

5 Zusammenfassung

Entwicklung eines indirekten ELISA zum Nachweis von Infektionen mit potenziell onkogenen Gammaherpesviren beim Schwein als Beitrag zur Virussicherheit in der Xenotransplantation

Ergänzend zum direkten Nachweis von Infektionen mit den erst kürzlich entdeckten "Porzinen lymphotropen Herpesviren Typ 1-3" (PLHV-1, -2 und -3) beim Schwein mittels PCR sollte erstmalig eine indirekte Methode entwickelt werden, mit der PLHV-Infektionen durch Nachweis von Antikörpern im Serum diagnostiziert werden können. Der Vorteil des indirekten Nachweises gegenüber dem direkten ist, dass mit diesem Verfahren auch nicht-virämische und latent-infizierte Tiere erkannt werden, was mit der PCR-Untersuchung von Blutleukozyten nicht möglich ist. Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines Antikörpertestes (ELISA). Der Entwicklung eines ELISA zum serologischen Nachweis von PLHV-Infektionen bei Schweinen kam insofern eine besondere Bedeutung zu, da durch PCR-Untersuchungen festgestellt worden war, dass sich PLHV vermehrt in den Organen aufhält, die am lebenden Tier nur schwer zugänglich sind.

Zum Aufbau des ELISA und für Untersuchungen mittels Western Blot wurden rekombinante Proteine von PLHV erzeugt. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das Glykoprotein B, das für die Gewinnung von Referenzseren in Mäusen sowie zur Beschichtung von Mikrotiterplatten verwendet wurde. Mit dem ELISA wurden Seren von Schweinen unterschiedlicher geographischer Herkunft und verschiedenen Alters untersucht, die sowohl unter konventionellen als auch unter SPF-Bedingungen aufgezogen worden waren. Die beobachtete Seroprävalenz von PLHV bei vier bis sechs Monate alten Schweinen betrug 90-100%. Im Vergleich dazu betrug die Seroprävalenz von drei Wochen alten Ferkeln nur 38%. Auch bei PCR-negativen Schweinen, deren Blutleukozyten durch konventionelle oder quantitative PCR untersucht worden waren, wurden anti-PLHV-gB-Antikörper detektiert. Diese Beobachtung unterstützte das Ergebnis bereits erfolgter PCR-Untersuchungen, wonach sich PLHV mittels PCR vermehrt in den Organen und weniger häufig in den Blutleukozyten nachweisen lässt. Die regelmäßige serologische Untersuchung von zwölf Schweinen vom Tag der Geburt bis zu einem Alter von fünf Monaten zeigte, dass alle Tiere maternale anti-PLHV-Antikörper über das Kolostrum aufgenommen haben, die innerhalb der ersten vier Lebenswochen kontinuierlich abgebaut wurden. Nach diesem Zeitraum nahm der Gehalt an anti-PLHV-Antikörpern wieder zu. Dieser Anstieg kann durch eine Erstinfektion der Ferkel erklärt werden, die darauf mit der Eigensynthese von Antikörpern reagierten. Die Ergebnisse von PCR-Untersuchungen

unterstützten diese Beobachtung. In den ersten zwei Lebenswochen konnte bei keinem Tier Virus-DNA mittels PCR in den Blutleukozyten detektiert werden. In der dritten Lebenswoche waren 17% der untersuchten Tiere PCR-positiv für PLHV, im Folgezeitraum stieg der Anteil auf 42-50%. Diese Beobachtungen sprechen für eine postnatale Infektion mit PLHV. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, PLHV-freie Schweine für die Xenotransplantation zu züchten. Die ELISA-Ergebnisse konnten exemplarisch im Western Blot reproduziert werden. Bei diesen Untersuchungen wurde ein im ORF52 kodiertes Kapsidprotein als weiteres immunogenes PLHV-Protein identifiziert, das für weiterführende serologische Untersuchungen herangezogen werden kann. Um einen ersten Eindruck über mögliche Infektionen in der Xenotransplantation zu bekommen, wurden Humanseren im ELISA und im Western Blot untersucht. Neben Seren gesunder Blutspender wurden Seren von Schlachtern untersucht, die über einen längeren Zeitraum Blut-zu-Blut-Kontakt zu Schweinen hatten und Seren von Xenotransplantierten, denen porcine Inselzellen des Pankreas implantiert worden waren oder deren Blut für mehrere Stunden über einen mit porcinen Leberzellen ausgekleideten Bioreaktor geführt worden war. Weder bei den Schlachtern noch bei den Xenotransplantierten wurden Hinweise für eine PLHV-Infektion gefunden. Allerdings kann eine Empfänglichkeit des Menschen für PLHV nicht mit 100%iger Sicherheit ausgeschlossen werden, weil bei den untersuchten Personengruppen die Kontaktzeiten zu porcinen Blut und Gewebe in allen Fällen nur kurz und die Anzahl implantierter Zellen gering war. Außerdem standen die Xenotransplantierten nicht oder nur unter schwacher Immunsuppression. Diese Bedingungen spiegeln die wirklichen Umstände, wie sie bei der Xenotransplantation ganzer Organe vorliegen, keinesfalls wider, da eine viel größere Zellzahl transplantiert wird und die Patienten viel stärker immunsupprimiert werden. Durch Verwendung transgener Spendertiere besteht zusätzlich die Gefahr, dass die Komplement-vermittelte Virolyse eingeschränkt ist. Der mögliche Übertritt von PLHV aus porcinen Organen auf den Menschen kann deshalb gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden. Allerdings besteht die Möglichkeit, dieses Risiko auf ein Minimum zu reduzieren, indem zukünftige Spendertiere mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden überwacht werden. Damit steht erstmals eine indirekte Methode zum Nachweis von PLHV-Infektionen bei Schweinen zur Verfügung, die ergänzend zur PCR-Untersuchung von Blutlymphozyten und der Milz für diagnostische Zwecke eingesetzt werden kann.

6 Summary

Development of an indirect ELISA for the detection of infections with potential oncogenic gammaherpesviruses in pigs as a contribution to virus safety in xenotransplantation

An antibody-based method for the indirect detection of infections with the “Porcine lymphotropic Herpesviruses 1-3” (PLHV-1, -2 and -3) in pigs was developed, in addition to existing direct virus detection methods. Reproducible detection of PLHV by PCR is only possible in lymphoid organs, but not in the blood. Since organs are of limited accessibility in living pigs, a serological detection method is of particular importance. To achieve this goal, an indirect ELISA was developed. Three different recombinant proteins of PLHV were produced. Among these, the focus was set on the glycoprotein B (gB). It was used as antigen in the ELISA, for confirming Western blot assays and for the production of control antisera in mice. Sera of conventionally reared and SPF-reared pigs from different geographic origins and ages were then examined by ELISA. Pigs in the age of four to six months revealed a PLHV seroprevalence of 90 to 100%, while three weeks old piglets showed a seroprevalence of only 38%. Antibodies against PLHV gB were detected in sera from PCR-positive pigs as well as in pigs which were PCR-negative in their blood. In addition, antibody titers in twelve pigs were followed by ELISA from day of birth until the age of about five months. Antibody titers in newborns can be explained by maternal antibodies, with a constant decline of titers during the first four weeks of life. After this time the antibody level rose again, due to infection with PLHV and development of the piglet’s own antibodies. PCR examinations supported this observation. PBMC of piglets in the age of one to two weeks were PCR negative for PLHV. In the third week, 17% of the piglets were positive. Later on, the percentage rose to 42-50%. Taken together, this data indicates postnatal infection with PLHV, which offer the possibility to rear PLHV-free pigs for xenotransplantation. The results of the investigations by ELISA were controlled by Western blot assays. In these experiments, the capsid protein, which is encoded by ORF52 of the PLHV genome, was also identified as immunogenic. It can therefore additionally be used for serological examinations. To investigate the possibility of PLHV infection in xenotransplantation a panel of human sera was examined by ELISA and Western blot. Besides healthy blood donors, butchers with blood-to-blood contact to pigs, recipients of porcine pancreatic islet cells and patients who were treated by ex-vivo-perfusion of blood through porcine liver cells were investigated. There was no evidence for PLHV infection in humans. Neither the butchers nor the xenotransplanted patients showed any signs of infection with PLHV. However, the susceptibility of humans for PLHV cannot be excluded totally.

The butchers and patients who were examined in this study had only a short contact to porcine blood or to a limited number of porcine cells. Additionally they were not or only weakly immunosuppressed. The circumstances in solid organ xenotransplantation would differ substantially. A larger number of cells would be transplanted and the patients would be strongly immunosuppressed. The usage of genetically modified pigs would pose the additional risk that the complement-mediated virolysis is reduced. Therefore, the inadvertent transfer of PLHV from pig organs to humans can presently not be excluded. To reduce this risk to a minimum, donor animals have to be surveilled constantly with serological assays as presented in this study. This ELISA is the first indirect method which allows the diagnosis of PLHV-infection of pigs, in addition to the examination of PBMC and spleens by PCR.