

3. Material und Methoden

3.1. Zelllinien

Nachfolgend werden die verwendeten permanenten Zelllinien unter Bezugnahme auf den Linienpass der Zellbank der BFAV Insel Riems vorgestellt:

PK-15 *Porcine kidney 15*;
Herkunft: unbekannt, seit ca. 30 Jahren am Friedrich-Loeffler-Institut Insel Riems, Anzahl der Subkultivierungen insgesamt unbekannt;
Umsatzrate: 1:6 bis 1:10;
Zellbild: klare, regelmäßige polygonale Zellen
Morphologie: epitheloid

EFN-R Embryonale Ferkelnieren-Riebe;
Herkunft: Nieren zweier Feten 5 Tage vor der Geburt, Subkultivierungen erfolgten in der Zellbank;
Umsatzrate: 1:6 bis 1:10;
Zellbild: klare, regelmäßige polygonale Zellen
Morphologie: epitheloid

Zum Zellumsatz wurde ein Trypsin/Versen-Gemisch verwendet, bestehend aus:
8,0 g/l NaCl; 1,0 g/l Dextrose; 0,58 g/l NaHCO₃; 0,5 g/l Trypsin; 0,4 g/l KCl; 0,2 g/l Versen.

3.2. Virusstämme und -isolate

Alfort 187 Herkunft: EU-Referenzlabor für KSP, Tierärztliche Hochschule Hannover;
Ausgangspassage: unbekannt;
Verwendung von: Passagen auf PK-15

Koslov Herkunft: Biovetra Nitra, Außenstelle Telč, Slowakische Republik;
Ausgangspassage: unbekannt;
Verwendung von: Passagen auf PK-15

- Eystrup 91** Herkunft: Nationales Referenzlabor für KSP Insel Riems;
Verwendung von: Passagen auf PK-15
- Glentorf** Herkunft: EU-Referenzlabor für KSP, Tierärztliche Hochschule Hannover;
Ausgangspassage: unbekannt;
Verwendung von: Passagen auf PK-15
- Bergen** Herkunft: EU-Referenzlabor für KSP, Tierärztliche Hochschule Hannover;
Ausgangspassage: unbekannt;
Verwendung von: Passagen auf PK-15
- C-Stamm** Herkunft: Riemser Arzneimittel AG;
Ausgangspassage: unbekannt;
Verwendung von: Passagen auf EFN-R
- 95/1279** Herkunft: Landkreis Müritz;
Zeitpunkt der ersten Isolierung: Dezember 1995;
Ursprung: erlegter weiblicher Frischling;
Phänotyp: Flandern 90;
Genotyp: 2.3 Rostock (basierend auf 5'UTR);
Verwendung von: Passagen auf PK-15
- E19/99** Herkunft: Landkreis Nordvorpommern (Forstamt Spoldershagen);
Zeitpunkt der ersten Isolierung: September 1999;
Ursprung: Tonsille eines erlegten Wildschweines;
Phänotyp: Flandern 90;
Genotyp: 2.3 Rostock (basierend auf 5'UTR und E^{ms}-Region);
Verwendung von: Passagen auf PK-15
- E15/98** Herkunft: Kreis Oberhavel (Uckermark);
Zeitpunkt der ersten Isolierung: März 1998;
Ursprung: Organproben eines verendet aufgefundenen Wildschweins;
Phänotyp: Flandern 90;
Genotyp: 2.3 Güstrow (basierend auf 5'UTR und E^{ms}-Region);

Verwendung von: Passagen auf PK-15

Spante Herkunft: Kreis Ostvorpommern (Forstamt Spantekow);
Zeitpunkt der ersten Isolierung: 1998;
Ursprung: krank erlegtes Wildschwein; Nachweis von Viren gleichen Subtyps kurze Zeit später bei 3 weiteren, augenscheinlich gesunden Wildschweinen in der näheren Umgebung;
Phänotyp: ähnlich Flandern 90;
Genotyp: Gruppe 2.3 (basierend auf 5'UTR und E^{ms}-Region);
Verwendung von: Passagen auf PK-15

3.3. Zellkulturmedien

ZB5

Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) mit Hanks- und Earle-Salzen zu gleichen Teilen, nichtessentielle Aminosäuren, 10% fetales Kälberserum (FKS) bzw. Rinderserum (RS);
Verwendung als Anzuchtmedium (AZM) im geschlossenen System

ZB5c

Medium ZB5, ohne Serumzusatz;
Verwendung mit Zusatz von Pferdenormalserum (PNS) als AZM für PNS-adaptierte PK-15-Zelle

ZB9

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Earlesalzen, 10% FKS bzw. RS;
Verwendung als AZM in Zellkulturplatten (unter CO₂-Begasung)

ZB9d

Medium ZB9, ohne Serumzusatz;
Verwendung als Erhaltungsmedium (EM) in Zellkulturplatten (unter CO₂-Begasung)

ZB12

Leibovitz' Erhaltungsmedium (LEM) mit Hankssalzen; ohne Serumzusatz;
Verwendung als EM im geschlossenen System

3.4. Chemikalien

Aceton	(Riedel-de Haen)
Acrylamid	(Roth)
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)	(Sigma)
Agarose	(GIBCO BRL)
APS (Ammoniumpersulfat)	(Bio Rad)
Bromphenolblau	(Sigma)
DEPC (Diethylpyrocarbonat, reinst)	(Serva)
DMF (N, N-Dimethylformamid)	(Sigma)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	(Roth)
dNTP's (Desoxynukleotidtriphosphate)	(Promega)
Ethidiumbromid	(Serva)
Evans blue	(Merck)
Glycerol	(Serva)
Glycin	(Serva)
Heparin Sodium Salt Solution	(ICN Biomedicals Inc.)
Humanes Serumalbumin (HSA)	(Impfstoffwerk Dessau-Tornau)
Ladepuffer für PCR	(Promega)
Magermilchpulver	(Heirler Cenovis GmbH)
Magnesiumchlorid-6-hydrat	(Roth)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), 25 mM	(Promega)
Marker für PCR	(Promega)
Marker für SDS-PAGE	(Bio-Rad)
2-Mercaptoethanol, reinst	(Serva)
Methanol	(Roth)
N, N'-Methylbisacrylamid	(Raaral)
Mineralöl für die Molekularbiologie	(Sigma)
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	(Roth)
Na-Acetat-3-Hydrat	(Laborchemie Apolda)
SDS (Dodecylsulfat-Natriumsalz)	(Serva)
Super Signal Chemilumineszenzsubstrat	(Pierce)
Tween 20	(Serva)
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	(Sigma)

3. Material und Methoden

TRIS (Hydroxymethylaminomethan)	(Fluka BioChemika)
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	(Serva)
Wasserstoffperoxid 30%	(Sigma)

3.5. Lösungen und Puffer

5 × RT-Puffer, 500 µl	(Promega)
10 × Thermopuffer, 750 µl	(Promega)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

29,2 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid
ad 100 ml A. bidest.

DEPC-Wasser

100 µl DEPC
ad 100 ml A. bidest.
gut schütteln; Inkubation bei 37°C über Nacht; 3 × autoklaviert

Elektrophoresepuffer für SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

144,2 g Glycin
30,28 g TRIS
ad 1 l A. bidest.;
zum Gebrauch 100 ml dieser Stammlösung mit 890 ml A. bidest. und 10 ml 10% (w/w) SDS-Lösung mischen

Ethidiumbromidlösung

1 mg Ethidiumbromid
ad 1 ml A. bidest.

100 × Evans blue-Färbelösung

100 mg Evans blue
ad 0,1 l PBS⁻

3. Material und Methoden

4 × Ladepuffer für SDS-PAGE

2,0 ml 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8

1,6 ml Glycerol

3,2 ml SDS 10% (w/w)

0,8 ml Mercaptoethanol

0,4 ml Bromphenolblaulösung 2% (w/w)

Lysepuffer

418,6 mg MOPS

58,5 mg NaCl

30,5 mg $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

1 ml Triton X-100

ad 100 ml A. bidest.

mit 10 n NaOH auf pH 6,5 einstellen

0,05 M Na-Acetatpuffer

6,8 g Na-Acetat-3-hydrat

ad 1 l A. dest.

mit 10% (v/v) Essigsäure auf pH 5,0 einstellen

10 × Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Ionen (PBS⁻)

80,0 g NaCl

11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

2,0 g KCl

2,0 g KH_2PO_4

ad 1 l A. dest.

PBS⁻-Tween 20

1 l PBS⁻

100 µl Tween 20

3. Material und Methoden

Puffer für SDS-PAGE (Sammelgel)

12,11 g TRIS
800 mg SDS
ad 200 ml A. bidest.

Puffer für SDS-PAGE (Trenngel)

36,32 g TRIS
800 mg SDS
ad 200 ml A. bidest.

5 × TBE-Puffer

54,0 g Tris
27,5 g Borsäure
20 ml 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
ad 1 l A. dest.

10 × TBS

80,0 g NaCl
24,2 g TRIS
pH 7,6 einstellen mit 4 n HCl
ad 1 l A. bidest.

TBS-Tween

1 l 1 × TBS
500 µl Tween 20

Transferpuffer für Western Blot

11,4 g Glycin
2,42 g TRIS
1,0 g SDS
200 ml Methanol
ad 1 l A. bidest.

3.6. *Seren, monoklonale Antikörper und Konjugate*

3.6.1. Seren

Hyperimmunserum gegen KSPV aus Tierversuch 3/96 FLI Insel Riems:
Infektion mit Feldisolat *MV 140* aus Mecklenburg-Vorpommern (Schurig, 1999),
Hausschwein Nr. 677, Blutung 4 Monate *p.i.* am 14.03.1997

PNS (Pferdenormalserum) (Sigma)

3.6.2. Monoklonale Antikörper

HCTC 50/2/1 (anti-Glykoprotein E2) (FLI Insel Riems)

3.6.3. Konjugate

Immuno Pure^R Goat Anti-Mouse IgG+IgM, H+L
POD-conjugated (Pierce)
Goat Anti-Mouse Ig's/FITC (DAKO)

3.7. *Enzyme*

AMV Reverse Transkriptase (Promega)
Recombinant RNAsin^R Ribonuclease Inhibitor (Promega)
Taq DNA Polymerase (Promega)

3.8. *Antibiotika*

Gentamicin-Lösung (50 mg/ml in deionisiertem Wasser) (Sigma)
Penicillin G-Natriumsalz (ICN Biomedicals Inc.)
Streptomycin-Sulfat (ICN Biomedicals Inc.)

3.9. Geräte

Auflichtmikroskop	(Nikon)
Brutschrank	(Juan)
CCD-Kamera (Night Owl Molecular Light Imager)	(EG & G Berthold)
CO ₂ -Brutschrank	(Labotect)
Eismaschine	(Scotsman)
Elektrophoresekammer	(Stratagene)
ELISA-Reader Sunrise	(Tecan)
Fluoreszenzmikroskop	(Nikon)
Gefriertruhen	(Frigor)
Geldokumentationssystem	(Herolab)
Kühlzentrifuge Hettich Universal 30 RF	(Hettich)
Messokulare	(Carl Zeiss Jena)
Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor XL	(Misonix)
PAGE-Gelsystem Mini Protean II	(Bio Rad)
Stromversorgungsgerät	(Bio Rad)
Thermocycler T3	(Biometra)
Thermomixer	(Eppendorf)
Tischzentrifuge Eppendorf 5415 C	(Eppendorf)
Trans-Blot ^R Semi Dry Transfer-Cell	(Bio Rad)
Trockenschrank Thermocenter	(Salvis)
Wasserbad	(Julabo)

3.10. Verbrauchsmaterialien

Blot-Papier	(Bio Rad)
Costar ^R -Zellschaber	(Corning Inc.)
EDTA-Röhrchen	(Greiner)
Einwegspritzen	(Henke, Sass, Wolf GmbH)
Gefrierbeutel	(Toppits)
Glaszellkulturflaschen (Povitzky- und Mikroflaschen)	(Glaswerke Ilmenau)
Glaszentrifugenröhrchen 10 ml	(Glaswerke Ilmenau)

Injektionskanülen	(Becton Dickinson)
Mikrotiterplatten 96 Well	(Greiner)
Nalgene-Kryoröhrchen	(Nalge Company, USA)
Nitrozellulose-Transfer-Membran 0,2 µm	(Schleicher und Schuell GmbH)
Objekträger	(Menzel)
PAP-PEN	(Sciences Services)
Parafilm	(American National Can™)
Pipettenspitzen	(Südlabor)
Polystyren-Zellkulturflaschen 12,5 cm ²	(Falcon, Becton Dickinson)
Reaktionsgefäße	(Eppendorf)
Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP)	(Amersham Pharmacia Biotech)
Serumröhrchen	(Greiner)
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	(Sarstedt)
Seesand	(Roth)
Sterilfilter	(Schleicher und Schuell GmbH)
Wattestäbchen	(Hartmann)

3.11. Tierexperimentelle Studien

3.11.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die eingesetzten Isolate wurden sowohl am Haus- als auch am Wildschwein auf ihre Virulenz untersucht. Bei den Hausschweinen handelte es sich um Absatzferkel aus dem Landwirtschaftsbetrieb e.G. Schwasdorf, die zum Zeitpunkt der Einstellung ca. 50 Tage alt und aus einer Kreuzung zwischen Leicoma-Schweinen (männlich) und der F1-Generation aus Deutschem Edelschwein und Deutscher Landrasse (weiblich) hervorgegangen waren.

Die verwendeten Wildschweine unterschiedlichen Alters stammten aus Wildfängen aus dem Landkreis Nordvorpommern (Forstamt Barthenhagen) bzw. aus Berlin (Forstamt Tegel).

Die Schweine wurden jeweils mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn im Isolierstallgebäude des FLI Insel Riems eingestallt und einmal täglich mit handelsüblichen Fertigfuttermitteln gefüttert, das Schwarzwild erhielt zusätzlich Mais und Äpfel. Die Tränkwasseraufnahme erfolgte *ad libitum* über Nippeltränken.

3.11.2. Beurteilung des klinischen Bildes

Um eine standardisierte Bewertung der klinischen Symptomatik zu ermöglichen, wurde ein Schema aus insgesamt 7 Kriterien verwendet (Tab. 1), die abhängig von der Schwere der jeweiligen Krankheitserscheinungen mit 0 bis 3 Punkten bewertet wurden (nach Mittelholzer *et al.*, 2000). Durch Addition der einzelnen Punkte ergab sich ein klinischer Index für jedes Tier, aus dessen Höhe Rückschlüsse auf die Virulenz des zu prüfenden Isolates gezogen werden sollten. Spitzenwerte von mehr als 11 von insgesamt 21 möglichen Punkten ließen dabei auf eine hohe Virulenz schließen, Indices von 4 bis 11 Punkten sprachen für ein moderat virulentes Isolat; Werte darunter klassifizierten das Isolat als schwach virulent.

3.11.3. Herstellung von Virus zur Infektion

3.11.3.1. Zellkultivierung

PK-15-Zellen wurden im Labor routinemäßig in Povitzky-Flaschen bei 37°C gehalten und bei einem ca. 80% geschlossenen Zellrasen (nach 3-4 Tagen) umgesetzt. Hierzu wurde das AZM aus den Flaschen entfernt und die Zellen zwei- bis dreimal mit einem Trypsin-Versen-Gemisch gespült und mit 500 µl davon nach einer kurzen Inkubation bei 37°C abgelöst. Die Zellsuspension wurde nun im Verhältnis 1:15 bis 1:18 in AZM aufgenommen und in neue Povitzky- (20 ml Zellsuspension je Flasche) bzw. Mikroflaschen (5 ml Zellsuspension je Flasche) überführt.

3.11.3.2. Virusvermehrung in PK-15-Zellkulturen

2-3 Tage alte PK-15-Monolayer wurden nach Entfernung des AZM mit Suspensionen des jeweiligen Virus in ausreichendem Volumen überschichtet. Nach 1 h Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von LEM (5% PNS, 100 I.E. Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml). Die Menge des zu inokulierenden Erhaltungsmediums richtete sich nach den verwendeten Zellkulturgefäßen (Povitzky- oder Mikroflaschen). Nach 72 h bei 37°C fand ein zweimaliger Gefriertauprozess (-20°C) statt. Danach wurde die virushaltige Suspension zum weiteren Zellaufschluss und zur Trennung der Viruspartikel vom Zelldetritus 15 s im Eisbad mit 7 W ultrabeschallt und der Detritus danach für 15 min bei 850 × g und 4°C abzentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde titriert (s. 3.11.8.3.), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Tab. 1: Ermittlung des klinischen Index

Parameter	Erscheinungsbild	Bewertung (Punkte)
1. Allgemeinbefinden	<ul style="list-style-type: none"> • vital (neugierig, steht sofort auf) • Vitalität gering reduziert (steht zögernd, aber selbständig auf) • apathisch, steht nur unter Zwang auf, legt sich schnell wieder hin • festliegend 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
2. Atmung	<ul style="list-style-type: none"> • ruhig, gleichmäßig • Frequenz geringgradig (ggr.) erhöht (<20/min) • Frequenz deutlich erhöht (>20/min), pumpend • erschwert (deutlich pumpend; Husten) 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
3. Gang	<ul style="list-style-type: none"> • Bewegungen gut koordiniert • zeitweilig steif oder schwankend • Ataxie/ Hinterhandschwäche; gehfähig • schwere Lähmungserscheinungen, Ruderbewegungen 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
4. Haut	<ul style="list-style-type: none"> • gleichmäßig blassrosa, Haarkleid glatt • gerötete Hautpartien • bläulichrot verfärbte Hautpartien, einige Petechien • schwarzblau verfärbte, nekrotische Hautbereiche, ausgedehnte Hämorrhagien 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
5. Futteraufnahme	<ul style="list-style-type: none"> • normal • geringgradig reduziert • stark herabgesetzt • keine 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
6. Kotabsatz	<ul style="list-style-type: none"> • normale Konsistenz • breiig • dünnbreiig, Durchfall • wässrig oder blutig, Durchfall 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>
7. Augen/Konjunktiven	<ul style="list-style-type: none"> • blassrosa • gerötet, Sekret klar • stärker entzündet, Sekret trübe • stark entzündet, Sekret eitrig, Blutgefäße stark injiziert 	<p>0</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>3</p>

3.11.4. Infektion von Haus- und Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat 95/1279

Dieser sowie die nachfolgend unter 3.11.5. und 3.11.6. dargestellten Tierversuche wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen: VI 522a-7221.31-2-006/00).

Das Isolat 95/1279 kam in der 3. Passage auf PK-15-Zellen zum Einsatz. 5 Absatzferkel (Tiere 2101 bis 2105) sowie 3 Frischlinge (Tiere 57 bis 59) mit einem Ausgangskörpergewicht von ca. 15 kg wurden mit $3,6 \times 10^4$ kulturinfektösen Dosen 50 (KID₅₀) intranasal (*i.n.*) infiziert (1 ml Virussuspension/Nasenloch), täglich (Hausschweine) bzw. in regelmäßigen Abständen (Wildschweine) thermometriert und klinisch beobachtet. Von den Hausschweinen wurden am Tag der Infektion sowie an den Tagen 3, 5, 7, 10 und 13 *p.i.* EDTA-Blut und Nasentupfer bzw. am Tag 0 und zu den 3 letztgenannten Terminen zusätzlich Serum zur Ermittlung der Serokonversion gewonnen. Nach Eintritt des Todes wurden die Tiere pathomorphologisch untersucht, und es erfolgte die Entnahme von Organproben zum Virusnachweis (Tonsille, Mandibularlymphknoten, Milz, ein Lungen- oder Darmlymphknoten) sowie die Anfertigung eines Knochenmarkausstriches.

Von den Frischlingen erfolgte die Entnahme von EDTA-Blut sowie von Nasensekret mittels Tupfer am Tag 0 und 5; zu den Zeitpunkten 0, 10, 14, 27, 40, 46 und 61 *d p.i.* wurde zusätzlich Blut zur Serumgewinnung entnommen. Nach der Tötung der Tiere am Tag 61 erfolgte die pathomorphologische Untersuchung. Die gleichen Organproben wie bei den Hausschweinen wurden gewonnen. Aus den EDTA-Blutproben wurde *Buffy coat* (BC) isoliert und zum Virusnachweis durch Anzucht auf PK-15-Zellen genutzt. Bei negativem Ergebnis erfolgte zusätzlich eine Aufreinigung der Ribonukleinsäure (RNA) mit nachfolgender reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) direkt aus der EDTA-Blutprobe. Der Nachweis von KSPV-Antikörpern im Serum wurde mit Hilfe des CHEKIT-CSF-Sero-*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), (Dr. Bommeli AG, Bern) und des Serumneutralisationstestes (SNT) geführt.

3.11.5. Infektion von Haus- und Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat E19/99

Die 4. Passage des Feldisolates E19/99 fand im Tierversuch Verwendung. 4 Absatzferkel (Tiere 2116 bis 2119) sowie 2 Frischlinge (Tiere 14 und 15), die zu Versuchsbeginn ca. 5 bis 6 Monate alt waren, wurden *i.n.* mit $5,6 \times 10^4$ KID₅₀ infiziert und täglich thermometriert und klinisch beurteilt. Am Tag 0, 5, 7, 12 und 20 *p.i.* erfolgte die Entnahme von Vollblut- und Nasentupferproben. Ab 7. *d p.i.* wurde auch Serum zur Bestimmung der Antikörperentwicklung gewonnen. Nach dem Tode der Tiere wurden diese der Sektion zugeführt. Von beiden Frischlingen wurden Organe (Tier 14: Tonsille, Milz, Niere, Mandibularlymphknoten; Tier 15: Tonsille, Niere, Mandibularlymphknoten) zum Virusnachweis entnommen.

Das Procedere zum Nachweis von KSPV und –Ak entspricht dem im Versuchsablauf für das Isolat 95/1279 beschriebenen (s. 3.11.4.).

3.11.6. Infektion von Haus- und Wildschweinen mit dem KSPV-Feldisolat E15/98

Die 4. Passage des Virus auf PK-15 wurde im Versuch eingesetzt. Je 5 Absatzferkel (Tiere 2261 bis 2265) und Frischlinge (Tiere 2045, 2047, 2049, 2050 und 2051) wurden *i.n.* mit $6,3 \times 10^4$ bzw. 2×10^4 KID₅₀ infiziert. Die Frischlinge wiesen Differenzen bezüglich der Körpermasse auf. Die Tiere 2047, 2050 und 2051 waren unter 10 kg, Frischling 2045 ca. 10 kg und Tier 2049 über 10 kg schwer. Alle Tiere wurden täglich klinisch beobachtet und täglich bzw. in regelmäßigen Abständen (Wildschweine) thermometriert. Den Hausschweinen wurden an den Tagen 0, 3, 5, 7, 10, 14, und 21 *p.i.* Vollblut- und Nasentupferproben entnommen. Ab 7. *d p.i.* erfolgte die Gewinnung von Serum zur Bestimmung der Antikörperentwicklung. Nach dem Verenden bzw. am Tag 31 *p.i.* (zum Versuchsende getötete Schweine) wurden die Tiere pathomorphologisch untersucht und Organproben (Tonsille, Milz, Mandibularlymphknoten, Lungen- oder Intestinallymphknoten) zur Testung auf KSPV bzw. -Antigen entnommen.

Den Wildschweinen wurde an den Tagen 0, 5, 10, 14, 27, 40, 46 und 61 *p.i.* Blut und Nasensekret entnommen, sowie ab 10. *d p.i.* das Serum auf die Bildung von Antikörpern untersucht. Die Sektion erfolgte auch hier *post mortem (p.m.)* bzw. bei überlebenden Tieren am Tag 61 *p.i.* Folgende Organe wurden beprobt: Tonsille, Milz, Mandibularlymphknoten, Intestinal- oder Lungenlymphknoten.

Die jeweiligen Nachweisverfahren wurden wie für die übrigen Tierexperimente beschrieben durchgeführt.

3.11.7. Probenaufbereitung

3.11.7.1. Herstellung einer Organsuspension

Die in den Sektionen entnommenen Organe wurden je nach Fragestellung (Vorhandensein oder Fehlen des KSPV-typischen Krankheitsbildes und entsprechender pathomorphologischer Veränderungen beim betreffenden Tier) einzeln oder im Pool angerieben. Hierbei wurde jeweils 1 g Organmaterial mit einer Schere zerkleinert und unter Verwendung von sterilem Seesand im Mörser zerrieben. Nach Zugabe von 4 ml sterilem LEM (versetzt mit 300 I.E./ml Penicillin und 300 µg/ml Streptomycin) erfolgte eine Aufschwemmung der Organanreicherung, so dass eine 20%ige Organsuspension entstand, die in ein 10 ml-Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen, ca. 2 h bei Raumtemperatur und danach über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation ($2180 \times g$,

15 min, 4°C) wurde der Überstand in ein Nalgene-Kryoröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

3.11.7.2. Knochenmarkausstrich

Eine Rippe des betreffenden Tieres wurde mit Hilfe einer Zange so gequetscht, dass ein Tropfen des Knochenmarkes austrat und auf zwei fettfreien Objektträgern ausgestrichen werden konnte. Nach Lufttrocknung wurden die Objektträger für 10 min in Azeton fixiert und dann bei –20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.11.7.3. Entnahme von Vollblut

Ca. 5 ml Blut aus der *Vena cava cranialis* wurden entnommen und in ein EDTA-Röhrchen überführt. Die Aufbewahrung des EDTA-Blutes bis zum weiteren Gebrauch fand in Eppendorf-Röhrchen bei –20°C statt.

3.11.7.4. Isolierung der Leukozyten (*Buffy coat*)

In einem sterilen Zentrifugenröhrchen wurden 2 ml EDTA-Blut bei $200 \times g$ und 12°C für 10 min zentrifugiert. Die vorwiegend aus Leukozyten bestehende weiße Schicht zwischen Erythrozyten und Plasma wurde danach mit einer 1 ml-Glaspipette vorsichtig in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von 2 ml *A. dest.* erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Nach 1 min wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 200 µl sterilem 10-fach konzentriertem PBS⁻ gestoppt. Nach einer zweiten Zentrifugation ($140 \times g$, 5 min, 12°C) wurde der Überstand verworfen und das im Röhrchen verbliebene Zellsediment in 1 ml 4°C-kaltem DMEM aufgenommen, in 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und bei –20°C gelagert.

3.11.7.5. Gewinnung von Serum

Die Entnahme von Blut zur Serumgewinnung erfolgte ebenfalls aus der *Vena cava cranialis*. Das Blut wurde in Serumröhrchen aufgenommen und der Blutkuchen nach vollständiger Gerinnung bei $1400 \times g$ und 4°C für 10 min abzentrifugiert, der Serumüberstand abpipettiert und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen bei –20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.11.7.6. Entnahme von Nasentupferproben

Die Gewinnung des Nasensekrets erfolgte durch Einführen eines sterilen Wattestäbchens in beide Nasenöffnungen des Tieres. Das Wattestäbchen wurde danach in ein Zentrifugenröhrchen überführt, das 1 ml LEM + 0,1% Gentamycin enthielt. Nach Virusextraktion über Nacht bei 4°C und einem Gefriertauschritt bei -20°C erfolgte die Filtration des Probenmaterials mit Hilfe eines Spritzenvorsatzfilters (0,45 µm Porengröße) und dessen Verbringung auf PK-15-Zellkulturen zum Virusnachweis.

3.11.8. Nachweis von KSPV in der Zellkultur

3.11.8.1. Passagierung von Probenmaterial aus Nasentupfern

Von einem zu mindestens 80% geschlossenen Zellrasen wurde das AZM entfernt und 1 ml des Probenmaterials (s. 3.11.7.6.) auf PK-15-Zellen gegeben und bei 37°C für 1 bis 2 h inkubiert. Nach dem Dekantieren der Probe, dem Spülen des Zellrasens mit LEM und der Zugabe von 5 ml LEM unter Zusatz von 5% PNS, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin erfolgte die Bebrütung der Mikroflaschen für 72 h bei 37°C. Danach wurden Zellen und Medium einem zweimaligen Gefriertauprozeß (-20°C) unterworfen und die so erhaltene Suspension zur Beimpfung von PK-15-Zellen in Zellkulturplatten verwendet.

3.11.8.2. Virusanzucht in Zellkulturplatten

Zum spezifischen Virusnachweis wurden BC- bzw. Vollblutproben, Organanreibungen sowie die Anzuchtpassagen der Nasentupferproben auf PK-15-Monolayer in 24-Well-Zellkulturplatten verbracht. Zu diesem Zweck erfolgte die Aufnahme der Zellen aus den Povitzky-Flaschen (s. 3.11.3.1.) in DMEM/FKS und die Aussaat dieser Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro Well. Nach dreitägiger Inkubation bei 37°C, 4,5% CO₂ und 91% Luftfeuchte war der Zellrasen in der Regel zu mindestens 80% geschlossen. Zum Nachweis von Virus in der Zellkultur wurde das Medium dekantiert und die einzelnen Wells mit jeweils 200 µl der zu untersuchenden Probe beschichtet (Proben in Doppelbestimmung). Zur Kontrolle erfolgte die Inokulation eines Wells mit *Alfort 187*-Suspension und eines weiteren Wells mit DMEM. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 2 h wurde das Probenmaterial entfernt, der Zellrasen einmal mit DMEM gespült und jedes Well mit 1 ml DMEM (inkl. 5% PNS, 100 I.E. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) überschichtet. Hieran schloss sich eine Inkubation der Platten für 72 h bei 37°C, 4,5% CO₂ und 91% Luftfeuchte an.

3.11.8.3. Titration von viruspositiven Vollblutproben und Infektionsvirus

Zur Bestimmung des Titers des jeweiligen Infektionsvirus bzw. des genauen Virustiters im Vollblut nach positivem Virusnachweis in der jeweiligen Probe wurden PK-15-Zellen analog der unter 3.11.8.2. beschriebenen Verfahrensweise in DMEM/FKS aufgenommen und 100 µl je Well in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach Anwachsen des Zellrasens wurde dieser mit 100 µl von log 10-Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-7} in DMEM) des entsprechenden Blutes bzw. der Virussuspension beschichtet (4 Well je Verdünnungsstufe; Positiv- und Negativkontrolle wie unter 3.11.9.2.). Nach 1 bis 2 h Inkubation wie oben beschrieben erfolgte die Zugabe von 100 µl DMEM (inkl. 5% PNS, 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) pro Well. Die 10^{-1} -Verdünnungen der Vollblutproben wurden wegen ihrer Zelltoxizität zunächst abgesaugt und die entsprechenden Wells anschließend mit 200 µl Medium überschichtet. Auch hier folgte eine Bebrütung für 72 h bei 37°C, 4,5% CO₂ und 91% Luftfeuchte.

3.11.8.4. Indirect Immunoperoxidase-linked Assay (IPLA)

Nach abgeschlossener Inkubation der unter 3.11.8.2. und 3.11.8.3. beschriebenen Zellkulturplatten wurde das Medium aus diesen entfernt und die Wells einmal mit einem Gemisch aus PBS⁻ und *A. dest.* (1:2) gespült. Nach Lufttrocknung schloss sich eine Hitzefixierung von 2 h bei 80°C an. Hierauf wurden die Platten (nach Abkühlung auf Raumtemperatur) entweder in Gefrierbeutel eingeschweißt und bei -20°C gelagert oder sofort weiterbearbeitet.

Nach einmaligem Anfeuchten des Zellrasens mit der oben beschriebenen Lösung wurde der KSPV-spezifische, gegen das Glykoprotein E2 gerichtete mAk HCTC 50/2/1 in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS⁻-Tween 20 auf die Zellen gegeben (24-Well-Platten: 200 µl je Well, 96-Well-Platten: 50 µl je Well). Einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS⁻-Tween 20 an, bevor 200 bzw. 50 µl anti-Maus-Peroxidase (POD)-Konjugat ebenfalls 1:1000 verdünnt in PBS⁻-Tween 20 einpipettiert wurden. Nach 1 h wurden die Wells dreimal mit PBS⁻-Tween 20 und einmal mit *A. dest.* gewaschen. Die hiernach auf die Zellen gegebene, frisch angesetzte Substratlösung setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen (für eine Zellkulturplatte): 2 mg AEC, 300 µl DMF, 5 ml Na-Azetatpuffer (pH 5,0). Unmittelbar vor der Anwendung wurden 2,5 µl 30%ige H₂O₂-Lösung zugegeben. Nach ca. 30 min Reaktionszeit bei 37°C wurde das Substrat abgegossen, die Wells nochmals mit *A. dest.* gespült und anschließend überschichtet.

Die Auswertung erfolgte am Auflichtmikroskop. Der Test war auswertbar, wenn die Infektionskontrolle Zellen mit der typischen rötlich-braunen Färbung des Zytoplasmas aufwies, in der Negativkontrolle aber keine gefärbten Zellen zu finden waren. Konnte in den mit Proben beimpften Wells mindestens eine spezifisch gefärbte Zelle ausgemacht werden, so wurde die Probe positiv bewertet.

Der Virustiter positiver Vollblutproben und von Infektionsvirus wurde nach Spearman und Kärber (Mayr *et al.*, 1974) an Hand folgender Formel berechnet:

$$\log 10 KID_{50} = (x_0 - d/2 + d(\sum r/n))$$

- x_0 log des reziproken Wertes der Verdünnung, bei der letztmalig alle beimpften Wells positiv sind
- d lg des Verdünnungsfaktors (bei 10-fach-Verdünnungen 1)
- r Anzahl der positiven Wells ab x_0
- n Zahl der Wells, die je Verdünnungsstufe beimpft wurden

3.11.9. Nachweis von KSPV mittels RT-PCR

Ausgewählte Proben, die sich in der Virusanzucht als negativ erwiesen, wurden mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von KSPV-RNA hin untersucht.

3.11.9.1. RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA aus Vollblutproben sowie Organanreibungen fand das QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) Anwendung. Dagegen wurden Organproben mit dem Rneasy Mini Kit (Qiagen) aufgearbeitet. Die RNA-Isolierung erfolgte entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben. Bei jedem Ansatz wurde eine antigenpositive Probe als Positivkontrolle sowie eine antigennegative Probe und *A. dest.* als Negativkontrollen mitgeführt.

3.11.9.2. RT-PCR

Die Grundlage der Methodik bildete ein Verfahren der PCR zum Nachweis von KSPV-RNA (Liu *et al.*, 1991). Als antisense-Primer (HCV-1) wurden die Nukleotide 1488-1469 (5'-CTTATCTGGAGGGCCTTCTG-3'), als sense-Primer (HCV-2) die Nukleotide 1189-1208 (5'-AGTGACAACGGCACTAATGG-3') des KSPV-Genoms verwendet.

Bei jedem PCR-Ansatz wurde zusätzlich eine PCR-positive RNA-Aufarbeitungsprobe als Positivkontrolle sowie *A. dest.* als Negativkontrolle mitgeführt. Alle Bearbeitungsschritte fanden auf Eis statt. 2,5 µl der jeweiligen RNA-Probe wurden zunächst mit 0,5 µl DMSO und 1,0 µl Primer HCV-1 versetzt, vorsichtig gemischt, abzentrifugiert und bei 98°C für 7 min denaturiert. Nach 2 min bei 42°C und einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden je Probe 3 µl 5 × RT-Puffer, 0,4 µl dNTP's, 7,15 µl DEPC-Wasser, 0,1 µl RNAsin und 0,35 µl reverse Transkriptase hinzugefügt, vorsichtig gemischt und zentrifugiert, wonach bei 42°C in 60 min die RT stattfand. Eine abschließende Erhitzung auf 98°C für 5 min diente der Zerstörung der verbliebenen RNA. Die Probe, die im positiven Falle nun die entsprechende KSPV-*copy-Desoxyribonucleic acid* (cDNA) enthielt, wurde wiederum kurz zentrifugiert, mit 2,1 µl MgCl₂, 3,5 µl 10 × Thermopuffer, 28,15 µl DEPC-Wasser, 1,0 µl HCV-2 und 0,25 µl Taq DNA Polymerase beschickt, gevortext und zentrifugiert und mit 35 µl Mineralöl bedeckt. Die nachfolgende DNA-Amplifikation begann mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 min, dem sich 30 Zyklen aus Denaturierung (95°C, 30 s), Primer-*Annealing* (55°C, 60 s) und Elongation (72°C, 60 s) anschlossen. Am Ende des Programms stand eine zusätzliche Elongationsphase von 2 min. Im Anschluss wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und entweder sofort auf ein Agarosegel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

3.11.9.3. Gelelektrophorese

Zum Nachweis amplifizierter DNA wurde ein 1,5%iges Agarosegel in 0,5 × TBE gegossen und je 10 µl des PCR-Produktes (1:6 gemischt mit 6 × Ladepuffer) aufgetragen. Als zusätzliche Positivkontrolle im Gel diente ein positives PCR-Produkt aus einer früheren PCR-Reaktion. Nach Auftrennung der Proben bei 60 V und 250 mA für 45 min wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel unter UV-Licht beurteilt. Beim Auftreten einer Bande in Höhe von 300 bp war die entsprechende Probe KSPV-positiv zu beurteilen.

3.11.9.4. nested-PCR (n-PCR)

Waren die in der PCR getesteten Proben negativ, so wurden deren Produkte einer zusätzlichen Amplifikation mit einem zweiten Primerpaar unterzogen (Liu *et al.*, 1991). Als sense-Primer (HCV-3) dienten die Nukleotide 1210-1229 (5'-ATTCAGCGAGCCATGTATCT-3'), als antisense-Primer (HCV-4) die Nukleotide 1448-1429 (5'-TTCATTA ACTGAATCCAAGG-3'). Als zusätzliche Positivkontrolle wurde ein n-PCR-positives PCR-Produkt aus einem früheren Ansatz mitgeführt. 1,8 µl MgCl₂, 3,5 µl 10 × Thermopuffer, 0,4 µl dNTP's, je 1 µl

HCV-3 und HCV-4, 0,25 µl Taq DNA Polymerase und 41,05 µl DEPC-Wasser je Probe wurden in einem 0,5 ml-Eppendorf-Röhrchen vorgelegt, 1 µl des fraglichen PCR-Produktes dazupipettiert, gevortext und abzentrifugiert und der Ansatz mit 50 µl Mineralöl bedeckt. Das Amplifikationsprogramm setzte sich aus einer initialen Denaturierungsphase (95°C, 3 min), 35 Zyklen aus Denaturierung (94°C, 30 s), Primer-*Annealing* (38°C, 30 s) und Elongation (72°C, 60 s) und einer abschließenden Elongationsphase (72°C, 7 min) zusammen, nach der die Produkte auf 4°C gekühlt wurden. Hiernach wurden die Proben entweder sofort auf ein Agarosegel aufgetragen (Positivkontrolle: ein positives n-PCR-Produkt aus einem früheren Ansatz) oder bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C gelagert.

3.11.10. Nachweis von KSPV im Knochenmarkausstrich mittels Indirektem

Immunfluoreszenz-Test (IIFT)

Die vorbereiteten Knochenmarkausstriche (s. 3.11.7.2.) wurden aufgetaut, einmal in PBS⁻ geschwenkt und luftgetrocknet. Mit Hilfe eines PAP-PEN wurde ein im Durchmesser ca. 2 cm großer Bereich des Ausstriches umrandet und mit 100 bis 200 µl des anti-E2-mAk HCTC 50/2/1 (1:1000 in PBS⁻) überschichtet. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger dreimal mit PBS⁻ gespült, luftgetrocknet und das umrandete Feld mit anti-Maus-FITC-Konjugat (1:50 in PBS⁻ + 0,001% Evans blue) bedeckt. Die überschichteten Präparate wurden wiederum 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, danach erfolgte ein kurzes Spülen in PBS⁻, ein Verweilen der Ausstriche für 10 min in einer Küvette mit PBS⁻ und ein zweimaliger Spülvorgang in *A. dest.* In noch mäßig feuchtem Zustand wurden die Ausstriche dann mit Glycerol-PBS⁻ (Verhältnis 1:10) überschichtet und eingedeckt. Als Positivkontrolle diente in jedem Ansatz der Ausstrich eines an KSP erkrankten und als Negativkontrolle der eines KSPV-freien Tieres. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, wobei Proben, die die typische brillantgrüne Zytoplasmafluoreszenz aufwiesen, als positiv bewertet wurden.

3.11.11. Nachweis von Antikörpern gegen KSPV

3.11.11.1. CHEKIT CSF-Sero-ELISA

Der CHEKIT CSF-Sero-ELISA dient dem Nachweis sämtlicher gegen das KSPV gerichteter Ak in einer Probe. Hierzu kamen die Serumproben der Versuchstiere zum Einsatz. Der Test wurde entsprechend den Vorschriften des Herstellers durchgeführt und die sich ergebenden Extinktionen am ELISA-Reader bestimmt (Auswertungssoftware: Magellan, Tecan).

3.11.11.2. Serumneutralisationstest (SNT)

Zur Untersuchung auf Ak im SNT kamen hitzeinaktivierte Seren zum Einsatz. Die Inaktivierung fand bei 56°C für 30 min im Wasserbad statt.

Mit dem SNT werden neutralisierende Ak detektiert. Zu diesem Zweck wurden in 96-Well-Zellkulturplatten log 2-Verdünnungsreihen der zu testenden Seren hergestellt, indem nach Vorlage von 50 µl DMEM pro Well in die Wells der obersten Reihe 50 µl des zu testenden Serums gegeben und nach gründlichem Mischen jeweils 50 µl in das darunter liegende Well überführt wurden (alle Proben in Doppelbestimmung). Nach Hinzufügen von 50 µl pro Well einer *Alfort 187*-Suspension, die stets 30 bis 300 KID₅₀ enthielt, betrug die Ausgangsverdünnung letztendlich 1:4. Auf einer zusätzlichen Kontrollplatte wurden ein Ak-positives und ein –negatives Serum als Positiv- und Negativkontrolle in gleicher Weise wie die zu testenden Seren, eine Rücktitration des Testvirus in log 10-Verdünnungsstufen sowie 3 Wells mit je 100 µl DMEM als spätere Zellkontrolle mitgeführt. 2 h Inkubationszeit bei 37°C schlossen sich an. Während dieser Zeit konnten Antigen-Ak-Reaktionen zwischen evtl. in den Serumproben vorhandenen neutralisierenden Ak gegen KSPV und den zugegebenen Virionen stattfinden, welche in diesem Fall nicht mehr für eine Infektion der später hinzugefügten Zellen zur Verfügung standen. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde aus einer im Labor an das Wachstum mit PNS adaptierten PK-15-Zelllinie eine Suspension mit $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in AZM ohne FKS unter Zugabe von 10% PNS hergestellt und von dieser 100 µl in jedes Well pipettiert. Nach dreitägiger Inkubation bei 37°C (4,5% CO₂ und 91% Luftfeuchte) war ein geschlossener Zellrasen entstanden, der, wie unter 3.11.8.4. beschrieben, hitzefixiert und im IPLA weiterbearbeitet wurde. Der Test war auswertbar, wenn sich aus der Rücktitration ein Virusgehalt in der Testsuspension von 30 bis 300 KID₅₀/100 µl ergab, das hier verwendete positive Kontrollserum einen Titer von etwa 1:32 aufwies und beim negativen Kontrollserum auch in der geringsten Serumverdünnung viruspositive Zellen zu diagnostizieren waren. Der Neutralisationstiter der Testseren wurde nach Behrens und Kaerber (Mayr *et al.*, 1977) wie folgt berechnet:

$$\text{Neutralisationstiter} = V - [d(S - 0,5)]$$

- V lg der ersten Serumverdünnung, bei der 100% aller beimpften Wells viruspositive Zellen aufweisen
- d lg des Verdünnungsfaktors (bei 2-fach-Verdünnungen 0,3)
- S Summierungsverhältnis (Summe aller Wells mit viruspositiven Zellen von 0% bis

100% viruspositive Wells/Anzahl der Wells je Verdünnungsstufe).

3.12. Laborexperimentelle Studien

3.12.1. Ein-Schritt-Wachstumskinetiken

Zur Feststellung eines möglichen Einflusses der Virulenz auf das Wachstumsverhalten in der Zellkultur wurden Ein-Schritt-Wachstumskinetiken verschiedener KSPV-Isolate erstellt.

3.12.1.1. KSPV-Stämme und –Feldisolate

Zum Einsatz kamen diverse Feldisolate vom Schwarzwild und – vergleichend – im Labor vorhandene KSPV-Stämme bekannter Virulenz. Bei den Feldisolaten handelte es sich um diejenigen, die auch in den verschiedenen Tierexperimenten eingesetzt wurden (Isolate 95/1279, E19/99 und E15/98) sowie um das Isolat *Spante*. Die Viren sind in Kapitel 3.2. beschrieben.

Die verwendeten Laborstämme sind ausnahmslos Viren, die schon seit mehreren Jahren bzw. Jahrzehnten nicht mehr im Feld isoliert werden konnten und dem phylogenetisch älteren Genotyp 1.1 angehören, während die aus aktuelleren Seuchengeschehen in Deutschland stammenden KSPV, so auch alle Feldisolate, zum Genotyp 2.3 zählen. Es wurden Laborstämme unterschiedlichen Virulenzgrades gewählt, um aus deren Verhalten *in vitro* durch vergleichende Betrachtung evtl. Rückschlüsse auf die Virulenz der untersuchten Feldisolate ziehen zu können. Aus der Literatur und Versuchen am FLI Insel Riems als hochvirulent bekannt ist der Stamm *Koslov* (Kaden und Lange, 2001; Kaden *et al.*, 2001), ebenso wird dem Stamm *Eystrup* eine hohe Virulenz nachgesagt (Mittelholzer *et al.*, 2000). *Alfort 187* wird in der Literatur zum Teil als moderat virulent (Dahle und Liess, 1995), zum Teil als hoch virulent beschrieben (Floegel-Niesmann *et al.*, 2003), in Versuchen am FLI Insel Riems zeichnete er sich ebenfalls durch hohe Virulenz aus (Kaden *et al.*, 1999a). Der Stamm *Glentorf* ist schwachvirulent (Dahle und Liess, 1995). Als avirulentes KSPV fand der in der o.I. eingesetzte Vakzinestamm *C* Verwendung.

Das Feldisolat *Spante* wurde im Tierversuch als schwachvirulent charakterisiert (Kaden *et al.*, 2000c).

Von sämtlichen Viren, mit Ausnahme des lapinisierten Vakzinestammes *C* (passagiert auf Zelllinie EFN-R), von dem die genaue Passagenzahl nicht bekannt war, wurden niedrige

Passagen (4. bis 12. Passage auf PK-15) verwendet. Die Herstellung der benötigten Virussuspensionen erfolgte wie unter 3.11.3.2. beschrieben.

3.12.1.2. Zellen

Die zur Erstellung der Kinetiken genutzten PK-15-Zellen wurden wie unter 3.11.3.1. beschrieben aus Povitzky-Flaschen abgelöst und jeweils 5 ml AZM mit einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/ml in 12,5 cm²-Polystyren-Zellkulturflaschen (T12,5) ausgesät. Nach einer Inkubation von 72 h bei 37°C hatte sich ein geschlossener Zellrasen gebildet, der aus ca. 2×10^6 PK-15-Zellen bestand, was durch mehrmaliges Zählen der Zellen aus verschiedenen Ansätzen und Bildung des Mittelwertes bestimmt wurde. Die im Labor verwendeten Zellen lagen zwischen der 40. und der 70. Zellpassage.

3.12.1.3. Versuchsansatz und Probenahme

Die verwendeten Virussuspensionen wurden zunächst in LEM so vorverdünnt, dass sie 1×10^6 KID₅₀/ml enthielten. Nach Abgießen des AZM aus den T12,5 wurden diese jeweils mit 2 ml der entsprechenden Virussuspension beimpft. Das entsprach einer Virusmenge von 2×10^6 KID₅₀ und damit einer *multiplicity of infection (m.o.i.)* von 1 (jedes Viruspartikel hat die theoretische Chance, genau eine Zelle zu infizieren). Eine Inkubationszeit von 1 h bei 4°C schloss sich an, nach der das Inokulum abgegossen, der Zellrasen jeder Flasche einmal mit LEM gespült und dann mit 5 ml LEM unter Zusatz von 5% PNS, 100 I.E. Penicillin pro ml und 100 µg Streptomycin pro ml überschichtet wurde. Die Inkubationstemperatur von 4°C wurde gewählt um sicherzustellen, dass während dieser Phase noch keine Virusreplikation, sondern lediglich der Eintritt der Virionen in die Zellen stattfinden konnte. Der Start der synchronen Virusvermehrung erfolgte nach dem Überschichten durch den Beginn der Inkubation der Zellkulturflaschen bei 37°C.

Alle Experimente wurden in 3 unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Proben des Zellkulturüberstandes (ZKÜ) zur Titration des zellfreien Virus und virusinfizierter Zellmonolayer (ZK) zur Titration des zellgebundenen Virus wurden 0, 2, 4, 6, 10, 14, 24, 30, und 48 h nach Beginn der Virusvermehrung gewonnen.

Dazu wurde je Virusstamm eine T12,5 entnommen, das die freigesetzten Virionen enthaltende LEM in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert und der Zellrasen einmal mit sterilem PBS⁻ gespült. Danach erfolgte das Überschichten des Zellrasens mit sterilem PBS⁻ und der Aufschluss der Zellen durch Einfrieren (-20°C). Bei dieser Temperatur verblieben die

Zellkulturflaschen bis zur weiteren Bearbeitung. Die abgenommenen ZKÜ wurden zunächst bei $310 \times g$ und 4°C für 10 min zentrifugiert, um etwaigen Zelldetritus zu entfernen und im Anschluss in Nalgene-Kryoröhrchen überführt und ebenfalls bei -20°C gelagert.

3.12.1.4. Ermittlung der Virustiter

Die Zellkulturen mit PBS⁻ wurden nach dem Auftauen nochmals gefriergetaut, 15 s im Eisbad ultrabeschallt (7 W), um einen möglichst vollständigen Zellaufschluss und die Lösung der Viruspartikel von den Zellresten zu erzielen. Danach wurde der Zelldetritus bei $310 \times g$ und 4°C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand in ein Nalgene-Kryoröhrchen überführt.

Die ZKÜ wurden zur Bestimmung des Virustiters aufgetaut.

Die Titration der Proben fand wie unter 3.11.8.3. beschrieben in log 10-Verdünnungen in 96-Well-Zellkulturplatten auf PK-15-Zellkulturen statt. Nach Bebrütung und Fixation der Platten schloss sich auch hier der IPLA an, und die Virustiter wurden nach Spearman und Kaerber berechnet.

3.12.1.5. Auswertung

3.12.1.5.1. *Index aus zellfreiem und zellgebundenem Virustiter*

Zur Auswertung der erstellten Titerkurven wurde v. a. die von Mittelholzer *et al.* (2000) beschriebene Methodik herangezogen. Hierbei erfolgte ab dem Zeitpunkt der ersten Detektion von neusynthetisiertem Virus, was bei den hier vorgestellten Versuchen 10 h *p.i.* der Fall war, die Bildung des Mittelwertes aus den log 10 KID₅₀ aller zu den folgenden Probenahmezeitpunkten ermittelten Titer. Dieses Verfahren fand für in der ZK und im ZKÜ titriertes Virus getrennt statt. Nach der Formel

$$\log 10 \text{ KID}_{50} (\text{Mittelwert Virustiter ZF}) - \log 10 \text{ KID}_{50} (\text{Mittelwert Virustiter ZB})$$

ZF zellfreies Virus

ZB zellgebundenes Virus

ergab sich ein Index, durch dessen Vergleich mit dem der anderen Virusisolate laut Mittelholzer *et al.* (2000) Rückschlüsse auf die Virulenz der eingesetzten Viren möglich sind. Bestimmung und Vergleich der Differenzen der log 10 KID₅₀ in ZKÜ und ZK zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten erfolgten in analoger Weise.

3.12.1.5.2. *Statistische Auswertung*

Um zu überprüfen, ob die Indices aus den mittleren Virustitern bzw. die zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten ermittelten Titerverhältnisse sich voneinander signifikant unterscheiden, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. Die Durchführung des multiplen Vergleichs der einzelnen Indices und Titerverhältnisse erfolgte unter Heranziehung des Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Testes (Littell *et al.*, 1996; Westfall *et al.*, 1999).

3.12.1.5.3. *Darstellung der Wachstumskurven in der Ersten Ableitung*

Eine weitere zur Auswertung verwendete Methode war die Bestimmung der Wachstumsrate zwischen den Probenahmezeitpunkten. Zur Bestimmung der Wachstumsrate bedient man sich der ersten Ableitung einer Wachstumsfunktion. Die Ableitung misst Veränderungen von Größen. Ist sie größer bzw. kleiner als 0, so ist die betrachtete Größe zum Zeitpunkt t im Begriff zu wachsen bzw. zu fallen (Feldmann, 1979).

Im konkreten Fall wurde die Wachstumsrate des Virustiters pro Stunde zum Probenahmezeitpunkt i nach der folgenden Formel berechnet:

$$(ZB_{i+1}-ZB_i)/(t_{i+1}-t_i) \text{ bzw. } (ZF_{i+1}-ZF_i)/(t_{i+1}-t_i) \quad i \in Z$$

ZB Titer des zellgebundenen Virus

ZF Titer des zellfreien Virus

i Probenahme

i+1 nach i folgende Probenahme

t Zeitpunkt der Probenahme (in h p.i.).

3.12.2. **Expressionskinetiken des Glykoproteins E2**

Begleitend zu den Ein-Schritt-Wachstumskinetiken wurde der zeitliche Verlauf der Expression des Hüllglykoproteins E2 in Bezug auf mögliche Unterschiede zwischen den getesteten KSPV-Isolaten untersucht.

3.12.2.1. KSPV-Stämme und –Feldisolate

Für die hier beschriebenen Experimente wurden die gleichen KSPV-Stämme und –Feldisolate im oben angegebenen Passagenbereich verwandt wie unter 3.12.1.1. beschrieben.

3.12.2.2. Virusvermehrung und Herstellung von Zelllysate

Die Vermehrung von Virus zur Gewinnung von Virusprotein fand zeitgleich mit den Versuchen zur Erstellung der Wachstumskinetiken und nach gleicher Vorgehensweise statt (s. unter 3.12.1.3.). Zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten wurde jedoch hierfür der ZKÜ aus jeweils einer T12,5 verworfen, der Zellrasen einmal mit PBS⁻ gespült und dann mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden nach Aufnahme in ca. 1 ml PBS⁻ in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 60 × g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden dem Zellpellet 300 µl Lysepuffer zugesetzt, die so entstandene Suspension einmal kräftig gevortext und danach für 30 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Nun erfolgte die Zentrifugation der lysierten Zellen bei 14000 × g und 4°C für 10 min. Danach wurde der die vormals in den Zellen befindlichen Proteine enthaltende Überstand in ein neues Röhrchen überführt und bis zur weiteren Analyse bei -70°C gelagert.

3.12.2.3. Proteinbestimmung

Um den Einsatz gleicher Proteinmengen bei der Untersuchung des E2-Gehaltes der Zelllysate zu gewährleisten, mussten sämtliche Lysate einer Proteinbestimmung unterzogen werden. Diese fand unter Verwendung des BC Assay Protein Quantitation Kit der Firma Uptima statt. Der Test wurde gemäß den Herstellerangaben in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. An Hand der geringsten gemessenen Proteinkonzentration wurden alle anderen Proben in den nun folgenden Untersuchungen mit Lysepuffer verdünnt, so dass von vergleichbaren Gesamtproteinmengen in den einzelnen Experimenten ausgegangen werden konnte.

3.12.2.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Im PAGE-Gel werden die in einer Probe enthaltenen Proteine mit Hilfe eines angelegten elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt. Für die hier beschriebenen Versuche wurden Gele von 1,5 mm Dicke und mit 10%iger Acrylamidkonzentration verwendet. Jedes Gel bestand aus einem Sammel- und einem Trenngel, die wie folgt zusammengesetzt waren (Zutaten für jeweils 2 Gele):

Trenngel: 6,0 ml *A. bidest.*, 3,33 ml PAGE-Puffer (für Trenngele),
4,44 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%ig)

Sammelgel: 3,05 ml *A. bidest.*, 1,25 ml PAGE-Puffer (für Sammelgele),
0,85 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%ig)

Beide Mischungen wurden ca. 10 min unter Anlegen eines Vakuums entgast und nach Zugabe von 75 µl APS und 15 µl TEMED zunächst das Trenngel zwischen die zuvor mit Methanol entfetteten Glasplatten der Gießapparatur pipettiert. Die Übersichtung mit *A. bidest.* verhinderte das Austrocknen des Gels und garantierte die Bildung einer geraden Geloberkante. Nach ca. 45 min war das Gel polymerisiert, das *A. bidest.* konnte abgegossen und das Sammelgel aufgefüllt werden (zuvor Zugabe von 25 µl APS und 5 µl TEMED). Zur Formung der Slots für das spätere Einpipettieren der Proben wurde ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel eingeführt. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Kamm gezogen, die Slots mit *A. bidest.* gespült und beide Gele in die PAGE-Kammer eingestellt, die danach mit Laufpuffer gefüllt wurde.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte zwischenzeitlich wie folgt: Die entsprechend ihrer Proteinausgangsmenge auf eine für alle Analysen einheitliche Endkonzentration von 700 µg Protein pro ml verdünnten Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit 4 x-Ladepuffer versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Ein Zentrifugationsschritt bei 11800 × g und 4°C für 10 min schloss sich an. Als Kontrollen dienten das Zelllysat einer mit *Alfort 187* infizierten PK-15-Kultur 48 h *p.i.* (Positivkontrolle) und das Lysat einer nichtinfizierten PK-15-Kultur (Negativkontrolle). Beide wurden analog den Proben einer Proteinbestimmung unterzogen (s. 3.12.2.3.), portioniert bei -70°C gelagert und zu jeder durchgeführten PAGE jeweils ein frisches Aliquot aufgetaut und mit aufgearbeitet.

Proben und Kontrollen wurden zu je 20 µl in einen Slot des Gels geladen und die Proteine bei 200 V und 250 mA im elektrischen Feld aufgetrennt, bis die Ladepufferfront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

3.12.2.5. Western Blot

Beim Western Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran (Material in der Regel Nitrozellulose) übertragen (geblottet) und so immobilisiert mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Zu diesem Zweck wurden die fertigen PAGE-Gele mit den aufgetrennten Proben aus der PAGE-Kammer entnommen und für einige Minuten in Transferpuffer gelegt. Gleiches geschah mit Nitrozellulosemembranen entsprechend der Anzahl und Größe der zu blottenden Gele. Die Kontaktflächen der Transferzelle, in der der Western Blot stattfand, wurden mit Transferpuffer benetzt und in Transferpuffer getränkte Stücke Blot-Papier auf die untere Kontaktfläche unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Hierauf wurden Nitrozellulosemembranen und Gele (in dieser Reihenfolge) platziert. Den Abschluss bildete

ein Stück Blot-Papier, bevor der Deckel der Transferzelle aufgesetzt wurde. Nun erfolgte bei 20 V und 25 mA in 2 h die Übertragung der Proteine auf die Membran. Nach Ende dieser Zeitspanne wurden die Nitrozellulosemembranen zunächst für mindestens 1 h in einer Lösung aus 5% Magermilchpulver und 3% humanem Serumalbumin in TBS-Tween 20 unter Schwenken geblockt, um etwaige Stellen, an denen der Antikörper später unspezifisch binden könnte, abzudecken. Nach mehreren Waschschritten in TBS-Tween 20 (zweimal kurz, einmal 15 min, zweimal 5 min unter Schwenken) erfolgte das Verbringen der Membranen in eine Verdünnung des anti-Glykoprotein E2-mAk HCTC 50/2/1 (1:500 in TBS-Tween unter Zusatz von 10% der oben beschriebenen Blockierungslösung). Eine Inkubation bei 4°C über Nacht schloss sich an. Danach wurden die Membranen wie oben beschrieben gewaschen und in anti-Maus-POD-Konjugat (Verdünnung 1:10000 in TBS-Tween 20) gelegt, wo sie für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken verblieben. Nach einem letzten Waschschriff, wie oben beschrieben, wurden die Membranen auf Zellstoff abgetupft, um einen Großteil der Flüssigkeit zu entfernen und anschließend für 5 min unter Schwenken im Chemilumineszenzsubstrat inkubiert. Nach erneutem Abtupfen wurden die Membranen schließlich zwischen 2 Plastikfolien gelegt. Die Detektion der Ak-Bindung fand durch Aufnahme der Membranen mit einer CCD-Kamera (*Night Owl*) für 30 min und im Anschluss durch Auflegen eines Röntgenfilmes für ca. 2 h statt.

3.12.2.6. Auswertung mit der Night Owl

Die Aufnahme und Auswertung der Blots erfolgte mit Hilfe der *WinLight*-Software (EG & G Berthold). Zur Auswertung wurde hierbei jede sichtbare Bande in Höhe des Glykoproteins E2 (53 kD) bzw. die entsprechende Zone in den Slots, in denen keine Bande sichtbar war (Proben wenige Stunden nach Infektion und Negativkontrolle) durch ein in allen Proben gleich großes Rechteck umgrenzt. Die während der Aufnahmezeit von 30 min in diesem Bereich gemessenen Lumineszenzsignale wurden quantitativ erfasst. Der Zahlenwert der kein Glykoprotein E2 enthaltenden Negativkontrolle wurde von allen gemessenen Werten subtrahiert und der Wert der bei jedem Blot mit gleicher E2-Konzentration ausgestatteten Positivkontrolle gleich 100% gesetzt. An Hand dessen konnten die in den Proben gemessenen Lumineszenzintensitäten und damit die E2-Gehalte quantifiziert und miteinander verglichen werden.

3.12.3. Vergleich von Plaquegrößen

Da im Ergebnis von Untersuchungen in der Vergangenheit ein möglicher Zusammenhang zwischen der Virulenz eines KSPV-Stammes *in vivo* und seiner Fähigkeit zur Bildung verschieden großer Plaques infizierter Zellen *in vitro* postuliert wurde (Aynaud, 1969; Aynaud *et al.*, 1972), fanden die im Folgenden beschriebenen Experimente zur Überprüfung dieser Aussage für die hier verwendeten Isolate statt.

3.12.3.1. KSPV-Stämme und –Feldisolate

Es kamen die auch bei der Erstellung der Wachstums- und E2-Expressionskinetiken gewählten Virusisolate zum Einsatz (s. 3.12.1.1.). Zusätzlich wurde der Stamm *Bergen*, ein in der laboreigenen Stammsammlung vorhandener Stamm mit schwachen Virulenzeigenschaften im Tier, der zu den KSPV vom Genotyp 2.2. gehört, hinzugezogen.

3.12.3.2. Virusanzucht zur Plaquegrößenbestimmung

Die Virusanzucht fand in 24-Well-Zellkulturplatten auf 72 h alten PK-15-Kulturen statt (Anlegen der Platten s. 3.11.8.2.). Um die Zellen mit einer nach Möglichkeit standardisierten Virusdosis beimpfen zu können, wurde zunächst durch Zählen der Zellen mehrerer Wells aus zu verschiedenen Zeitpunkten angelegten Platten die mittlere Zellzahl bestimmt. Sie betrug 2×10^5 Zellen pro Well. Die jeweils verwendeten Virussuspensionen wurden nun ihrem Ausgangstiter entsprechend in DMEM so vorverdünnt, dass sie 4×10^4 KID₅₀/ml enthielten. Herstellung und Titerbestimmung der Virussuspensionen erfolgten nach dem unter 3.11.3.2. beschriebenen Procedere. Eine weitere Verdünnung erfolgte in log 2-Schritten in Zentrifugenröhrchen (jeweils 2 ml Virussuspension und 2 ml DMEM) in der Regel bis zu einer Verdünnung von 1:8. Mit je 500 µl der so eingestellten Suspensionen wurden nach Abgießen des DMEM/FKS aus den Platten 2 Wells pro Virusstamm beimpft. Das entsprach in der Ausgangsverdünnung einer *m.o.i.* von 0,1 (1 Viruspartikel auf 10 empfängliche Zellen). Nach einer Inkubationsphase von 1 bis 2 h (37°C, 4,5% CO₂, 91% Luftfeuchte) wurden die Inokula vom Zellrasen abgesaugt, dieser einmal mit DMEM gespült und mit DMEM unter Zusatz von 5% PNS, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1 ml je Well) überschichtet. Eine Inkubationsphase von 2 h unter den oben genannten Bedingungen schloss sich an. Danach wurde ein in einem früheren Tierversuch (Kaden, persönliche Mitteilung) hergestelltes Hyperimmunserum gegen KSPV in einer Verdünnung von 1:25 dem Medium in den Zellkulturplatten zugesetzt, um die Infektion von Zellen über in den Überstand

abgegebenes Virus zu verhindern. Somit war nur eine Ausbreitung des Virus durch direkte Infektion benachbarter Zellen möglich (Danner und Bachmann, 1970). Bei einigen Ansätzen wurden auch Wells ohne Hyperimmunserumzusatz mitgeführt, um das Muster der Zellinfektion unter beiden Voraussetzungen vergleichen zu können. Nach 72 h Inkubationszeit bei 37°C, 4,5% CO₂ und 91% Luftfeuchte erfolgte die Fixation der Platten und im Anschluss der IPLA wie unter 3.11.8.4. beschrieben. Für jedes Virusisolat wurden mindestens 2 solcher Ansätze unabhängig voneinander durchgeführt.

3.12.3.3. Plaquemessung und Auswertung

Nach vollendetem IPLA erfolgte die Zählung der Plaques pro Well im Auflichtmikroskop. In Wells, in denen 50 bis 100 Plaques sichtbar waren, wurde der Durchmesser von jeweils 50 Plaques, ausgewählt nach dem Zufallsprinzip, mit Hilfe von Messokularen bestimmt. Die 50 Werte jedes ausgemessenen Wells wurden gemittelt und aus den Mittelwerten aller auswertbaren Wells (mindestens 3 Wells pro Virusisolat) wiederum der Mittelwert gebildet. Zur Vergleichbarkeit der Plaquegrößen der einzelnen Isolate wurde die mittlere Plaquegröße von *Alfort 187* als Referenzstamm auf 100% festgelegt und die Werte aller anderen verwendeten Stämme im Verhältnis dazu prozentual angegeben.