

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Zelllinien

Es wurde mit den Schweinenierenzelllinien PK15 (40.-80. Passage) und EFN-R sowie den Wiederkäuerzelllinien MDBK und SFT-R aus der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI) der Insel Riems gearbeitet. Diese permanenten Zelllinien sind im Linienpass der Zellbank folgendermaßen charakterisiert:

#### **PK15**

- porcine kidney 15;
- Herkunft: unbekannt, Zelllinie seit 25 Jahren am FLI Insel Riems, Anzucht verschiedener Sublinien in der Zellbank;
- Anzahl der Subkultivierungen unbekannt;
- Zellpassagen antibiotikafrei;
- Umsatzrate 1:6 bis 1:15;
- Kulturmedium 5;
- Wachstumscharakteristika: klare, regelmäßige, polygonale Zellen in gut begrenzten Kolonien wachsend, Monolayer bei Umsatzrate von 1:6 nach 72 h konfluent;
- Morphologie: epitheloid.

#### **EFN-R**

- embryonale Ferkelnierenzelle-Riebe;
- Herkunft: Etablierung aus Nieren zweier Feten in der Zellbank;
- Zellpassagen antibiotikafrei;
- Umsatzrate: 1:6 bis 1:10;
- Kulturmedium 5;
- Wachstumscharakteristika: klare, polygonale Zellen in gut begrenzten Kolonien wachsend, Monolayer bei Umsatzrate von 1:10 nach drei bis vier Tagen konfluent;
- Morphologie: epitheloid.

## **MDBK**

- Madin Darby bovine kidney;
- Herkunft: Rindernierenzelle;
- Zellpassagen antibiotikafrei;
- Umsatzrate: 1:4 bis 1:6;
- Kulturmedium 5;
- Wachstumscharakteristika: sehr klare, regelmäßige, polygonale Zellen, einzeln und in Kolonien wachsend, Monolayer bei Umsatzrate von 1:6 nach 72-96 h konfluent;
- Morphologie: epitheloid.

## **SFT-R**

- sheep fetal thymus-Riebe;
- Herkunft: Thymus eines Bocklammes, neugeboren (Alter: 8 h), ohne Kolostrumaufnahme;
- Zellpassagen antibiotikafrei;
- Umsatzrate: 1:2 bis 1:4;
- Kulturmedium 21;
- Wachstumscharakteristika: klare, polymorphe bis polygonale Zelle, flächenhaft einzeln und mäßig orientiert wachsend, regelmäßiges Gesamtzellbild, Monolayer bei Umsatzrate von 1:3 nach 56-72 h konfluent;
- Morphologie: epitheloid-polymorph.

### **3.1.2. Virusstämme**

#### **Alfort 187**

Herkunft: EU-Referenzlabor für KSP im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Ausgangspassage unbekannt.

Das KSPV „Alfort 187“ wurde als Positivkontrolle im Rahmen des Virusnachweises in der Zellkultur (ZK) verwandt. Hierbei handelte es sich um den Zellkulturüberstand der 10. PK15 Subpassage.

Das Virus wurde weiterhin als Schüttelblut, von einem 7 dpi getöteten Schwein stammend, im Tierversuch verwandt (TV 24/04 und TV 6/05).

## **Koslov**

Herkunft: Bioveta Terečín (ehemalige ČSSR)

Der hoch virulente KSPV-Stamm „Koslov“, der für die Tierexperimente (TV 30/05 und 16/06) als Challengevirus Verwendung fand, stammt aus dem Tierversuch 17/05. Es handelt sich um Schüttelblut, welches von infizierten Schweinen nach sechs bis sieben Tage pi gewonnen wurde.

## **„C“-Virus**

Herkunft: RIAM

Hierbei handelt es sich um ein attenuiertes KSPV, welches früher durch eine Vielzahl von Kaninchenpassagen abgeschwächt worden ist und nunmehr in permanenten fetalen Schweinenierenzellkulturen (EFN-R-Zelle) in Rollerflaschen vermehrt wird. Es ist Grundlage für die Riemser Schweinepestoralvakzine.

## **CP7\_E2alf**

Herkunft: FLI, Institut für Molekularbiologie(IMB) und Institut für Virusdiagnostik (IVD)

Diese Chimäre besteht aus dem infektiösen cDNA-Klon CP7 des BVDV in dem das E2-Gen deletiert und durch das homologe Gen vom KSPV „Alfort 187“ ersetzt wurde.

## **CP7\_E1E2alf**

Herkunft: FLI, Institut für Molekularbiologie (IMB) und Institut für Virusdiagnostik (IVD)

Diese Chimäre basiert ebenfalls auf dem BVD-Virus und stellt eine Weiterentwicklung von CP7\_E2alf dar, bei dem zusätzlich zum E2-Austausch das Gen des Hüllproteins E1 des BVDV durch das homologe Gen des KSPV „Alfort“ ausgetauscht wurde.

### **3.1.3. Anzucht- (AZM) und Erhaltungsmedien (EM) für die Zellkultivierung**

*Zellmedium 5*

AZM, bestehend aus 1 Teil Eagle's Minimum  
Essential Medium mit Hanks-Salzen und 1 Teil

Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle-Salzen plus 10% fetales Kälberserum (FKS);  
Verwendung beim Splitten und Umsetzen in Zellkulturflaschen (PK15, EFN-R, MDBK).

*Zellmedium 9*

AZM aus Dulbecco's Minimum Essential Medium mit Earle-Salzen plus 10% FKS zur Kultivierung von Zellen in Platten.

*Zellmedium 9C*

AZM, zusammengesetzt aus Dulbecco's Minimum Essential Medium mit Earle-Salzen und 5% FKS;  
Verwendung beim BDV-Neutralisationstest.

*Zellmedium 9D*

EM auf der Grundlage von Zellmedium 9, ohne Serum-Zusatz;  
eingesetzt zum Überschichten von Platten, bei der VI, bei Titrationen und im Virusneutralisationstest (VNT).

*Zellmedium 12*

Leibovitz-EM mit 3 Teilen Hanks-Salzen und 1 Teil L<sub>15</sub>-Medium ohne Serum;  
zur Aufnahme von Tupferproben, aber auch zum Überschichten von Viruspassagen auf Flaschen.

*Zellmedium 21*

AZM bestehend aus Hank's Minimum Essential Medium versetzt mit NaHCO<sub>3</sub>, Hanks-Salzen und 10% FKS;  
Medium für die Anzucht der Zelllinie SFT-R.

Werden ZB 12 und 9D als EM für Zellen in Flaschen (Zellmedium 12) und auf Platten (Zellmedium 9D) eingesetzt, wird jeweils 5% Pferdeserum (PS) substituiert.

### Versen-Trypsin-Lösung

0,125%	Trypsin
0,025%	EDTA
0,4%	NaCl
0,01%	KCl
0,01%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,057%	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O

Steril filtrieren und bei -20°C lagern.

### **3.1.4. Antikörper und Konjugate**

monoklonaler Ak (mAk) HCTC 50/2/1	(Dr. Köllner, FLI)
mAk C 16/ 1/2	(Prof. Greiser-Wilke, Hannover)
mAk WS 433	(Weybridge, Veterinary Laboratories Agency)
anti-Maus-IgG- und IgM-Konjugat (Ziege)	(Pierce)
polyklonales Ziegen anti-Maus-Ig-Konjugat FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiert	(DakoCytomation)

### **3.1.5. Chemikalien und Testkits**

für die PCR:

DEPC-(Diethyl-Pyrocbonat) Wasser	(Amersham Life Science)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	(Roth)
UTR51/53 Primer	(Biotech)
UTR51n/UTR53n Primer	(Biotech)
HCV 1/2 Primer	(Invitrogen)
HCV 3/4 Primer	(Invitrogen)
RNasin	(Promega)
Reverse Transkriptase (RT)	(Promega)

RT-Puffer	(Promega)
dNTP's	(Promega)
MgCl <sub>2</sub>	(Promega)
Puffer	(Promega)
Taq-Polymerase	(Promega)
Mineralöl	(Sigma)

für die RNA-Aufarbeitung:

Organe	RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit 50 (Qiagen)
Serum, VB	QIAamp <sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit 50 (Qiagen) und NucleoSpin <sup>®</sup> Multi-96 Virus (Macherey-Nagel)
Tupferproben	High Pure Viral RNA Kit (Roche) und NucleoSpin <sup>®</sup> Multi-96 Virus (Macherey-Nagel)
DEPC-Wasser	(Amersham Life Science)
Mercaptoethanol	(Serva)
70% Ethanol	(Roth)
100% Ethanol	(Roth)

für die Gelelektrophorese:

Agarose	(Invitrogen)
Ethidiumbromid	(Gibco)
Marker	(Promega)
Ladepuffer	(Promega)

für die Real-Time PCR:

QuantiTECT <sup>™</sup> Probe RT-PCR Kit	(Qiagen)
Interne Kontrolle (IC2)	(Dr. Hoffmann, FLI)
EGFP-Mix	(Dr. Hoffmann, FLI)
CSF-Mix	(Dr. Hoffmann, FLI)

PK3-alf Verdünnungen	(Dr. Hoffmann, FLI)
	$\Rightarrow 2 \times 10^0$
	$\Rightarrow 2 \times 10^2$
	$\Rightarrow 2 \times 10^4$
	$\Rightarrow 2 \times 10^6$
Tris-EDTA-(TE) Puffer	(Roth)
Carrier polyA-RNA	(Amersham Biosciences)
Natriumazid	(Roth)

für den IPT:

Immuno Pure anti-Mouse Konjugat	(Pierce)
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	(Sigma)
Dimethylformamid (DMF)	(Fluka)
Wasserstoffperoxid (30%)	(Roth)
Tween 20	(Serva)

für den IIFT:

Evans blue	(Merck)
Aceton	(Roth)

Antibiotika zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen:

Penicillin G	(ICN, Biomedicals)
Streptomycin	(ICN, Biomedicals)
Gentamycin	(Sigma Cell Culture)

Der Antibiotikumzusatz erfolgt zu Medien, die für den VNT und die Isolierung von Virus aus Nase-, Augen-, Speichel- und Kotabstrichen benutzt wurden.

### 3.1.6. Medikamente

Zoletil ® (Virbac, Frankreich)

### 3.1.7. Puffer und Lösungen

#### Herstellen des Agarosegels

**kleines Gel:** 0,6 g Agarose in 40 ml TBE-(Tris-Borat-EDTA) Puffer lösen

**großes Gel:** 1,2 g Agarose in 80 ml TBE-Puffer lösen

Zugabe von 10 (kleines Gel) bis 20 µl (großes Gel) Ethidiumbromid.

#### Herstellen des TBE-Puffers

5 x TBE-Puffer: 54 g Tris (Trishydroxymethylaminomethan) + 27,5 g Borsäure + 20 ml 0,5 M EDTA (Ethyldiamintetraacetat) (pH 8) auf 1.000 ml Aqua destillata (A. dest.);  
Einsatz für das Gel 0,5 x TBE.

EDTA-Lösung herstellen: 18,62 g/100 ml = 0,5 M EDTA in 10 N NaOH;

EDTA in Natronlauge lösen und mit Aqua. bidestillata (A. bidest.) auf 100 ml auffüllen;

Tris und Borsäure in 600 ml A. dest. auflösen und 20 ml EDTA dazugeben, mit A. dest auffüllen auf ein Volumen von 900 ml;

pH-Wert mit 37% Salzsäure auf 8 einstellen und auf 1.000 ml mit A. dest. auffüllen.

#### Herstellen des Ladepuffers

Puffereinsatz: 0,6 x in 0,5 x TBE verdünnt im Gel;

Puffer 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnen;

900 µl DEPC-Wasser mit 100 µl Ladepuffer versetzen und Zucker zugeben (Succrose);

Lagerung im Kühlschrank.

#### Herstellen der Ethidiumbromid-Gebrauchslösung

Stammlösung ist eine Flüssigkeit (10 mg/ml); für eine Gebrauchslösung die Stammlösung

1:10 mit A. dest. verdünnen (entspricht 1 mg Ethidiumbromid/ml);

lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahren.

#### Herstellen des DEPC-Wassers

100 µl DEPC und 100 ml A. bidest. mischen, über Nacht im Brutschrank inkubieren (37°C), schütteln und 3 x autoklavieren.



Es entsteht RNase freies Wasser für die Elution der aufgereinigten RNA sowie für alle RT-PCR Schritte.

#### Herstellen des Natrium-Azetat-Puffers

3,4 g Na-Azetat mit 3 Teilen H<sub>2</sub>O versetzen und mit 500 ml A. dest. auffüllen; Einstellung des pH-Wertes auf pH 5 mit 10% Essigsäure.

#### Herstellung der Phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS<sup>-</sup>)-Stammlösung (10-fach konzentriert)

KCl 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, NaCl 80 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 14,24 g ad 1 l A. dest.  
PBS<sup>-</sup>-Gebrauchslösung: 100 ml Stammlösung ad 1 l A. dest.

#### Herstellung einer PBS<sup>-</sup>-Gebrauchslösung mit Tween 20

0,1 ml Tween 20 auf 1 l PBS<sup>-</sup> Gebrauchslösung.

#### Herstellung Evans blue-Lösung für den IIFT

0,1% Stammlösung: 0,1 g Evan's blue und 100 ml PBS<sup>-</sup> vermischen; Lagerung bei 4°C im Kühlschrank.

Gebrauchslösung: 0,1 ml Stammlösung zu 9,9 ml PBS<sup>-</sup> geben.

#### Herstellung einer Glycerol-PBS<sup>-</sup>-Mischung

9 Teile Glycerol in 1 Teil PBS<sup>-</sup> geben.

#### Zusammensetzung Trockenschutzmittel (TSM)

<u>TSM (2fach):</u>	Kaliumhydroxid	0,548 g
	L-Glutaminsäure	1,440 g
	Dikaliumhydrogenphosphat	2,508 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,030 g
	Saccharose	150,00 g
	Gelatine	40,00 g
	Aqua ad injectabilia	ad 0,5 l

### Magermilch

Magermilchpulver	120,00 g
Aqua ad injectabilia	ad 0,5 l

### Zusammensetzung Gefrierschutzmittel (GS 4)

<u>Phosphatpuffer (pH 7,6):</u>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,3 g
	A. dest.	ad 1 l
Im Puffer zu lösen:	Saccharose	40 g
	Gelatine	100 g

### Herstellung der Mixe und Puffer für die Real-Time PCR

<u>CSF-Mix:</u>	20 µl forward primer (100pmol/µl)
	20 µl reverse primer (100pmol/µl)
	1 µl CSF-Probe 1 (249 pmol/µl)
	159 µl 0,1 x TE-Puffer (pH 8)

<u>EGFP-Mix:</u>	5 µl forward primer (100pmol/µl)
	5 µl reverse primer (100pmol/µl)
	1,5 µl EGFP-Probe 1 (282pmol/µl)
	188,5 µl 0,1 x TE-Puffer (pH 8)

<u>RNA-Safe-Buffer:</u>	50 ng/µl Carrier polyA-RNA
(RSB)	0,05% Tween 20
	0,05% Natriumazid

Lyophilisierte Carrier-RNA mit DEPC-Wasser lösen; einstellen auf eine Stammlösungskonzentration von 10 µg/µl; Aliquots bei -70°C lagern; mit Tween und Natriumazid Herstellung einer 5% Stammlösung; Aliquots abfüllen und bei -20°C aufbewahren.

### 3.1.8. Geräte und Verbrauchsmaterialien

• Bakterietten	COPAN
• Blutmessgerät CELL DYN 3700	ABBOTT
• Bördelkappen	Zscheile + Klinger GmbH
• Brutschrank	Jouan
• Brutschrank CO <sub>2</sub>	Labotect
• Deckgläser	Assistent
• Durchlichtmikroskop TMS	Nikon
• Edelstahlkanülen	Aesculap
• EDTA-Blutröhrchen	Greiner
• Einmalspritzen	Terumo, Codan
• Einmalkanülen	Terumo, TSK-SUPRA
• Eismaschine	Scotsman
• ELISA-Reader SUNRISE	TECAN
• Filme	Mitsubishi
• Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Olympus
• Gefriertruhen (-20°C, -70°C)	Liebherr, National Lab
• Geldokumentationsgerät	Herolab
• Gelelektrophoresekammer, wide mini-sub	BIO-RAD
• Glasröhrchen 10ml	Faust Nord
• Gummistopfen, Chlorbutylstopfen für Injektionsflaschen	Zscheile + Klinger GmbH
• Hartgelatinekapseln	WEPA-Apothekenbedarf
• iCycler MX3000P™	Stratagene
• Injektionsflaschen à 2ml mit 13-er Hals für Lyophilisation	Fiolax
• Kaolinröhrchen	Greiner
• Kämmen (klein und groß)	BIO-RAD
• Kryoröhrchen 4,5ml und 1,8ml	NALGENE Company
• Kühlschrank	Electrolux
• Laborwaage	Sartorius
• Magnetrührer	IKA-Mini, Ikamag REO
• Mikrowelle 8519	Privileg

- Mörser
  - Objektträger
  - PAP-Pen
  - PCR-Cooler
  - PCR-Tubes 0,2ml
  - PCR-Zentrifuge 5417 R
  - pH-Meter 761Calimatic
  - Pinzetten
  - Pipetten
  - Pipettboy
  - Pipettenspitzen
  - Pipettierroboter („Freedom EVO<sup>®</sup>“)
  - Präzisionswaage
  - Scheren
  - Schüttler
  - Seesand (steril)
  - Stahlkugeln, 5 mm
  - Sterilfilter 0,45 µl
  - Sterilwerkbank Laminarflow VFR 1206 GS
  - Spannungsgerät (Power supply)
  - Thermocenter
  - Thermocycler T3
  - Thermomixer 5436
  - Tissue Lyser
  - Transferpette
  - Tubes 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0 ml Safe-Lock
  - Universalzentrifuge 30 RF
  - Vortexer
  - Wattestäbchen
  - Weichgelatinekapseln
  - Wasserbad
- neoLab
  - Menzel-Gläser
  - Sciences Services
  - Eppendorf
  - Biozym
  - Eppendorf
  - Knick
  - Eickemeyer, Aesculap
  - Eppendorf, Costar
  - Integra Biosciences
  - Ratiolab, Biozym
  - TECAN
  - Chyo JC 180
  - Eickemeyer, Aesculap
  - IKA
  - Roth
  - Qiagen
  - Schleicher-Schuell
  - Steag
  - BIO-RAD
  - Salvis
  - Biometra
  - Eppendorf
  - Qiagen
  - BRAND
  - Eppendorf
  - Hettich
  - Scientific Industries
  - PANTOS
  - Scheerer
  - Grant SUB6

- Zählkammer nach Thoma
- Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup>
- Zellkulturflaschen 12,5 cm<sup>2</sup>
- Zellkulturplatten 24-, 48- und 96-Well
- Zentrifuge Minispin

Feinoptik Bad  
Blankenburg  
Costar  
Falcon  
Costar  
Eppendorf

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Probenmaterial**

#### **3.2.1.1. Probenart und Probengewinnung**

Als zu untersuchendes Material wurden während der Tierversuche Blut- und Serumproben gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte je nach Alter der Schweine im Liegen oder stehend (Fixation per Oberkieferschlinge) mittels steriler Einmalkanülen. Für virologische und hämatologische Untersuchungen wurde der Gerinnungshemmer EDTA zugesetzt. Zur Serumgewinnung wurde das Vollblut in Kaolinröhrchen überführt. Zur Feststellung der Ausscheidung von Challengevirus erfolgte je nach Tierversuch die Entnahme von NT, Augentupfer (AuT), Speicheltupfer (SpT) und KT. Für die NT und AuT kamen konventionelle Wattestäbchen zum Einsatz, die zuvor autoklaviert wurden. Zum Sammeln von Speichel und Kot verwendeten wir einzeln verpackte sterile Bakterietten<sup>®</sup>. Es wurden von jedem Tier jeweils zwei Tupfer gleicher Art entnommen, um genug Material für den Virus- und den Genomnachweis (RT-PCR/Real-Time PCR) zu erhalten.

#### **3.2.1.2. Probenaufarbeitung**

##### *3.2.1.2.1. Blutbild*

Nach der Probenentnahme wurde das mit dem Gerinnungshemmer EDTA versetzte VB mit dem Blutzählgerät CELL DYN<sup>®</sup> 3700 gemessen. Es wurden Blutproben aus allen Tierversuchen sowohl pv (28 dpv) als auch pi untersucht und dabei die Gesamtzahl an Leukozyten bestimmt.

##### *3.2.1.2.2. Serum*

Nach mehrstündiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation des Blutes im Entnahmeröhrchen bei 3.000 U/min für 10 min bei 4°C wobei das Serum anschließend vorsichtig abpipettiert und bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert wurde.

#### *3.2.1.2.3. Leukozytenpräparation (Buffy coat)*

Für die Leukozytengewinnung (BC) wurden 2 ml EDTA-Blut für 10 min bei 12°C und 1.200 U/min zentrifugiert. Nach dem Abhebern der unter dem Plasma liegenden leukozytären Schicht erfolgte die Zugabe von 2 ml sterilem A. dest., wobei die Erythrozyten unter vorsichtigem Schütteln (A. dest.-Schock, Methode nach Weinhold, 1965) zerstört, nach 1 min die Reaktion durch 0,2 ml sterile PBS<sup>-</sup>-Stammlösung gestoppt und abschließend nochmals bei 1.000 U/min 5 min (12°C) zentrifugiert wurde. Es schloss sich eine Resuspension des Sedimentes in 1 ml Zellmedium 9D mit Antibiotikum (100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin) an. Die Lagerung der auf diese Weise gewonnenen Leukozyten erfolgte bei -20°C.

#### *3.2.1.2.4. Tupferproben*

Nach Entnahme wurden die Tupfer in 1 ml EM 12 mit Antibiotikum (Streptomycin 500 µg/ml und 500 IE Penicillin/ml) aufgenommen und im Anschluss gevortext. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Über Nacht inkubierten die Proben im Kühlschrank bei 4°C. Am nächsten Tag erfolgte die Portionierung in Tubes für die PCR bzw. das Einfrieren der in Medium aufgenommenen Tupfer für die VI. Bis zur Verwendung lagerte das Material bei -20°C. Für die VI wurden die tiefgefrorenen Tupfer aufgetaut und filtriert (Filtergröße 0,45 µm).

Das Eluat wurde nach Dekantieren des verbrauchten AZM in eine, mit einem Monolayer bewachsene, 12,5 cm<sup>2</sup> PK15-Zellkulturflasche gegeben, mehrmals leicht geschwenkt und anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte das Übersichten mit EM 12 (100 IE Penicillin/ml und 100 µg Streptomycin/ml sowie 5% PS enthaltend). Die Flaschen verblieben für weitere drei Tage bei 37°C im Brutschrank.

Zur Virusernte wurden die Flaschen einem zweimaligem Gefrier-/Tauprozess unterzogen.

#### *3.2.1.2.5. Organe*

Bei der Sektion der Versuchstiere wurden verschiedene Organproben (Details im experimentellen Teil) möglichst steril entnommen und bis zur Bearbeitung bei -20°C gelagert. Für den Virusnachweis erfolgte eine Anreicherung der Gewebe mit Mörser und Pistill. Dazu

wurde 1 g Organ mit sterilem Seesand fein zerrieben und anschließend in 4 ml Medium 9D, versetzt mit Streptomycin (250 µg/ml) und Penicillin(333 IE/ml), aufgenommen.

Es schloss sich eine einstündige Inkubation der Organsuspension bei Zimmertemperatur an. Über Nacht extrahierte die Anreicherung im Kühlschrank, gefolgt von einer Zentrifugation bei 4.500 U/min für 10 min. Der Überstand wurde in Kryoröhrchen abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

### **3.2.2. Zellkultivierung**

#### **3.2.2.1. Zellkulturflaschen**

Die Kultivierung der verschiedenen Zellen erfolgte in Plastikgewebekulturflaschen der Größen 12,5 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>.

Die Anzucht der Zellen geschah bei 37°C im Brutschrank. Nach zwei bis drei Tagen bildeten die meisten Zellen einen konfluierenden Monolayer aus. Das Umsetzen der Zellen erfolgte nach Abgießen des verbrauchten AZM und Ablösung der Zellen vom Kulturflaschenboden mit einer Versen/Trypsin-Mischung. Die Zelllinien wurden entsprechend ihrer Umsatzraten in AZM aufgenommen und in neue Kulturflaschen verbracht.

#### **3.2.2.2. Zellkulturplatten**

Zum Nachweis von KSPV und der Chimären CP7\_E2alf/CP7\_E1E2alf wurde die Zelllinie PK15 benutzt, während für den Nachweis von „C“-Virus die EFN-R-Zelle Verwendung fand. Zum Einsatz kamen 24-, 48- und 96-Wellplatten, die mit 1.000 µl, 500 µl oder 100 µl eingestellter Zellsuspension pro Well beschickt wurden.

Bei der PK15-Zelllinie wurden  $0,8 \times 10^5$  Zellen/ml Medium eingesetzt, bei der EFN-R  $2-3 \times 10^5$  Zellen/ml Medium. Nach drei Tagen Bebrütung bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wuchsen die Zellen zu einem einschichtigen Monolayer aus und fanden für virologische und serologische Untersuchungen Verwendung.

### **3.2.3. Nachweismethoden für Virus, Antigen (Ag) und virale RNA**

#### **3.2.3.1. Indirekter Immunperoxidase-Test (IPT)**



### 3.2.3.1.1. *Virusisolierung aus Organmaterial, Tupferpassagen und Vollblut pi*

Für die VI fanden 24-Well-Zellkulturplatten Verwendung. Nach Ausbildung eines konfluierenden Monolayers wurde das verbrauchte AZM dekantiert und der Zellrasen vorsichtig einmal mit EM 9D gespült. Im Anschluss wurde jedes Well mit 200 µl Organanreicherung, Zellkulturüberstand oder VB beimpft (Ansatz der Proben immer in Doppelbestimmung). Als Kontrollvirus diente das KSPV „Alfort 187“ in einer Verdünnung von  $10^{-3}$  während EM 9D als Negativprobe auf jeder Platte mitgeführt wurde. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte ein Absaugen des Inokulums (bei Organanreicherung und BC) mit sterilen Spitzen sowie ein zweimaliges Spülen des Zellrasens mit EM 9D, versetzt mit Antibiotikum (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Jedes Well wurde im Anschluss mit 1 ml EM 9D (mit Antibiotikumzusatz) überschichtet. Die Platten verblieben nun für drei Tage im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>). Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt und der IPT durchgeführt. Zuerst wurden die Platten mit einer Waschflüssigkeit, bestehend aus 1/3 PBS<sup>-</sup>-Gebrauchslösung und 2/3 A. dest., einmal gewaschen. Die Trocknung derselben erfolgte für ein bis zwei Stunden unter Zuhilfenahme eines Tischventilators. Die Platten wurden nun im Thermocenter zwei Stunden lang bei 80°C hitzefixiert, nach Abkühlung auf Raumtemperatur weiterbearbeitet oder in Folie eingeschweißt und bei -20°C bis zur Endbearbeitung gelagert. Nunmehr schloss sich ein zweiter Spülvorgang mit der oben beschriebenen Lösung an.

Anschließend wurden die Platten getrocknet, der monoklonale KSPV-spezifische Ak HCTC (Hog Cholera Tissue Culture) 1:800, gerichtet gegen das E2-Protein des KSPV bzw. der Panpesti-mAk C16, gerichtet gegen NSP 2-3 (für CP7\_E2alf, CP7\_E1E2alf, BDV, BVDV), 1:50 mit PBS<sup>-</sup>-Tween 20 verdünnt und zu 200 µl pro Well pipettiert.

Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der mAk dekantiert, die Platten dreimal mit PBS<sup>-</sup>-Tween 20 gespült, ausgeklopft und das Konjugat (anti-Maus-POD 1:1.000 mit PBS<sup>-</sup>-Tween 20 verdünnt) in einer Menge von 200 µl pro Well hinzugegeben.

Die Einwirkzeit betrug eine Stunde bei Zimmertemperatur. Nach dem Entfernen des Konjugates erfolgte ein dreimaliger Spülvorgang mit PBS<sup>-</sup>-Tween 20 und ein einmaliges Waschen der Kavitäten mit A. dest. Zum Schluss wurden in die gut ausgeklopften Zellkulturplatten 200 µl einer frisch angesetzten Substratlösung pipettiert.

Für eine Anzahl von zehn Platten kamen 0,020 g AEC zum Einsatz, die in 3 ml DMF gelöst und mit 50 ml angewärmtem Natriumacetatpuffer aufgefüllt wurden. Kurz vor Gebrauch der Lösung erfolgt der Zusatz von 25 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nach einer ca. 30minütigen Inkubation bei

37°C wurden die Platten dekantiert, einmalig mit A. dest. gespült und mit ca. 200 µl A. dest. überschichtet.

Es schloss sich die mikroskopische Auswertung der Platten an, die möglich war, wenn die positive Probe die typische rot-bräunliche Färbung des Zytoplasmas, die negative Kontrolle hingegen keine Anfärbung zeigte.

#### *3.2.3.1.2. Virusisolierung aus Vollblut und Serum pv*

Zum Nachweis der Ausscheidung von Impfvirus („C“-Virus, CP7\_E2alf, CP7\_E1E2alf), wurden 48-Wellplatten mit einem konfluierenden Monolayer aus EFN-R oder PK15-Zellen mit 100 µl Probenmaterial versetzt und wie in Abschnitt 3.2.3.1.1. beschrieben, behandelt. Im Unterschied zu 24-Wellplatten erfolgte bei der Verwendung von 48-Wellplatten der Einsatz von je 100 µl mAk, Konjugat sowie die Überschichtung mit 100 µl EM 9D plus Antibiotikum. Je nach Vakzinevirus wurden die relevanten positiven Kontrollen ausgesucht, während mit EM 9D beschickte Wells als negative Kontrolle fungierten.

#### *3.2.3.1.3. Titration von Impfvirus*

Die Titration der Impfstämme („C“-Virus, CP7\_E2alf, CP7\_E1E2alf) erfolgte auf 96-Wellplatten, die mit Monolayern der Zelllinien EFN-R bzw. PK15 bewachsen waren. Als positive Kontrolle für die mit „C“-Virus beimpften Platten fungierte das „C“-Virus SP-C 275 sowie „Alfort 187“ bei der Titration der Chimären CP7\_E2alf und CP7\_E1E2alf. Die mit einem Monolayer bewachsenen ZK-Platten wurden mit 50 µl Virus pro Well beimpft. Hierzu erfolgte die Herstellung einer Virus-Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  im Glasröhrchen, wobei je vier Well pro Verdünnungsreihe beimpft und eine Positiv-, sowie eine Negativprobe (EM 9D) mitgeführt wurden. Die weitere Durchführung der Titration geschah, wie bereits unter 3.2.3.1.1. beschrieben, nur ohne das angegebene Spülen der Platten vor und nach dem Beimpfen. Weiterhin wurden mAk, Konjugat und Überschichtungsmedium in einer Menge von jeweils 50 µl eingesetzt.

#### 3.2.3.1.4. Titration von Challengevirus

Für die Rücktitration von in Tierversuchen eingesetztem Challengevirus wurden 96-Wellplatten, die drei Tage vorher mit PK15-Zellen ( $0,8 \times 10^5/\text{ml}$ ) beimpft worden waren, benutzt und nach Absaugen des Mediums, wie unter 3.2.3.1.3. beschrieben, weiterbearbeitet.

#### 3.2.3.2. Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Ausgangsmaterial für den IIFT bildeten Knochenmark (KM)-Ausstriche, die bei der Sektion aus Rippen gewonnen wurden. Nach Anfertigung der Ausstriche schlossen sich eine Lufttrocknung sowie eine 10minütige Fixierung derselben in Aceton bei Raumtemperatur an. Nach erneuter Lufttrocknung wurden die Ausstriche entweder sofort bearbeitet oder bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung eingefroren. Sie sind bei dieser Lagerung für etwa sechs Monate haltbar.

Vor Weiterbearbeitung wurden die Präparate einmal mit PBS<sup>-</sup>-Gebrauchslösung (pH 7,2) gespült. Mit Hilfe eines PAP-Pen-Stiftes erfolgte die Markierung des Ausstrichfeldes (ca. 2 cm Durchmesser). Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  des 1:200 mit PBS<sup>-</sup>-Gebrauchslösung verdünnten mAk's HCTC auf das umschriebene Feld des Ausstriches aufgebracht und die Objektträger zusammen mit auf die gleiche Weise bearbeiteten positiven und negativen KM-Ausstrichen als Kontrollen, bei  $37^\circ\text{C}$  für eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen (5 bis 7 x) mit PBS<sup>-</sup>-Gebrauchslösung und Lufttrocknung der KM-Ausstriche wurde 1:50 verdünntes FITC-markiertes anti-Maus-Immunglobulin (Ig) in 0,001% Evan's blue-Lösung, zu je 200  $\mu\text{l}$  auf den markierten Bereich pipettiert. Nach einer weiteren Stunde Einwirkzeit in der feuchten Kammer wurde das Konjugat entfernt und die Ausstriche sehr sorgfältig mehrere Male in PBS<sup>-</sup>-Gebrauchslösung sowie zweimal in A. dest gespült, um Konjugatreste zu entfernen. Abschließend erfolgte ein Eindecken der KM-Ausstriche mit Deckgläschen in noch leicht feuchtem Zustand unter Verwendung eines Glycerol-PBS<sup>-</sup>-Gemisches. Bis zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop lagerten die Objektträger bei Kühlschranktemperatur.

Eine brillant-grüne Fluoreszenz des Zytoplasmas ist als positiv zu bewerten.

Nicht infizierte Zellen zeigen dort keine Grünfluoreszenz.

### 3.2.3.3. PCR-Methoden

#### 3.2.3.3.1. RT-PCR

##### 3.2.3.3.1.1. RNA-Isolierung

Je nach Art der Probe kamen verschiedene Testkits zur Anwendung, wobei die RNA-Präparation nach Vorschrift der Hersteller erfolgte.

a) VB/Serum:

Für die Aufarbeitung von gefrorenem VB wurde der QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit verwandt (Qiagen), während bei RNA-Isolation aus Serumproben für die Real-Time PCR mittels Pipettierroboter (Freedom EVO<sup>®</sup>) der Kit von Macherey-Nagel entsprechend des beiliegenden Protokolls Verwendung fand.

Bei Benutzung des QIAamp<sup>®</sup>-Kits wurden 200 µl Probematerial mit 20 µl QIAGEN Protease und 200 µl AL-Lysispuffer versetzt und gevortext, dann für 10 min bei 56°C im Thermomixer leicht geschüttelt. Bei Durchführung einer Real-Time PCR erfolgte der Zusatz von 5 µl IC2 (interne Kontrolle 2, internal control 2). Nach Zugabe von 200 µl 96% Ethanol pro Tube, erfolgte der Transfer der Mischung auf eine Säule, die für 2 min bei 8.000 U/min zentrifugiert wurde.

Nach Bindung der RNA an die Silikonmembran wurden in zwei Waschschritten mit 700 µl AW1 (Zentrifugation 2 min bei 8.000 U/min) und 700 µl AW2 Puffer (Zentrifugation 2 min bei 8.000 U/min) mögliche PCR-Inhibitoren entfernt. Im Anschluss an das Trockenschleudern bei 14.000 U/min für 2 min wurde die Säule auf ein Eppendorf-Tube gesetzt und 100 µl DEPC-Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min fand ein kurzer Zentrifugationsschritt (1 min bei 8.000 U/min) statt. 2,5 µl frisch isolierte RNA wurde in ein 0,5 ml Tube gefüllt und bis zur Durchführung der RT-PCR bei -70°C gelagert. Nach 7 Proben wurde jeweils eine RNA Isolierungskontrolle (RIC) mitgeführt.

Wurden Serumproben in der Real-Time PCR untersucht, so erfolgte zuerst das Versetzen von 150 µl Serum mit 600 µl Lysispuffer (plus carrier-RNA) und 20 µl Protease. Die Mischung wurde gevortext, 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend, dem Protokoll folgend, weiter bearbeitet.

#### b) Tuffer:

Die Isolierung von KSPV-Genom aus Tufferproben geschah bei der herkömmlichen KSP-PCR mit dem High Pure Viral RNA Kit (Roche). Hierzu wurden 200 µl Tufferflüssigkeit mit 400 µl Bindepuffer und 4 µl Poly(A) carrier-RNA gemischt, 10 sek gevortext und kurz zentrifugiert.

Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit auf eine Spinsäule übertragen und 15 sek bei 10.000 U/min zentrifugiert und das Filter-Tube in ein neues Collection-Tube verbracht, mit 500 µl Inhibitor Removal Buffer gefüllt und für 1 min bei 8.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Filter in ein neues Tube gegeben und das Eluat verworfen.

Nach Bindung der RNA an die Membran erfolgten mehrere Waschschrirte (450 µl Waschpuffer, 2 x waschen und zentrifugieren für 15 sek bei 10.000 U/min), sowie das Trockenschleudern bei 14.000 U/min für 10 sek. Zur Elution der viralen RNA erfolgte die Zugabe von 50 µl Elutionspuffer direkt auf die Filtermembran. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 10.000 U/min für 1 min, war die RNA-Isolierung abgeschlossen.

Wurden die Tufferproben in der Real-Time PCR untersucht, geschah die Isolierung der viralen RNA mit dem Pipettierroboter (Freedom EVO<sup>®</sup>) unter Nutzung des Kits von Macherey-Nagel entsprechend des beiliegenden Protokolls mit folgenden Modifikationen. So wurden 150 µl der Tufferaufschwemmung mit 600 µl Lysispuffer versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 7 Proben wurde jeweils eine RNA Isolierungskontrolle mitgeführt.

Die weitere Abfolge orientierte sich streng an dem den Kit beiliegenden Protokoll.

#### c) Organe:

Die Aufbereitung der Organe wurde mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Jeweils 30 bis 60 mg Gewebe wurden abgewogen, mit 600 µl RLT-Lysispuffer sowie 6 µl Mercaptoethanol versetzt und unter Verwendung einer sterilen 5 mm Stahlkugel und Tissue Lyser bei 20 Schwingungszahlen pro sek 2 min kräftig geschüttelt. Für die Durchführung der Real-Time PCR kamen pro Tube 5 µl der IC2 hinzu. Eine 3minütige Zentrifugation bei 14.000 U/min folgte. Der Überstand wurde abpipettiert und in eine Qiagen Shreddersäule gefüllt. Nach erneuter Zentrifugation bei 8.000 U/min für 1 min, wurde in das Eluat 600 µl 70% Ethanol pro Probe gegeben und mit Hilfe der Pipette vorsichtig gemischt. Nunmehr erfolgte eine Überführung des Eluat-Ethanol-Gemisches auf eine neue Säule (2 x à 600 µl)

sowie Zentrifugieren für 15 sek bei 10.000 U/min. Nach Bindung der RNA an die Membran wurden durch Zugabe von 700 µl RW1 Puffer PCR-Inhibitoren entfernt, wobei der Filter auf ein neues Sammeltube gesetzt und 2 x mit je 500 µl RPE Puffer gewaschen wird. Nach dem zweiten Waschvorgang schloss sich das Trockenschleudern bei 14.000 U/min für 2 min an. Schließlich wurden 50 µl DEPC-Wasser auf jede Säule pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert.

Die Aufbewahrung der RNA bis zur Weiterbearbeitung erfolgte wie oben bereits beschrieben. Bei allen Aufarbeitungen erfolgte stets das Mitführen einer Positiv- und Negativkontrolle, um die erfolgreiche Elution des KSPV-Genoms und artifizielle Kontaminationen zu erkennen.

#### 3.2.3.3.1.2. PCR

Die reverse Transkription (RT) der viralen RNA wurde wie bei Liu et al. (1991) beschrieben mit Avian Myoblastosis Virus-(AMV) Reverser Transkriptase (RT) durchgeführt.

Für die RT-PCR kamen kommerziell synthetisierte Primer aus dem 5'UTR-Bereich zum Einsatz: utr51-Primer (antisense) mit der Sequenz 5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3', komplementär zu den Nukleotiden 352 bis 371 und der utr53-Primer (sense) mit der Basenabfolge ,5'-CAT GCC C(AT)T AGT ACT AGC-3', komplementär zu den Nukleotiden 88 bis 107 wie von Kaden et al. (2004) publiziert. Wie unter 3.2.3.3.1.1. beschrieben, wurde 2,5 µl RNA mit 0,5 µl DMSO und 1 µl des utr51-Primers versetzt und im Thermocycler für 5 min bei 98°C sowie 2 min bei 42°C thermisch behandelt. Danach erfolgte die Zugabe der Ingredienzien für die RT-PCR. Es wurden 3 µl AMV-RT-Puffer, 0,4 µl Dinukleotidtriphosphate (dNTP's), 7,15 µl DEPC-Wasser, 0,1 µl rekombinantes RNasin sowie 0,35 µl AMV-RT dem Tube zugesetzt, der ganze Mix gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend erfolgte bei 42°C für die Dauer von 30 sek das Umschreiben der RNA in cDNA. Die Amplifizierung der cDNA geschah nach Zugabe von 2,1 µl MgCl<sub>2</sub>, 3,5 µl Puffer, 1 µl utr53-Primer sowie 0,25 µl Taq-DNA Polymerase und 28,15 µl DEPC-Wasser. Folgendes Temperaturprofil wurde für die PCR verwandt: 3 min 95°C, 35 x (30 sek 95°C, 30 sek 55°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C.

#### 3.2.3.3.1.3. Nested PCR (nPCR)

Die nPCR kam vorrangig dann zum Einsatz, wenn virologisch positive Proben in der klassischen RT-PCR negativ waren bzw. als Bestätigungstest. Für eine nPCR wurde ein Mix

aus 5 µl MgCl<sub>2</sub>, 5 µl Puffer, 0,8 µl dNTP's, 1 µl utr51n-Primer, 1 µl utr53n-Primer, 0,5 µl DMSO, 35,45 µl DEPC-Wasser sowie 0,25 µl Taq-Polymerase hergestellt und 49 µl in jedes Tube vorgelegt. Im Anschluss erfolgte der Zusatz von 1 µl PCR-Produkt und die thermische Bearbeitung im Cycler nach folgendem Schema: 2 min 93°C, 35 x (30 sek 93°C, 30 sek 50°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C.

#### 3.2.3.3.1.4. Gelelektrophorese

Der Nachweis der PCR und nPCR-Produkte erfolgte im Anschluss an die PCR bzw. nPCR mit Hilfe eines 1,5% Agarosegels versetzt mit Ethidiumbromid. Hierzu wurden in jede Geltasche 10 µl PCR-Produkt pipettiert. Ein DNA-Amplifikat von einem mit KSPV infizierten Tier diente als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit des Gels und der PCR-Marker zur Größenfeststellung der amplifizierten Proteine. Das Ergebnis war positiv zu bewerten, wenn ein ca. 300 bp großes Reaktionsprodukt bei der Begutachtung unter UV Licht im Gel nachweisbar war. Die Auftrennung der einzelnen Proteine erfolgte bei 60 V und 0,5 A für 45 min in 0,5 x TBE-Puffer.

#### 3.2.3.3.2. Real-Time RT-PCR

Zum Einsatz kam ein iCycler der Firma Stratagene MX3000P<sup>TM</sup>. Untersucht wurden Organproben sowie NT und Serum, wobei die RNA zuvor mittels kommerzieller Testkits (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, NucleoSpin<sup>®</sup> Multi 96 Virus) isoliert worden ist. Die PCR wurde als duplex PCR nach folgendem Protokoll (Hoffmann et al., 2005, 2006) durchgeführt, wobei die Amplifikation auf Basis des QuantiTECT<sup>TM</sup> Probe RT-PCR Kits erfolgte. Ansatz für eine Probe: 3,25 µl RNase freies Wasser, 12,5 µl 2x Quantitect Master Mix, 0,25 µl RT-Mix, 2 µl EGFP Mix1 (Limit5) und 2 µl CSF Mix1. Bei dem EGFP- und dem CSF-Mix handelt es sich um Primer-Sonden-Mixe mit folgenden Sequenzen:

<u>CSF- MIX 1:</u> CSF100-F (100 pmol/µl)	5'-ATG CCC AYA GTA GGA CTA GCA- 3'
CSF192-R (100 pmol/µl)	5'-CTA CTG ACG ACT GTC CTG TAC- 3'
CSF-Probe1 (249 pmol/µl)	5'-FAM-TGG CGA GCT CCC TGG GTG GTC TAA GT-TAMRA- 3'

EGFP-MIX 1: EGFP1-F (100 pmol/μl)      5'-GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC- 3'  
(Limit 5)      EGFP2-R (100 pmol/μl)      5'-GAA CTC CAG CAG GAC CAT G- 3'  
EGFP-Probe1 (282 pmol/μl) 5'-HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG  
AGC A-BHQ1- 3'

Der Mastermix wurde vorsichtig gemischt und in einer Menge von 20 μl in die einzelnen Tubes verteilt.

Die Zugabe von 5 μl Feldprobe (mit IC2 aufgearbeitet), der RIC (aufgearbeitete Negativkontrolle mit IC2), einer Negativkontrolle (NTC, ohne IC2) sowie einer ( $2 \times 10^3$  Kopien/μl, ohne quantitative Aussage) bzw. mehrerer T7-Pk3alf Verdünnungen ( $2 \times 10^1$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^7$  Kopien/μl, für die Quantifizierung) schloss sich an. Die PCR startete mit der RT (30 min, 50°C), gefolgt von der Inaktivierung der RT und Aktivierung der Taq-Polymerase (15 min, 95°C), Denaturierung (15 sek, 95°C), Annealing (30 sek, 57°C) und Elongation (30 sek, 68°C).

Die Auswertung der Daten erfolgte anhand von Fluoreszenzwerten, die während der Annealingphase gesammelt wurden. Es wurden drei verschiedene Farbstoffe eingesetzt, wobei ROX (Referenzfarbstoff, 6-carboxy-rhodamin) im Kit enthalten ist und zur Normalisierung der Fluoreszenzdaten genutzt wird. HEX (Hexachlor-6-carboxy-fluorescein) wies den Zusatz der IC2 und damit eine korrekte Aufarbeitung nach und FAM (6-carboxy-fluorescein) ist der Kanal für das Vorhandensein von KSPV-Kopien. Für alle Feldproben und die RIC sollte die IC2 mit einem Treshold Cycle (TC, Zyklus, in dem der Schwellenwert erreicht wird) von 26 bis 30 nachweisbar sein. Für die NTC und die Standards darf kein TC-HEX-Wert feststellbar sein. Im FAM-Kanal sind folgende TC-Werte für die verschiedenen T7-Pk3alf Verdünnungen vorgegeben:

$10^8$  Kopien/Well → TC= ca. 15

$10^6$  Kopien/Well → TC= ca. 22

$10^4$  Kopien/Well → TC= ca. 29

$10^2$  Kopien/Well → TC= ca. 36

Mit der Positivkontrolle und den Standards wird die Funktion des KSPV-Genom-Detektionssystems sichergestellt.

Für die RIC und die NTC sollte im FAM-Kanal kein TC-Wert feststellbar sein.



### **3.2.4. Antikörpernachweis (Ak)**

#### **3.2.4.1. Virusneutralisationstest (VNT)**

##### *3.2.4.1.1. Ak gegen KSPV*

Alle vakzinierten Tiere aus den Versuchen wurden an verschiedenen Beprobungstagen pv und pi auf das Vorhandensein neutralisierender Ak untersucht. Als zu neutralisierendes Virus wurde der KSPV-Stamm „Alfort 187“ eingesetzt.

Vor Durchführung des Tests fand zuerst eine Inaktivierung der Seren bei 56°C für 30 min statt. Der VNT erfolgte in 96-Wellplatten, wobei Verdünnungen in log<sub>2</sub>-Stufen zur Anwendung kamen, beginnend mit einer 1:4 (im ersten Tierversuch, 50 µl Serum plus 50 µl EM 9D) bzw 1:5 Verdünnung. Nach Vorlage von 60 µl EM 9D in die entsprechenden Kavitäten der ersten Reihe erfolgte die Zugabe von 40 µl inaktiviertem Serum. Kein EM wurde in die Wells der ersten Reihe pipettiert, die für das hochtitrige Kontrollserum vorgesehen sind. In alle anderen Kavitäten wurden 50 µl und für die negativen Zellkontrollen 100 µl EM 9D eingefüllt. Je Serumverdünnung wurden zwei Wells angesetzt. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette erfolgte die Herstellung der log<sub>2</sub>-Verdünnungsstufen. Bei jedem Test wurden zwei positive Seren, eines mit niedrigem (1:40) und eines mit hohem Titer (1:2000), sowie eine negative (KSPV, BDV, BVDV) Probe mitgeführt. Nach Fertigstellung der Verdünnungsreihen erfolgte die Zugabe von 50 µl/Vertiefung der auf 100 KID<sub>50</sub> eingestellten Virusverdünnung. Zu jedem Ansatz wurde immer eine Kontrollplatte angelegt, auf der eine Rücktitration des eingestellten Virus erfolgte, um die tatsächlich enthaltenen KID<sub>50</sub> zu erfassen. Aus diesem Grund wurde das Virus in log<sub>2</sub>-Stufen verdünnt und 100 µl in je 4 Vertiefungen verbracht. Nach erfolgtem Vermengen des Serum-Virus-Gemisches schloss sich eine zweistündige Inkubation bei 37°C an, mit nachfolgender Inokulation von 100 µl/Kavität einer auf 2 x 10<sup>5</sup> Zellen eingestellten PK15-Suspension je Kavität, einschließlich der Kavitäten für die Zellkontrollen und die Virusverdünnungen. Die Platten verblieben nun für drei Tage im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) und wurden am Ende mit Hilfe des IPT gefärbt. Die Auswertung des Tests erfolgte durch lichtmikroskopische Betrachtung der angefärbten Zellen. Wenn die eingesetzte Virusverdünnung zwischen 40 und 660 KID<sub>50</sub>/50 µl lag (OIE „Diagnostik Manual“, 2004), berechnet nach der Methode von Spearman und Kaerber (Mayr et al., 1974), war der Test auswertbar.

Die Bestimmung der Ak-Titer erfolgte nach Behrens und Kaerber (Mayr et al., 1977).

#### *3.2.4.1.2. Ak gegen weitere Pestiviren*

Bei allen Schweinen, die in Tierversuche genommen wurden, erfolgte vor der Immunisierung die Untersuchung auf mit KSPV kreuzreagierende Ak gegen BVDV1, BVDV2 sowie BDV.

Die Durchführung des Tests entspricht der unter 3.2.4.1.1. beschriebenen Methode.

Bei den zu neutralisierenden Viren handelte es sich um den Stamm NADL (National Animal Disease Laboratory, BVDV1) und München 2 (BVDV2). Beim BVD1-VNT kam die MDBK-Zelle in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml zum Einsatz.

Es wurden zwei Ak-positive Seren (Titer 1:28 und 1:100) sowie eine negative Probe mitgeführt. Bei dem IPT erfolgte der Einsatz des C16 mAk's.

Auch bei der Durchführung des BVDV2-VNT's wurden MDBK-Zellen sowie positive (Titer 1:113) und negative Kontrollseren verwendet. Im Unterschied zum BDV-VNT erfolgte die Verdünnung der Seren 1:5 mit Medium und es kam der mAk 433, gerichtet gegen des SP E<sup>ms</sup>, zum Einsatz.

Im BDV-VNT erfolgte die Herstellung von Verdünnungen in log<sub>2</sub>-Stufen, beginnend mit einer 1:4 Verdünnung. Es wurde statt der 60 µl 50 µl AZM 9C vorgelegt und als Detektionssystem die Zelllinie SFT-R in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Eine Ak-positive (1:227) und negative Serumprobe dienten der Kontrolle. Die Zellen wurden mit dem Panpesti-mAk C16, wie unter 3.2.3.1.1 aufgeführt, markiert.

#### **3.2.4.2. Ak-ELISA**

Für den Ak-Nachweis wurden ferner die anti-E2-ELISA's CHEKIT<sup>®</sup>-CSF-Sero-(Bommeli Diagnostics, Intervet) und Ceditest<sup>®</sup> CSFV 2.0 (Cedi-Diagnostics B.V.) angewandt.

Für die Untersuchung auf E<sup>ms</sup>-Ak fand der CEDITEST<sup>®</sup> von Cedi Diagnostics B.V. Verwendung.

Die Tests wurden in Doppelbestimmung und nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

##### *3.2.4.2.1. Anti-E2-ELISA "CHEKIT<sup>®</sup>-CSF-Sero" (Bommeli)*

Der Chekit-CSF-Sero ist ein Enzymimmuntest (ELISA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) zum Nachweis von Ak im Blutserum und -plasma von Schweinen, die gegen das Glykoprotein E2 (gp55) des KSPV gerichtet sind. Es handelt sich um einen kompetitiven Enzymimmuntest. Die Wells sind mit rekombinantem Hüllglykoprotein E2 beschichtet. Als

Konjugat wird ein KSPV-spezifischer mAk benutzt, der gegen dieses SP gerichtet ist. Wenn anti-KSPV-E2-spezifische Ak in der Serumprobe vorhanden sind, so verhindern diese, dass der peroxidasekonjugierte mAk an das gp55 bindet. Demzufolge kommt es nach Zugabe der Chromogen-Lösung zu keiner Farbentwicklung. Sind keine Ak im Probematerial enthalten, so bindet der peroxidasekonjugierte Ak an das E2 und das Chromogen verfärbt sich blaugrün. Die Farbreaktion wird abschließend im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

#### 3.2.4.2.2. *Anti-E2-ELISA “Ceditest<sup>®</sup> CSFV 2.0” (Cedi-Diagnostics B. V.)*

Dieser ELISA wurde entwickelt, um falsch positive Ergebnisse zu verhindern, die durch kreuzreagierende anti-E2-spezifische Ak gegen BDV oder BVDV zustande kommen. Der Test detektiert nach Angaben des Herstellers spezifisch Ak im Serum oder Plasma von Schweinen, die gegen die A-Domäne des E2-Proteins des KSPV gerichtet sind. Es ist bekannt, dass diese Domäne spezifischer für das KSPV ist als die Domänen B, C und D. Der Ceditest-ELISA erkennt Ak gegen hoch, mäßig und schwach virulente KSPV-Stämme bereits frühzeitig nach einer Infektion. Der Test verfolgt das gleiche Prinzip wie der Bommeli-ELISA. Die einzelnen Strips sind mit dem E2-Protein beschichtet. Der an eine Meerrettichperoxidase gekoppelte mAk, gerichtet gegen die A-Domäne des gp55, kann nur dann an das E2 binden, wenn im Serum keine KSPV-Ak vorhanden sind, woraufhin es zum Farbumschlag kommt. Keine Verfärbung des Chromogens geht vonstatten, wenn Ak in der Probe sind, die an die Platte binden und den markierten Test-Ak verdrängen. Die optische Dichte wird nach dem Abstoppen der Farbveränderung bei 450 nm gemessen.

#### 3.2.4.2.3. *Anti-E<sup>ms</sup>-ELISA “CEDITEST<sup>®</sup>” (Cedi-Diagnostics B. V.)*

Dieser ELISA wurde ursprünglich als diskriminierender Test entwickelt, um mit E2-Subunit-Vakzine geimpfte Tiere nach Infektion zu erkennen. Mit KSPV infizierte Schweine produzieren in erster Linie Ak, die gegen das Hauptimmunogen E2 gerichtet sind, aber auch gegen das E<sup>ms</sup>-Protein sowie NS3 (2-3). Im Gegensatz dazu, bilden mit E2-Subunit-Vakzine bzw. CP7\_E2alf/CP7\_E1E2alf vakzinierte Tiere nur Ak gegen das Hüllprotein E2 des KSPV. Folglich sollte ein diskriminierender Test E<sup>ms</sup>-und NS3-spezifische Ak nachweisen können. NS3 ist aber ein sehr gut konserviertes Protein innerhalb der Spezies der Pestiviren. Darum zeigen NS3-spezifische Ak ein hohes Maß an immunologischer Kreuzreaktivität. Dies hat zur

Konsequenz, dass ein diskriminierender serologischer Test, der auf dem Nachweis von NS3-spezifischen Ak basiert, nicht KSPV-spezifisch ist, weil er Ak im Serum nachweist, die durch Infektionen mit Pestiviren induziert sein können (Edwards et al., 1988, 1991; Paton et al., 1991b, 1991c). Der Ceditest-ELISA zum Nachweis von Serum-Ak gegen das E<sup>ms</sup>-Protein ist laut Herstellerangabe ein sensitiver und spezifischer Test.

Er macht Gebrauch von zwei verschiedenen mAk's, die gegen unterschiedliche Epitope des E<sup>ms</sup>-Proteins von KSPV gerichtet sind. Das im Test verwendete KSPV-E<sup>ms</sup>-Ag geht auf ein rekombinantes, E<sup>ms</sup> enthaltendes Baculovirus zurück.

Der Test basiert auf der Bindungshemmung (blocking) zwischen E<sup>ms</sup>-spezifischen mAk's und dem E<sup>ms</sup>-Protein durch Serum-Ak.

### **3.2.5. Biostatistische Analyse**

Um die verschiedenen Gruppen bei den Stabilitätsuntersuchungen der Impfstämme „C“ und CP7\_E2alf bzw. die Mittelwerte neutralisierender Ak-Titer verschiedener Tiergruppen vergleichen zu können, wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-Rank-Sum-Test (u-Rangtest) ausgewählt. Bei den zu untersuchenden Parametern handelt sich um zwei unabhängige Stichproben, die die gleiche Form haben und aus der gleichen Grundgesamtheit „X“ stammen. Als Signifikanzniveau war  $p < 0,05$  vorgegeben.

Die Ermittlung der Signifikanzdaten erfolgte mit dem Programm SigmaStat<sup>®</sup> 3.0 der Firma SPSS Science Software GmbH. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Excel berechnet.