. [Lethal animal pox virus infection in an atopic patient simulating variola vera]. *Hautarzt*, 42, 1991, 293-297.
- Putz, M.M., Alberini, I., Midgley, C.M., Manini, I., Montomoli, E., Smith, G.L. Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *J Gen Virol*, 86, 2005, 2955-2960.
- Quenelle, D.C., Buller, R.M., Parker, S., Keith, K.A., Hrubby, D.E., Jordan, R., Kern, E.R. Efficacy of delayed treatment with ST-246 given orally against systemic orthopoxvirus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 2007a, 689-695.
- Quenelle, D.C., Prichard, M.N., Keith, K.A., Hrubby, D.E., Jordan, R., Painter, G.R., Robertson, A., Kern, E.R. Synergistic Efficacy of the Combination ST-246 with CMX001 against Orthopoxviruses. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 2007b, 4118-4124.
- Ramsley-Ewing, A.L. and Moss, B. Complementation of a vaccinia virus host-range K1L gene deletion by the nonhomologous CP77 gene. *Virology*, 222, 1996, 75-86.
- Roberts, K.L. and Smith, G.L. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol*, 16, 2008, 472-479.
- Ropp, S.L., Jin, Q., Knight, J.C., Massung, R.F., Esposito, J.J. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *J Clin Microbiol*, 33, 1995, 2069-2076.
- Rotz, L., Damon, I., Cono, J. Smallpox and Bioterrorism. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edition, Washington, DC: ASM Press, 2003, pp. 6-11.
- Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Iizuka, I., Sakai, K., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of Congo Basin and West African MPXV strains. *Jpn J Infect Dis*, 61, 2008, 140-142.
- Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Iizuka, I., Shiota, T., Sakai, K., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates. *J Gen Virol*, 90, 2009, 2266-2271.
- Saito, T., Fujii, T., Kanatani, Y., Saijo, M., Morikawa, S., Yokote, H., Takeuchi, T., Kuwabara, N. Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. *JAMA*, 301, 2009, 1025-1033.
- Scagliarini, A., Gallina, L., Dal Pozzo, F., Battilani, M., Ciulli, S., Prosperi, S. Heparin binding activity of orf virus F1L protein. *Virus Res*, 105, 2004, 107-112.
- Schmiedeknecht, G., Eickmann, M., Kohler, K., Herden, C.E., Kolesnikova, L., Forster, C., Burkhardt, E.H., Konig, M., Thiel, M., Reinacher, M. Fatal cowpox virus infection in captive banded mongooses (*Mungos mungo*). *Vet Pathol*, 47, 2010, 547-552.
- Scholz, J., Rosen-Wolff, A., Bugert, J., Reisner, H., White, M.I., Darai, G., Postlethwaite, R. Molecular epidemiology of molluscum contagiosum. *J Infect Dis*, 158, 1988, 898-900.
- Schupp, C.J., Nitsche, A., Bock-Hensley, O., Bohm, S., Flechtenmacher, C., Kurth, A., Saenger, K., Hoferer, M., Kusters, U., Gunther, P., Engelmann, G., Schnitzler, P. A 14-year-old girl with a vesicle on her finger and lymphadenitis. *J Clin Virol*, 2010, Epub Sep 7.

- Sedger, L.M., Osvath, S.R., Xu, X.M., Li, G., Chan, F.K., Barrett, J.W., McFadden, G. Poxvirus tumor necrosis factor receptor (TNFR)-like T2 proteins contain a conserved preligand assembly domain that inhibits cellular TNFR1-induced cell death. *J Virol*, 80, 2006, 9300-9309.
- Seet, B.T. and McFadden, G. Viral chemokine-binding proteins. *J Leukoc Biol*, 72, 2002, 24-34.
- Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., Barrett, J.W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S.H., Lucas, A., McFadden, G. Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol*, 21, 2003, 377-423.
- Sen, G.C. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol*, 55, 2001, 255-281.
- Senkevich, T.G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G.E., Moss, B. Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2005, 18572-18577.
- Sepkowitz, K.A. How contagious is vaccinia? *N Engl J Med*, 348, 2003, 439-446.
- Shchelkunov, S.N. Immunomodulatory proteins of orthopoxviruses. *Mol Biol (Mosk)*, 37, 2003, 41-53.
- Shelukhina, E.M., Marennikova, S.S., Shenkman, L.S., Froltsova, A.E. Variola virus strains of 1960--1975: the range of intraspecies variability and relationship between properties and geographic origin. *Acta Virol*, 23, 1979, 360-366.
- Shen, Y. and Nemunaitis, J. Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther*, 11, 2005, 180-195.
- Siegert, R. and Schulz, W. [Appearance and duration of viremia following smallpox vaccination.] *Z Hyg Infektionskr*, 137, 1953, 81-91.
- Silva-Fernandes, A.T., Travassos, C.E., Ferreira, J.M., Abrahao, J.S., Rocha, E.S., Viana-Ferreira, F., dos Santos, J.R., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol*, 44, 2009, 308-313.
- Sinclair, R., Boone, S.A., Greenberg, D., Keim, P., Gerba, C.P. Persistence of category A select agents in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 74, 2008, 555-563.
- Singh, R.K., Hosamani, M., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Rasool, T.J., Yadav, M.P. Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. *Anim Health Res Rev*, 8, 2007, 105-114.
- Sliva, K. and Schnierle, B. From actually toxic to highly specific - novel drugs against poxviruses. *Virol J*, 4, 2007, 8.
- Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76, 1994, 959-962.
- Smith, G.L. and Law, M. The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res*, 106, 2004, 189-197.
- Smith, G.L., Vanderplassen, A., Law, M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol*, 83, 2002, 2915-2931.
- Sofi Ibrahim M., Kulesh, D.A., Saleh, S.S., Damon, I.K., Esposito, J.J., Schmaljohn, A.L., Jahrling, P.B. Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J Clin Microbiol*, 41, 2003, 3835-3839.
- Song, L., Ahn, S., Walt, D.R. Detecting biological warfare agents. *Emerg Infect Dis*, 11, 2005, 1629-1632.
- Spehner, D., Gillard, S., Drillien, R., Kirn, A. A cowpox virus gene required for multiplication in Chinese hamster ovary cells. *J Virol*, 62, 1988, 1297-1304.
- Stewart, T.L., Wasilenko, S.T., Barry, M. Vaccinia virus F1L protein is a tail-anchored protein that functions at the mitochondria to inhibit apoptosis. *J Virol*, 79, 2005, 1084-1098.
- Sutlovic, D., Definis, G.M., Andelinovic, S., Gugic, D., Primorac, D. Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croat Med J*, 46, 2005, 556-562.
- Symons, J.A., Tschärke, D.C., Price, N., Smith, G.L. A study of the vaccinia virus interferon-gamma receptor and its contribution to virus virulence. *J Gen Virol*, 83, 2002, 1953-1964.
- Talbot, T.R., Ziel, E., Doersam, J.K., LaFleur, B., Tollefson, S., Edwards, K.M. Risk of vaccinia transfer to the hands of vaccinated persons after smallpox immunization. *Clin Infect Dis*, 38, 2004, 536-541.
- Tanabe, I. and Hotta, S. Effect of disinfectants on variola virus in cell culture. *Appl Environ Microbiol*, 32, 1976, 209-212.
- Taylor, J.M., Quilty, D., Banadyga, L., Barry, M. The vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax. *J Biol Chem*, 281, 2006, 39728-39739.
- Tegnell, A., Wahren, B., Elgh, F. Smallpox--eradicated, but a growing terror threat. *Clin Microbiol Infect*, 8, 2002, 504-509.
- Tewari, M. and Dixit, V.M. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem*, 270, 1995a, 3255-3260.
- Tewari, M., Telford, W.G., Miller, R.A., Dixit, V.M. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 270, 1995b, 22705-22708.
- Thomssen, R. [Smallpox]. *Dtsch Med Wochenschr*, 128, 2003, 183-184.
- Trindade, G.S., da Fonseca, F.G., Marques, J.T., Diniz, S., Leite, J.A., De Bodt, S., Van der Peer, Y., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G. Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J Gen Virol*, 85, 2004, 2015-2021.
- Trindade, G.S., Lobato, Z.I., Drumond, B.P., Leite, J.A., Trigueiro, R.C., Guedes, M.I., da Fonseca, F.G., dos Santos, J.R., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G. Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am J Trop Med Hyg*, 75, 2006, 486-490.

- Tryland, M., Myrmel, H., Holtet, L., Haukenes, G., Traavik, T. Clinical cowpox cases in Norway. *Scand J Infect Dis*, 30, 1998, 301-303.
- Upton, C., Slack, S., Hunter, A.L., Ehlers, A., Roper, R.L. Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *J Virol*, 77, 2003, 7590-7600.
- von Bomhard, W., Mauldin, E.A., Breuer, W., Pflieger, S., Nitsche, A. Localized cowpox infection in a 5-month-old Rottweiler. *Vet Dermatol*, 2010, Epub Aug 23.
- von Magnus, P., Andersson, E.K., Petersen, K.B., Birch-Anderson, A. A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Path Microbiol Scand*, 46, 1959, 156-176.
- Vora, S., Damon, I., Fulginiti, V., Weber, S.G., Kahana, M., Stein, S.L., Gerber, S.I., Garcia-Houchins, S., Lederman, E., Hruby, D., Collins, L., Scott, D., Thompson, K., Barson, J.V., Regnery, R., Hughes, C., Daum, R.S., Li, Y., Zhao, H., Smith, S., Braden, Z., Karem, K., Olson, V., Davidson, W., Trindade, G., Bolken, T., Jordan, R., Tien, D., Marcinak, J. Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccinee. *Clin Infect Dis*, 46, 2008, 1555-1561.
- Vorou, R.M., Papavassiliou, V.G., Pierroutsakos, I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr Opin Infect Dis*, 21, 2008, 153-156.
- Wasilenko, S.T., Banadyga, L., Bond, D., Barry, M. The vaccinia virus F1L protein interacts with the proapoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. *J Virol*, 79, 2005, 14031-14043.
- Whitley, R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res*, 57, 2003, 7-12.
- WHO. Declaration of global eradication of smallpox. *Wkly Epidemiol Rec*, 55, 1980, 2127-2137.
- WHO. Smallpox eradication: destruction of variola virus stocks. *Can Commun Dis Rep*, 28, 2002, 40-44.
- WHO. WHO Recommendations concerning the distribution, handling and synthesis of Variola virus DNA. <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/SummaryrecommendationsMay08.pdf>, 2008.
- Wittek, R. Could smallpox come back? *Int J Infect Dis*, 8 Suppl 2, 2004, S1.
- Wittek, R. Vaccinia immune globulin: current policies, preparedness, and product safety and efficacy. *Int J Infect Dis*, 10, 2006, 193-201.
- Wlodaver, C.G., Palumbo, G.J., Waner, J.L. Laboratory-acquired vaccinia infection. *J Clin Virol*, 29, 2004, 167-170.
- Wolff, H.L. and Croon, J.J. The survival of smallpox virus (variola minor) in natural circumstances. *Bull World Health Organ*, 38, 1968, 492-493.
- Wolfs, T.F., Wagenaar, J.A., Niesters, H.G., Osterhaus, A.D. Rat-to-human transmission of Cowpox infection. *Emerg Infect Dis*, 8, 2002, 1495-1496.
- Xiang, Y. and Moss, B. IL-18 binding and inhibition of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1999, 11537-11542.
- Yang, G., Pevear, D.C., Davies, M.H., Collett, M.S., Bailey, T., Rippen, S., Barone, L., Burns, C., Rhodes, G., Tohan, S., Huggins, J.W., Baker, R.O., Buller, R.L., Touchette, E., Waller, K., Schriewer, J., Neyts, J., DeClercq, E., Jones, K., Hruby, D., Jordan, R. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge. *J Virol*, 79, 2005, 13139-13149.
- Zafar, A., Swanepoel, R., Hewson, R., Nizam, M., Ahmed, A., Husain, A., Grobbelaar, A., Bewley, K., Mioulet, V., Dowsett, B., Easterbrook, L., Hasan, R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis*, 13, 2007, 902-904.
- Zwartouw, H.T. The chemical composition of vaccinia virus. *J Gen Microbiol*, 34, 1964, 115-123.

6 Zusammenfassung

Orthopockenviren können Infektionen in Tieren und Menschen mit entweder einem sehr engen Wirtsspektrum oder einem breiten Wirtsspektrum hervorrufen. So infizierte das Variola-Virus ausschließlich den Menschen, während von anderen Orthopockenviren Übertragungen vom Tier auf den Menschen, so genannte zoonotische Infektionen, bekannt sind. Obwohl die Variola-Viren durch weltweite Impfungen vor 30 Jahren ausgerottet wurden, besteht das Risiko des erneuten Auftretens aus nicht bekannten Quellen oder durch gezielte bioterroristische Anschläge. Ein Wiederauftreten (*re-emerging*) von Variola-Viren hätte in der teilweise immunologisch naiven Bevölkerung unabsehbare Konsequenzen, da es keine zugelassene Therapie gibt. Daher ist eine rechtzeitige Erkennung von VARV-Infektionen essentiell für die schnelle Einleitung von Gegenmaßnahmen wie z.B. die Umsetzung des deutschen Pockenrahmenplans (http://www.rki.de/cln_151/nn_1350428/DE/Content/Infekt/Biosicherheit/Vorsorge/Pockenrahmenkonzept/pockenrahmenkonzept_node.html?__nnn=true). Die vorliegende Arbeit beschreibt daher zunächst Ansätze der verlässlichen Diagnostik von Orthopockenviren und die schnelle Erkennung von Variola-Viren aus klinischen und Umweltproben.

Abgesehen von Variola-Viren, deren Risiko des Auftretens trotz potenziell dramatischer Folgen als gering eingeschätzt wird, kommt es in Deutschland und Europa vermehrt zu Infektionen mit Kuhpockenviren. Diese Viren spielen als *emerging viruses* insofern eine besondere Rolle, als sie das größte und kompletteste Genom besitzen und trotz großer Heterogenität im Genom, ganze Bereiche mit hoher Homologie zu Variola-Virus aufweisen. Kuhpockenviren zeigen im Gegensatz zu Variola-Viren einen extrem breiten Wirtsbereich und wurden aus einer Vielzahl von Spezies isoliert, wo sie teilweise letale Infektionen auslösen können. Das Reservoir für Kuhpockenviren sind offensichtlich Nagetiere und die häufigste Übertragung auf den Menschen findet zurzeit durch Katzen statt. Bei Menschen verläuft die Kuhpockeninfektion in der Regel selbstlimitierend, bei immunsupprimierten Personen sind letale Verläufe beschrieben.

Daher ist eine Bewertung des Risikopotentials von Kuhpockenviren für den Menschen eminent wichtig. Wesentlich scheint bei den Kuhpockenviren die spezifische Interaktion zwischen einem Virusstamm und dem Wirt. So weiß man, dass bestimmte Kuhpockenviren in einem Wirt letale Infektionen hervorrufen können, während verwandte Kuhpockenviren dort keine symptomatische Infektion bewirken. In dieser Arbeit wurden daher Kuhpockenvirus-Infektionen von Menschen und Tieren beschrieben und bezüglich ihres Nutzens für die Risikobewertung analysiert. Da die genauen molekularen Mechanismen der Virus-Wirt-Interaktion nicht verstanden sind und die Population der Kuhpockenviren genetisch sehr heterogen ist, ist eine pauschale Abschätzung des Risikos durch Kuhpocken zurzeit nicht möglich.

7 Danksagung

Für gewöhnlich gibt es zahlreiche Personen, denen man an dieser Stelle danken möchte. Denn wissenschaftliche Arbeiten macht man nie alleine, sondern immer in einem Team. Daher möchte ich diese Seite nutzen um denen zu danken, die eine besondere Rolle für mich und meine Arbeit gespielt haben.

Mein erster und größter Dank gilt Professor Georg Pauli für die immer währende Motivation und seine oft sehr weitsichtige Unterstützung. Deine immer positive Einstellung und die angenehme Arbeitsatmosphäre haben mich vermutlich für die nächsten 25 Jahre geprägt – und die Messlatte sehr hoch gehängt.

Außerdem danke ich Professor Detlev Krüger für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Bereitschaft mir die Lehre am Institut für Virologie für die Habilitation zu ermöglichen.

Wesentlich für die Freude an der Arbeit war in den vergangenen Jahren vor allem die überaus gute Atmosphäre im ZBS 1. Dazu haben so viele Kollegen beigetragen, dass ich mich jetzt schon bei den Vergessenen entschuldige. Mein Dank geht an Livia, Kati, Janine, Daniel, Lilija, Daniel, Wojtek, Peter, Jörg, Sarah, Johannes, Marco, Emilia, Julia, Jule, die kleine Jule, Deli, Sim, Silvi, Marlies, Sascha, Anna, Anne, Sophie, Aleks und Andreas, den „kleinen Kurth“ (Zitat Hans Gelderblom).

Ursula Erikli danke ich für die Umwandlung der statistischen Zeichenverteilung in eine grammatikalisch richtige ☺, aber auch für das oftmals geliehene Ohr.

Danke Ati! Aber glaub mir, ich werde auch jetzt nicht mehr Zeit haben.....

8 Erklärung

Erklärung

§4 Abs.3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift