

Aus dem Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für Infektionsmedizin Insel Riems
und dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Charakterisierung der Virulenz
von Isolaten des Virus der Klassischen Schweinepest
beim Schwarzwild**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Annika Tischer, geb. Knopf
Tierärztin aus Lutherstadt Wittenberg

Berlin 2006

Journal-Nr.: 3086

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. D. Ebner
Zweiter Gutachter: Dir. u. Prof. Dr. V. Kaden
Dritter Gutachter: PD Dr. E. Uecker

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Classical swine fever virus; wild boar; viral replication; virulence

Tag der Promotion: 09. Februar 2007

Meiner Mutter

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i> (doppelt destilliertes Wasser)
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
Ak	Antikörper
AZM	Anzuchtmedium
BC	<i>Buffy coat</i>
BDV	<i>Border disease-Virus</i>
BVDV	Virus der bovinen Virusdiarrhoe
cDNA	<i>copy DNA</i>
cp	zytopathogen
CPE	zytopathogener Effekt
<i>d</i>	<i>dies, diei</i> (Tag, Tage)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Erhaltungsmedium
FKS	fetales Kälberserum
fragl	fragliche Reaktion
ggr.	geringgradig
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
<i>i.n.</i>	<i>intranasal</i>
IPLA	<i>Immunoperoxidase linked assay</i>
hgr.	hochgradig
kb	Kilobasen
KID ₅₀	Kulturinfektiöse Dosis ₅₀
KSP	Klassische Schweinepest
KSPV	Virus/Viren der Klassischen Schweinepest
mAk	monoklonaler Antikörper
mgr.	mittelgradig
<i>m.o.i.</i>	<i>Multiplicity of infection</i>
ncp	nicht zytopathogen
n.d.	nicht durchgeführt
ND ₅₀	Neutralisierende Dosis ₅₀

Verwendete Abkürzungen

neg	negative Reaktion
n-PCR	<i>nested</i> -PCR
o.b.B.	ohne besonderen Befund
o.I.	orale Immunisierung
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
<i>p.m.</i>	<i>post mortem</i>
PNS	Pferdenormalserum
pos	positive Reaktion
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RS	Rinderserum
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SNT	Serumneutralisationstest
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS Borat EDTA-Puffer
TBS	<i>TRIS buffered saline</i> (TRIS-gepufferte Kochsalzlösung)
UTR	<i>untranslated region</i> (nichttranslatierte Region)
VA	Virusanzucht
ZK	Zellkultur
ZKÜ	Zellkulturüberstand

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	Virus der Klassischen Schweinepest	3
2.1.1.	Taxonomie	3
2.1.2.	Morphologie	3
2.1.3.	Genom und Genprodukte	3
2.1.4.	Antigenität	6
2.1.5.	Genotypisierung	7
2.2.	Verlaufsformen und Pathologie der Erkrankung	8
2.2.1.	Postnatale Infektion	9
2.2.1.1.	Perakute, akute und subakute Verlaufsform	9
2.2.1.2.	Chronische Verlaufsform	10
2.2.2.	Pränatale Infektion	11
2.3.	Pathogenese und Immunologie der Erkrankung	12
2.3.1.	Pathogenese	12
2.3.2.	Immunologische Veränderungen	12
2.4.	Faktoren, die den Erkrankungsverlauf beeinflussen	14
2.4.1.	Einflussfaktoren von Seiten des Wirtes	14
2.4.2.	Einflussfaktoren von Seiten des Virus	15
2.4.2.1.	Allgemeiner Überblick	15
2.4.2.2.	Virulenzspektrum	16
2.4.2.3.	Virulenzfaktoren und Charakterisierung der Virulenz	16
2.5.	Die Klassische Schweinepest beim Schwarzwild	25
2.5.1.	Vorkommen	25
2.5.2.	Epidemiologische Rolle des Schwarzwildes im Seuchengeschehen	26
2.5.3.	Bekämpfung der KSP beim Schwarzwild	28
3.	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1.	Zelllinien	31
3.2.	Virusstämme und -isolate	31
3.3.	Zellkulturmedien	33

3.4.	Chemikalien	34
3.5.	Lösungen und Puffer	35
3.6.	Seren, monoklonale Antikörper und Konjugate	38
3.6.1.	Seren	38
3.6.2.	Monoklonale Antikörper	38
3.6.3.	Konjugate	38
3.7.	Enzyme	38
3.8.	Antibiotika	38
3.9.	Geräte	39
3.10.	Verbrauchsmaterialien	39
3.11.	Tierexperimentelle Studien	40
3.11.1.	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	40
3.11.2.	Beurteilung des klinischen Bildes	41
3.11.3.	Herstellung von Virus zur Infektion	41
3.11.3.1.	Zellkultivierung	41
3.11.3.2.	Virusvermehrung in PK-15-Zellkulturen	41
3.11.4.	Infektion von Haus- und Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>95/1279</i>	42
3.11.5.	Infektion von Haus- und Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>E19/99</i>	43
3.11.6.	Infektion von Haus- und Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>E15/98</i>	44
3.11.7.	Probenaufbereitung	44
3.11.7.1.	Herstellung einer Organsuspension	44
3.11.7.2.	Knochenmarkausstrich	45
3.11.7.3.	Entnahme von Vollblut	45
3.11.7.4.	Isolierung der Leukozyten (<i>Buffy coat</i>)	45
3.11.7.5.	Gewinnung von Serum	45
3.11.7.6.	Entnahme von Nasentupferproben	46
3.11.8.	Nachweis von KSPV in der Zellkultur	46
3.11.8.1.	Passagierung von Probenmaterial aus Nasentupfern	46
3.11.8.2.	Virusanzucht in Zellkulturplatten	46
3.11.8.3.	Titration von viruspositiven Vollblutproben und Infektionsvirus	47
3.11.8.4.	Indirect Immunoperoxidase-linked Assay (IPLA)	47
3.11.9.	Nachweis von KSPV mittels RT-PCR	48
3.11.9.1.	RNA-Isolierung	48
3.11.9.2.	RT-PCR	48
3.11.9.3.	Gelelektrophorese	49
3.11.9.4.	nested-PCR (n-PCR)	49

3.11.10.	Nachweis von KSPV im Knochenmarkausstrich mittels Indirektem Immunfluoreszenz-Test (IIFT)	50
3.11.11.	Nachweis von Antikörpern gegen KSPV	50
3.11.11.1.	CHEKIT CSF-Sero-ELISA	50
3.11.11.2.	Serumneutralisationstest (SNT)	51
3.12.	Laborexperimentelle Studien	52
3.12.1.	Ein-Schritt-Wachstumskinetiken	52
3.12.1.1.	KSPV-Stämme und –Feldisolate	52
3.12.1.2.	Zellen	53
3.12.1.3.	Versuchsansatz und Probenahme	53
3.12.1.4.	Ermittlung der Virustiter	54
3.12.1.5.	Auswertung	54
3.12.1.5.1.	Index aus zellfreiem und zellgebundenem Virustiter	54
3.12.1.5.2.	Statistische Auswertung	55
3.12.1.5.3.	Darstellung der Wachstumskurven in der Ersten Ableitung	55
3.12.2.	Expressionskinetiken des Glykoproteins E2	55
3.12.2.1.	KSPV-Stämme und –Feldisolate	55
3.12.2.2.	Virusvermehrung und Herstellung von Zelllysate	56
3.12.2.3.	Proteinbestimmung	56
3.12.2.4.	SDS-PAGE	56
3.12.2.5.	Western Blot	57
3.12.2.6.	Auswertung mit der Night Owl	58
3.12.3.	Vergleich von Plaquegrößen	59
3.12.3.1.	KSPV-Stämme und –Feldisolate	59
3.12.3.2.	Virusanzucht zur Plaquegrößenbestimmung	59
3.12.3.3.	Plaquemessung und Auswertung	60
4.	ERGEBNISSE	61
4.1.	Tierexperimentelle Studien	61
4.1.1.	Infektion von Hausschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>95/1279</i>	61
4.1.1.1.	Klinisches Bild	61
4.1.1.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	63
4.1.1.3.	Virusnachweis	63
4.1.1.4.	Serologie	64
4.1.2.	Infektion von Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>95/1279</i>	65
4.1.2.1.	Klinisches Bild	65
4.1.2.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	67
4.1.2.3.	Virusnachweis	67
4.1.2.4.	Serologie	69
4.1.3.	Infektion von Hausschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>E19/99</i>	69

4.1.3.1.	Klinisches Bild	69
4.1.3.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	71
4.1.3.3.	Virusnachweis	72
4.1.3.4.	Serologie	72
4.1.4.	Infektion von Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>E19/99</i>	73
4.1.4.1.	Klinisches Bild	73
4.1.4.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	74
4.1.4.3.	Virusnachweis	75
4.1.4.4.	Serologie	75
4.1.5.	Infektion von Hausschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>E15/98</i>	77
4.1.5.1.	Klinisches Bild	77
4.1.5.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	78
4.1.5.3.	Virusnachweis	79
4.1.5.4.	Serologie	80
4.1.6.	Infektion von Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat <i>E15/98</i>	81
4.1.6.1.	Klinisches Bild	81
4.1.6.2.	Pathologisch-anatomische Befunde	82
4.1.6.3.	Virusnachweis	83
4.1.6.4.	Serologie	85
4.2.	Laborexperimentelle Studien	85
4.2.1.	Ein-Schritt-Wachstumskinetiken	85
4.2.1.1.	Titerverhältnis zwischen zellgebundenem und zellfreiem Virus	85
4.2.1.1.1.	KSPV-Laborstämme (Genotyp 1.1)	85
4.2.1.1.2.	KSPV-Feldisolate (Genotyp 2.3)	86
4.2.1.1.3.	Titerverhältnis zwischen zellgebundenem und zellfreiem Virus im Zeitverlauf	89
4.2.1.1.4.	Statistische Auswertung	89
4.2.1.2.	Darstellung der Wachstumskurven in der Ersten Ableitung	91
4.2.1.2.1.	Zellgebundenes Virus	92
4.2.1.2.2.	Zellfreies Virus	92
4.2.2.	Expressionskinetik des Glykoproteins E2	93
4.2.2.1.	KSPV-Laborstämme	93
4.2.2.2.	KSPV-Feldisolate	93
4.2.3.	Bestimmung von Plaquegrößen	96
5.	DISKUSSION	98
5.1.	Tierexperimentelle Studien	98
5.1.1.	Infektion mit dem KSPV-Feldisolat <i>95/1279</i>	98
5.1.2.	Infektion mit dem KSPV-Feldisolat <i>E19/99</i>	101
5.1.3.	Infektion mit dem KSPV-Feldisolat <i>E15/98</i>	102

5.1.4.	Vergleichende Betrachtung der durchgeführten Tierexperimente - Möglichkeiten und Grenzen ihrer Anwendung zur Virulenzcharakterisierung der KSPV-Feldisolate	103
5.2.	Laborexperimentelle Studien	108
5.2.1.	Ein-Schritt-Wachstumskinetiken	108
5.2.1.1.	Titerverhältnis zwischen zellgebundenem und zellfreiem Virus	108
5.2.1.2.	Darstellung der Wachstumskurven in der Ersten Ableitung	113
5.2.2.	Expressionskinetik des Glykoproteins E2	114
5.2.3.	Bestimmung von Plaquegrößen	116
6.	ZUSAMMENFASSUNG	118
7.	SUMMARY	121
8.	LITERATUR	123

Danksagung

Lebenslauf

Selbständigkeitserklärung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zuallererst Herrn Dir. u. Prof. Dr. habil. V. Kaden für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Arbeit danken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. sc. D. Ebner gilt mein Dank für die Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit und zu deren Vertretung vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Für die sorgfältige Einarbeitung und die jederzeit bereitwillige Mitwirkung bei verschiedenen Fragestellungen der Arbeit sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor danke ich Frau B. Dannenfeld und Frau S. Hillmert.

Frau E. Lange danke ich für die umfangreiche Mitarbeit bei den Tierversuchen.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Isolierstallgebäudes für die Unterstützung bei der Tierversuchsdurchführung bedanken.

Den Mitarbeitern des Friedrich-Loeffler-Institutes Insel Riems gilt mein Dank für so manchen fachlichen Rat und stets freundlich gewährte Mithilfe in vielerlei Hinsicht.

Frau K. Osterrieder danke ich für die Anfertigung der statistischen Berechnungen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Karsten zum einen für die zahlreichen fachlichen Gespräche und Anregungen, zum anderen für die unschätzbare Unterstützung bei der Überwindung vieler kleinerer und größerer Tücken im Umgang mit dem Computer. Schließlich und nicht zuletzt möchte ich ihm für sein Verständnis und seinen immerwährenden Ansporn danken.

Ein kleines Dankeschön geht auch an meinen Sohn Anton, der mir durch artigen Mittagsschlaf wertvolle Zeit zum Schreiben der Arbeit einräumte!

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der im Literaturverzeichnis angeführten Quellen angefertigt habe.

Annika Tischer

Kiel, den 14.11.2006