

Tabelle 9 Prävalenz von PLHV-3 in der Schweinepopulation

(a) Hausschweine

| Gewebe | Herkunft ^a | n | DPOL (P-886s/as) | gB (P-905s/as) | TaqMan (P-1156s/as) |
|-------------------|-----------------------|----|------------------|----------------|---------------------|
| Blut ^b | D | 92 | 47 (51%) | 47 (51%) | 44 (48%) |
| Blut | I | 11 | 7 (63%) | n.u. | 7 (63%) |
| Blut | I | 9 | n.u. | n.u. | 5 (56%) |
| Lunge | D + SP | 32 | 14 (44%) | 16 (50%) | 15 (47%) |
| Milz | D | 33 | 20 (61%) | 17 (52%) | 14 (42%) |
| Lymphknoten | USA | 1 | 1 (100%) | 1 (100%) | n.u. |

(b) Wildschweine

| Gewebe | Herkunft ^c | n | DPOL (P-886s/as) | gB (P-905s/as) | TaqMan (P-1156s/as) |
|-------------|-----------------------|----|------------------|----------------|---------------------|
| Tonsille | D + USA | 29 | 26 (90%) | 23 (79%) | n.u. |
| Knochenmark | D | 20 | 18 (90%) | 18 (90%) | n.u. |
| Milz | D | 2 | 2 (100%) | 2 (100%) | n.u. |

D = Deutschland I = Italien SP = Spanien n.u. = nicht untersucht

^a Das Probenmaterial stammt von Schlacht- und Zuchtschweinen und wurde im Rahmen von Routineschlachtungen, -sektionen oder -blutentnahmen gewonnen

^b Die Blutproben stammen von Schweinen aus insgesamt 16 Betrieben (je mindestens fünf Tiere) in verschiedenen Teilen Deutschlands (Brandenburg, Hessen)

^c Die Wildschweinproben stammen von bei der Jagd erlegten Tieren in Brandenburg/D bzw. Florida/USA

Des Weiteren wurden Hinweise auf den Zelltropismus von PLHV-3 in mononukleären Blutzellen gewonnen [s. Kap. 3.2.4.3].

3.2.3 Charakterisierung der zweiten neuartigen Herpesvirus-Sequenz

Mit der modifizierten Consensus-PCR wurde aus einer Probe (#702) eine Sequenz eines bislang unbekanntes Virus amplifiziert, welches nicht in anderen porcinen Proben nachgewiesen werden konnte. Dieses Sequenzfragment wurde ebenfalls weiteren Untersuchungen unterzogen.

3.2.3.1 Sequenzanalyse des Teilfragmentes der DNA-Polymerase

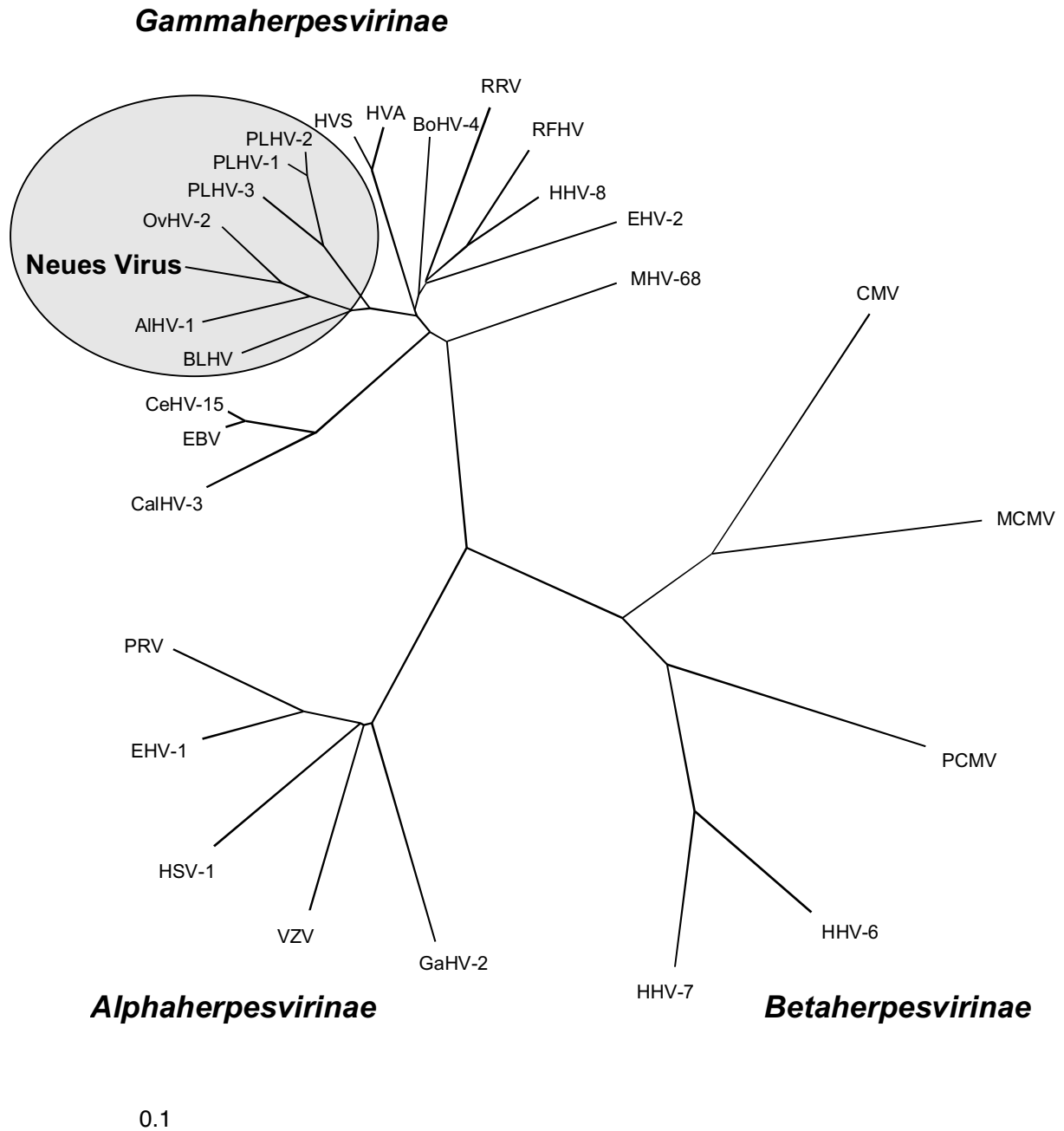
Die Analyse dieser 693 bp (231 aa) umfassenden Sequenz aus der Probe #702 wurde ebenfalls mit der Software MacVector vorgenommen. Der GC-Gehalt liegt bei 56,9%, der Quotient aus erwarteten und vorhandenen CpG-Dinukleotiden beträgt 0,57. Die Homologie auf Aminosäureebene des hier untersuchten Teilfragmentes der DNA-Polymerase zu den am nächsten verwandten Viren ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10 Homologie des neuen Virus zu den am nächsten verwandten Viren

| Virus | OvHV-2 | BLHV | AIHV-1 | PLHV-3 | PLHV-1 | PLHV-2 |
|------------------------|--------|------|--------|--------|--------|--------|
| Homologie ^a | 80% | 74% | 72% | 68% | 66% | 66% |

^a auf Aminosäure-Ebene, erstellt mit dem Programm MacVector

Abbildung 11 Phylogenetische Analyse des neuen Virus



Die phylogenetische Analyse wurde mit Hilfe des PHYLIP-Programmpaketes durchgeführt und basiert auf dem sequenzierten Teilfragment der DNA-Polymerase des neuen Virus (231 aa) sowie der entsprechenden Teilsequenzen der DNA-Polymerasen der dargestellten Viren (α , β , γ)

Es wurde mit Hilfe der Sequenzdaten und dem PHYLIP Programmpaket ein Stammbaum errechnet, der in Abbildung 11 dargestellt ist. Die Sequenz stammt ebenfalls von einem Virus, das zur Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* gehört; es zeigt den höchsten Verwandtschaftsgrad zu OvHV-2 und AlHV-1 und gehört somit auch zu der Gruppe von Klauentierviren, der PLHV-1, -2 und -3 angehören.

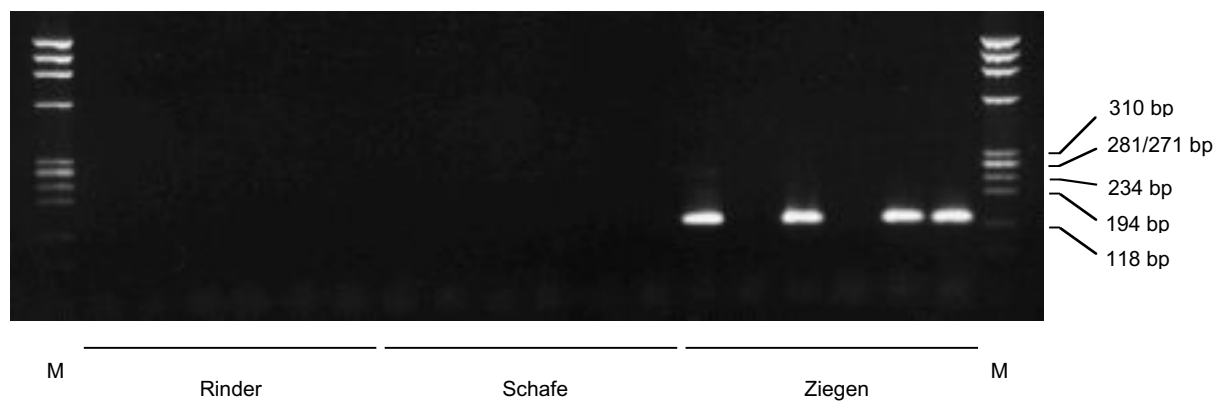
3.2.3.2 Prävalenz des neuen Virus in der Schweinepopulation

Wie bereits erwähnt [S.66 in Kap. 3.2.1.3], konnte dieses neue Virus mit Hilfe der zunächst ausgewählten Primer P-494s/as nicht in den untersuchten porcinen Blut- und Gewebeproben detektiert werden. Lediglich eine weitere Probe des Schweins, dem auch die Probe #702 entnommen worden war (#694, Gehirn), war unzweifelhaft – wenn auch schwächer – positiv für das neue Virus; die übrigen 14 Proben dieses Schweins waren ebenso wie andere porcine Proben negativ. Es wurden deshalb weitere spezifische PCRs etabliert, die (zum Teil zusammen mit den schon vorhandenen Primern) im nested-Format angewendet werden konnten, und mit denen die Proben erneut untersucht wurden. Trotz der dadurch erhöhten Sensitivität verliefen auch diese Untersuchungen negativ. Es war somit nicht möglich, eine Zirkulation dieses Virus in der Schweinepopulation nachzuweisen.

Da das Schwein, dem die viruspositiven Proben entnommen worden waren, in der Klauentierklinik des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin eingestallt war und somit in direktem oder zumindest indirektem Kontakt zu mehreren anderen Tierarten gehalten wurde, wurde die Überlegung angestellt, dass dieses Schwein mit einem von einer anderen Spezies stammenden Virus infiziert sein könnte. Es wurde deshalb begonnen, in anderen Spezies nach dem neuen Virus zu suchen.

3.2.3.3 Untersuchungen zur Bestimmung des Hauptwirtes

Um zu überprüfen, ob das in einem Schweineorgan gefundene Virus ursprünglich von einer anderen Spezies stammt, wurden jeweils sechs Blutproben von Schafen, Ziegen und Rindern genommen, die alle auf dem gleichen Gelände des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin eingestallt waren. Die Auswahl der Tierarten basierte dabei auf der nahen Verwandtschaft des neuen Virus zu den Viren der Wiederkäuer. Die Blutproben wurden im Anschluss mit für das neue Virus spezifischen Primern untersucht. Die Proben der Schafe und Rinder blieben dabei

Abbildung 12 Nachweis des neuen Virus in Blutproben von Rind, Schaf und Ziege

Die Blutproben von jeweils sechs Rindern, Schafen und Ziegen wurden mit einer für das neue Virus spezifischen nested PCR untersucht (1.Runde: P-507s/556as, 2.Runde: P-494s/as) und die Proben auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Als Marker (M) dient ϕ X174 DNA-*Hae* III Digest.

negativ; von den sechs Ziegenblutproben waren jedoch vier positiv (#1280, #1282, #1284, #1285) [s. Abb. 12]. Dieses Resultat konnte unter Verwendung verschiedener Primer verifiziert werden. Um die These zu untermauern, dass das Virus, das in der Probe #702 gefunden wurde, ursprünglich aus der Ziege stammt, wurden weitere Blutproben von Ziegen aus dem Zoologischen Garten Berlin genommen. Auch hier waren zwei von sechs untersuchten Proben positiv [s.Tab. 11]. Eine Sequenzierung aller erhaltenen Banden ergab ein fast identisches Ergebnis zu der aus der Probe #702 bestimmten Sequenz. Lediglich ein Nukleotid war ausgetauscht, was sich aber nicht in der Aminosäuresequenz auswirkt (stille Mutation).

Da bereits ein den *Alphaherpesvirinae* zugehöriges Ziegenvirus bekannt war [22], wurde das neue Virus aufgrund der hier erarbeiteten Ergebnisse als Caprines Herpesvirus 2 (CprHV-2) benannt.

Tabelle 11 Nachweis des neuen Virus in Blutproben von Ziegen aus dem Zoologischen Garten Berlin (Saaneziegen)

| Proben | #1341 | #1342 | #1343 | #1344 | #1345 | #1346 |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PCR-Resultat ^a | - | + | + | - | - | - |

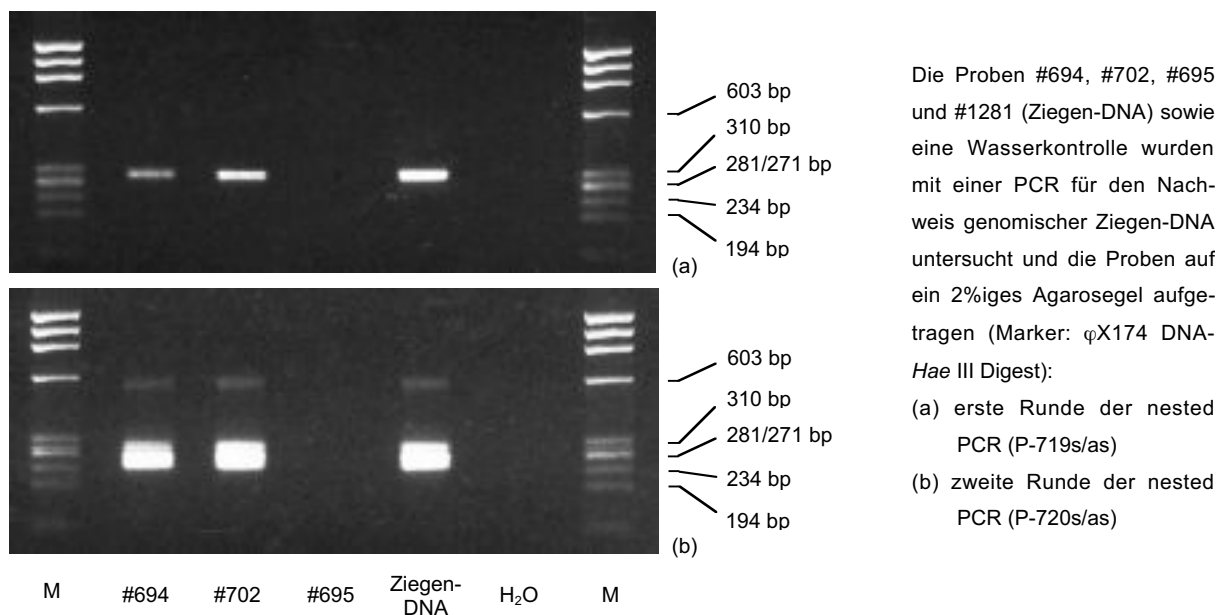
+ = PCR eindeutig positiv

- = PCR negativ

^a die DNA wurde mit der nested Primerpaarung P-556s/as>P-557s/as untersucht

Die Tatsache, dass ein von der Ziege stammendes Virus in einem Schwein detektiert wurde, warf die Frage auf, ob es sich um eine Infektion des Schweins zu dessen Lebzeiten handelte, oder ob die Probe bei der Probennahme in der Sektionshalle mit virushaltigem Ziegenmaterial kontaminiert wurde und das Virus auf diesem Weg in die Probe gelangt war. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine nested-PCR etabliert, mit der das Cytochrom B-Gen der Ziege amplifiziert und damit ein spezies-spezifischer DNA-Nachweis vorgenommen werden kann (P-719s/as + P-720s/as). Die Untersuchung der Proben #702 und #694 mit diesen Primern ergab schon nach der ersten PCR-Runde ein positives Ergebnis, während die ebenfalls von dem betreffenden Schwein stammende Probe #695 selbst im nested-Ansatz negativ blieb [s. Abb. 13]. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die Proben #702 und #694 in der Sektionshalle mit Ziegenewebe verunreinigt wurden und der CprHV-2-Nachweis die Folge dieser Kontamination ist.

Abbildung 13 Nachweis von genomischer DNA der Ziege in den Proben #694 und #702



Da CprHV-2 nicht in der Schweinepopulation nachzuweisen war, im Zusammenhang dieser Arbeit aber nur Viren vom Schwein von Interesse sind, wurden die zu diesem Zeitpunkt laufenden Projekte für eine separate Publikation zu Ende geführt [62]; diese sollen jedoch hier nicht näher erläutert werden.