

6 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Integration von Nukleotidsequenzen des Retikuloendotheliose-Provirus in das Genom des Hühnerpocken-Virus

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit waren umfangreiche molekularbiologische Untersuchungen an Hühnerpocken (FPV)-DNAs aus Feldausbrüchen der letzten Jahre, um festzustellen, in welchem Umfang REV-Nukleotidsequenzen in das Genom integriert vorlagen. Dazu wurde eine Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis des 4b-Core-Proteins des FPV, der gag-, pol- und env-Gene des REV sowie der long terminal repeats (LTR) des Retikuloendotheliose-Virus (REV) etabliert. In fast allen untersuchten Feld-DNAs konnten alle vier REV-spezifischen Sequenzbereiche und zusätzlich ein chimäres FPV-REV-PCR-Produkt nachgewiesen werden, was für ein Vorliegen eines in das FPV-Genom integrierten fast vollständigen REV-Provirus (fvRP) spricht. Mittels Long-Distance-PCR wurde bei drei Feld-DNAs versucht, dies zu bestätigen. Der Nachweis war mit FPV-spezifischen Primern, die die Integrationsstelle des fvRP umfassen, nicht möglich, sondern nur mit REV-LTR-spezifischen Primern. Durch die sich an die Long-Distance-PCR von LTR zu LTR anschließende Restriktionsenzymanalyse wurde gezeigt, daß das Amplikon dem REV-Provirus entsprach. Ferner wurden die Integrationsstelle des fvRP einer Feld-DNA und des Vakzinestammes HP B sowie das FPV- und REV-Sequenzen umfassende chimäre PCR-Produkt der Feld-DNA sequenziert. So konnte auch in dem Vakzinestamm ein ca. 300bp großer Überrest der LTR nachgewiesen werden. Der Vergleich aller drei erhaltenen Sequenzen mit entsprechenden veröffentlichten Sequenzen zeigte lediglich eine Punktmutation. Insgesamt konnte eine hohe Konserviertheit der Sequenzen bei Stämmen aus drei Kontinenten festgestellt werden.

Zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen FPV-spezifischer DNA und REV-provirusspezifischer DNA in einigen Feld-DNAs und in verschiedenen *in vitro*-Passagen eines Feldisolates wurde eine qPCR etabliert. Bei allen untersuchten Feld-DNAs lag die Subpopulation von FPV-Virionen mit integriertem fvRP in großer Überzahl vor. Die Untersuchung verschiedener *in vitro*-Passagen zeigte einen annähernd exponentiellen Verlust des fvRP mit einer Verlustrate von ca. 0,5 (50 %) zwischen dem Originalmaterial und der 16. Passage. Nach 32 Passagen war mittels PCR keine REV-spezifische DNA mehr nachweisbar.

Des weiteren wurden ausführliche serologische Untersuchungen von Feldseren auf das Vorkommen von Antikörpern gegen FPV sowie REV durchgeführt. Da kein kommerzieller ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV zur Verfügung stand, wurde ein indirekter ELISA entwickelt. Die Sensitivität betrug 85,3 %, die Spezifität 100 %. Anschließend wurde

die Wiederholbarkeit der im ELISA erzielten Ergebnisse untersucht. Der Intraassay-Vergleich zeigte eine gute Wiederholbarkeit. Dagegen brachte der Interassay-Vergleich unbefriedigende Ergebnisse. Beim Vergleich mit anderen Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV erwies sich der indirekte Immunfluoreszenztest als geringfügig sensitiver als der ELISA. Der AGP stellte sich als weniger sensitiv heraus.

Die Untersuchung von Seren aus an FPV erkrankten Herden auf Antikörper gegen FPV und REV zeigte bei etwa der Hälfte der Tiere Antikörper gegen FPV und bei einem größeren Anteil der Tiere Antikörper gegen REV, wobei zwischen den Herden z. T. deutliche Unterschiede auftraten. Ein vergleichbarer Anteil von Seren aus gegen FPV geimpften Herden hatte Antikörper gegen FPV, aber nur in zwei der zehn untersuchten Herden hatten Tiere Antikörper gegen REV. Dies macht deutlich, daß die Bildung von REV-Antikörpern von dem integrierten fvRP und nicht durch eine zufällige, gleichzeitige Infektion mit REV induziert wurden, und daß die Fähigkeit, Antikörper gegen REV zu induzieren, bei deutschen FPV-Feldstämmen weit verbreitet ist.

In zwei Infektionsversuchen wurde die Antikörperbildung gegen FPV und REV nach Infektion mit unterschiedlichen Zellkulturpassagen eines FPV-Feldisolats und dem Vakzinestamm HP B untersucht. In beiden Versuchen induzierte das Feldisolat in einer niedrigen Passage, in der das fvRP noch mittels PCR nachweisbar war, nach intrakutaner Infektion keine Antikörper gegen FPV, aber, abhängig von der Infektionsdosis, bei einem unterschiedlich hohen Anteil der Tiere Antikörper gegen REV. Dagegen induzierte der Vakzinestamm, unabhängig von der Infektionsdosis, bei fast allen Tieren Antikörper gegen FPV, aber keine gegen REV. Das Feldisolat in einer hohen Passage, in der das fvRP mittels PCR nicht mehr nachweisbar war, induzierte bei einem geringen Anteil der Tiere Antikörper gegen FPV und keine gegen REV. Deswegen wurde vermutet, daß das integrierte fvRP zur Hemmung der Antikörperbildung gegen FPV nach einer Infektion mit einem Feldisolat beiträgt. Im ersten Versuch wurden die Tiere nach fünf Wochen intravenös mit der niedrigen Passage des Feldisolates reinfiziert. Daraufhin entwickelte etwa die Hälfte der Tiere aus den Gruppen, die zunächst auch das Feldisolat erhalten hatten, Antikörper gegen FPV. Der Anteil der Tiere mit Antikörpern gegen REV erhöhte sich geringgradig. Bei den Tieren, die zuvor vakziniert worden waren, war keine Antikörperreaktion gegen REV feststellbar. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß durch die vorangegangene Immunisierung mit dem Vakzinestamm eine Replikation des FPV-Feldstammes und somit eine Bildung von Antikörpern gegen REV verhindert wurden. Nach der intrakutanen Infektion mit der niedrigen Passage des Feldisolates und nach der intravenösen Reinfektion ließ sich in den peripheren Blut-mononukleären Zellen REV-spezifische DNA, aber bis auf eine Ausnahme, keine FPV-spezifische DNA nachweisen. Dies deutet auf eine Bildung infektiösen REVs aus dem FPV-Feldisolat mit dem integrierten fvRP hin.