

## Ergebnisbeschreibung

HPIV3 UV-inaktiviert ( $1186 \pm 351$  pg/ml), das einen signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zu allen Gruppen bis auf B/HPIV3-IP10 und HPIV3 virusstimuliert ( $512 \pm 149$  pg/ml bzw.  $851 \pm 277$  pg/ml) zeigte (Tukey Kramer Test).

Die IL-4 Messung an Tag 21, die dem Versuchsansatz der  $IFN\gamma$  Messung an Tag 21 gleicht, zeigte keine Signifikanz für alle Gruppen und Ansätze mit an der Nachweisgrenze gemessene Werte ähnlich denen an Tag drei. Auf die Darstellung wurde hier verzichtet.

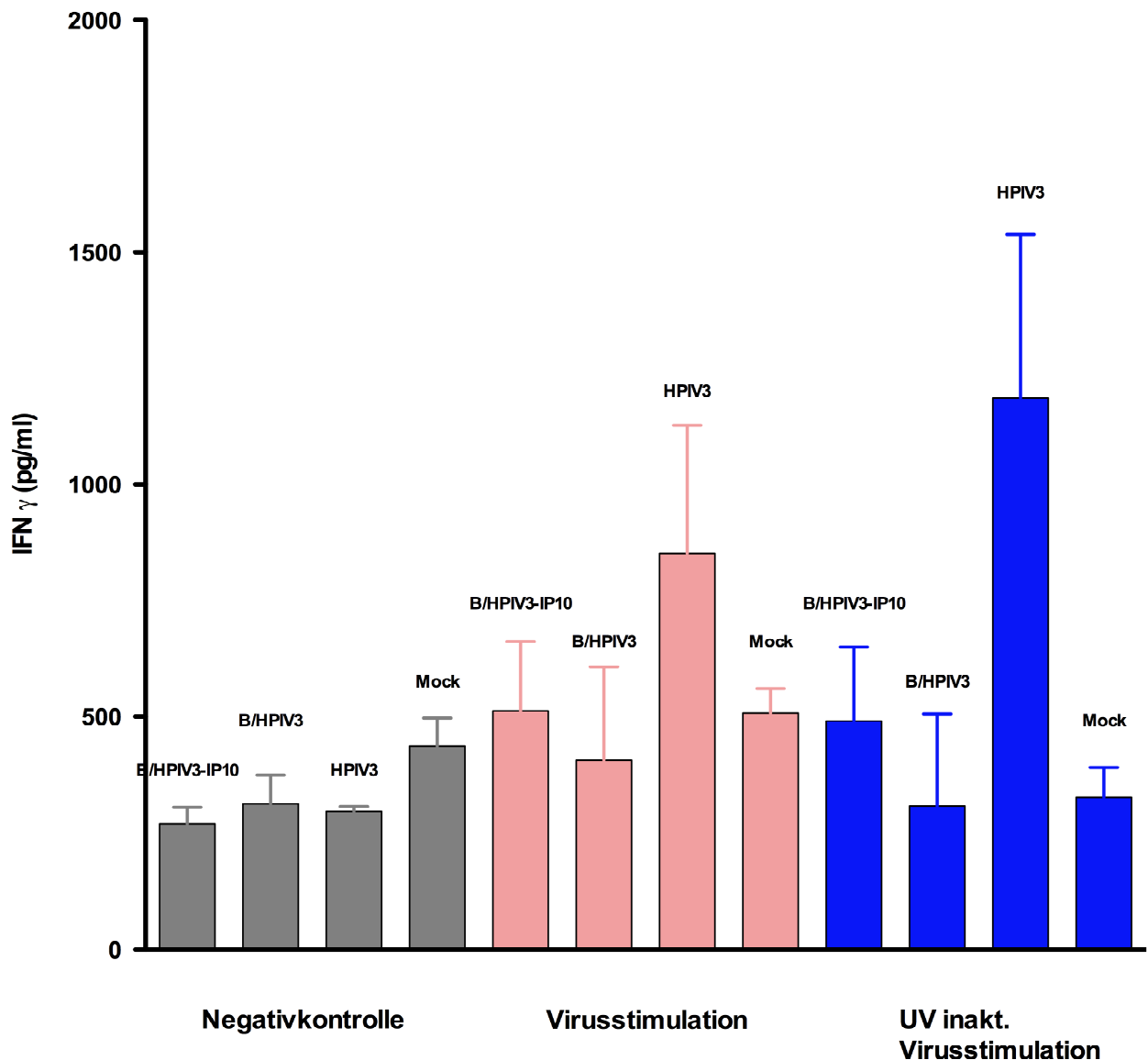
Abb.12 IFN $\gamma$  Bestimmung Tag 21

Abb.12 Zytokinbestimmung nach Stimulation von PBMC an Tag 21. Die mit B/HPIV3-IP10, B/HPIV3, HPIV3 und Mock infizierten Tiere wurden an Tag 21 getötet und die PBMC mit Medium, HPIV3 Wildtyp Virus und UV-inaktiviertem Virus stimuliert. Anschließend erfolgte die Zytokinbestimmung mittels ELISA für IFN  $\gamma$ . HPIV3 der UV-inaktivierten Virusstimulation zeigte einen signifikanten Anstieg zu allen Gruppen bis auf B/HPIV3-IP10 und HPIV3 des virusstimulierten Ansatzes.

### 5.9 Proliferationstest mit PBMC an Tag 21 post infectionem

Die Proliferationsfähigkeit der isolierten PBMC an Tag 21 wurde durch den [ $^3$ H]-Thymidin-Einbau untersucht. Dabei lassen sich nach Stimulation durch Messung des Einbaus radioaktiven Thymidins in Zellen, wie unter Punkt 5.8. beschrieben, Rückschlüsse auf die DNA-Synthese und damit auf die Zellteilung ziehen. Die isolierten PBMC wurden mit Virus, UV-inaktivierten Virus

## Ergebnisbeschreibung

und Medium stimuliert. Nach vier Tagen wurde radioaktives Thymidin dazugegeben und nach weiteren 18 h der Thymidin-Einbau quantifiziert. Auch hier konnten analog zur Zytokinbestimmung in der B/HPIV3 Gruppe Zellen von zwei Tieren nicht ausgewertet werden, da die Anzahl der PBMC unzureichend war.

Zwischen den mit Medium (Negativkontrolle) und virusstimulierten Ansätzen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Im UV-inaktivierten Ansatz zeigte HPIV3 (13281±6124 Counts) als einzigste Gruppe einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu allen Gruppen bis auf B/HPIV3-IP10 und B/HPIV3 im UV-inaktivierten Ansatz (4509±1560 bzw. 2119±1358 Counts). HPIV3 zeigte aber einen Trend zu einem Anstieg im Vergleich zu B/HPIV3-IP10 und B/HPIV3 UV-inaktiviert. B/HPIV3-IP10 zeigte im Vergleich zu B/HPIV3 UV-inaktiviert einen kleinen Trend zu einem Anstieg, unterschied sich aber nicht signifikant (Tukey Kramer Test).

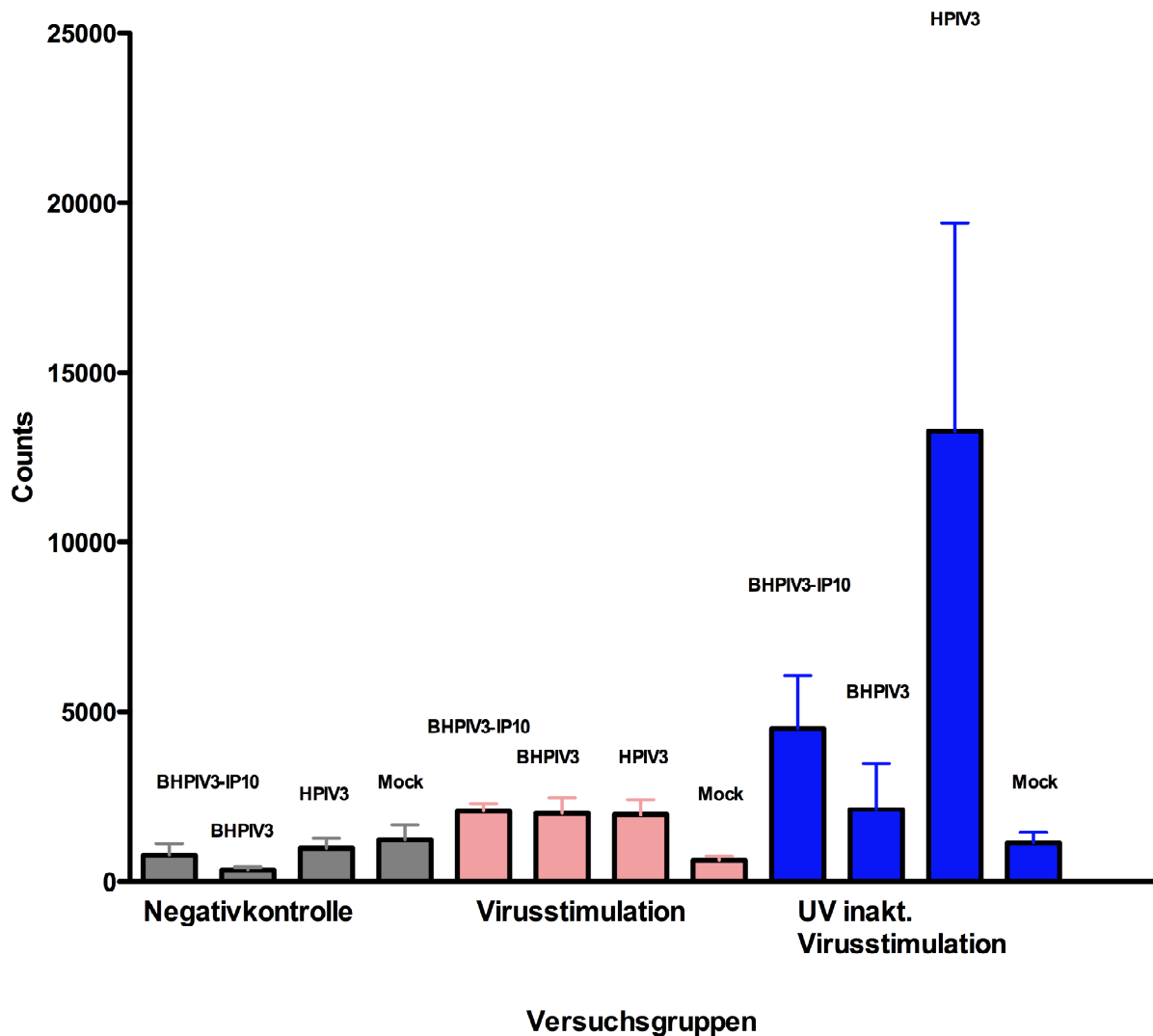
Abb.13 [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau

Abb.13 [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau. Proliferationskinetik der an Tag 21 getöteten Tiere, deren PBMC isoliert und mit HPIV3 Wildtyp Virus, UV-inaktiviertem Virus und Medium stimuliert wurden. Die stimulierten Zellen wurden anschließend mit radioaktiven Thymidin versetzt und der Einbau des Thymidins durch ein Szintillationsgerät gemessen. In dem negativkontroll und virusstimulierten Ansatz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. In dem UV-inaktivierten Ansatz waren die Werte für HPIV3 als Trend zu einem Anstieg im Vergleich zu den B/HPIV3-IP10 und B/HPIV3 Gruppen deutlich erhöht. Die Mock Gruppe zeigte wiederum wie alle anderen Gruppen aus den anderen Stimulationen signifikant niedrigere Werte zu HPIV3 UV-inaktiviert.

## 5.10 Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT)

Der Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT) bestimmt den Titer neutralisierender Antikörper im Serum immunisierter Tiere. Je höher der Titer ist, desto besser wird das Virus



## Ergebnisbeschreibung

neutralisiert. Um den Titer bestimmen zu können wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Seren von Tag 21 p.i. erstellt und die Verdünnung bestimmt, die die Anzahl an Plaques um 50% oder mehr reduzierte.

Abb.14 Neutralisationstiter Bestimmung mit dem Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test

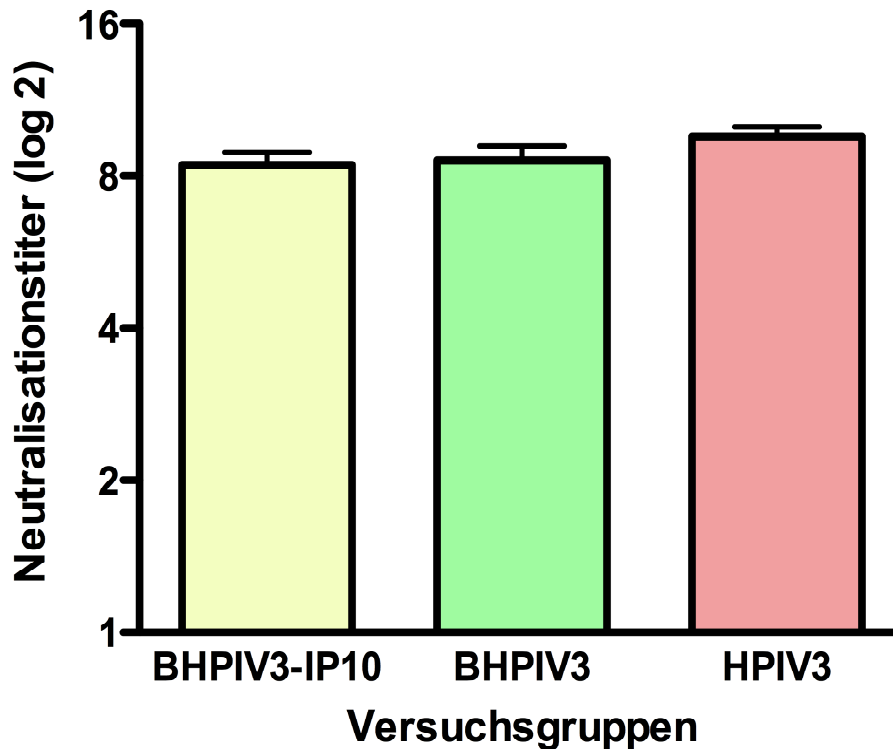


Abb.14 Dargestellt sind die Mittelwerte der Titer, die durch den Plaque-Reduktions-Neutralisations-Tests ermittelt wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den drei Versuchsgruppen (Tukey Kramer Test). Die Negativkontrolle zeigte keine Neutralisation.

Es zeigten sich keine signifikanten Abweichungen für die einzelnen Gruppen. Die logarithmischen Mittelwerte (log<sub>2</sub>) der Titer für die B/HPIV3-IP10, B/HPIV3 und HPIV3 Gruppen lagen bei  $8,4 \pm 0,5$ ,  $8,6 \pm 0,6$  und  $9,6 \pm 0,4$ , respektive.

## 5.11 Histologie

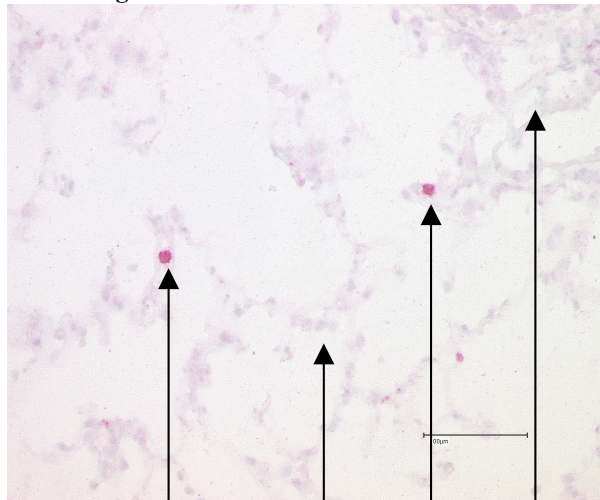
Um die Entzündungsreaktion in der Lunge zu untersuchen, wurden sowohl immunhistologische als auch Haematoxylin und Eosin-Färbungen an Tag 5 nach Infektion durchgeführt. Immunhistologisch wurde die Anzahl aller Lymphozyten mithilfe eines gegen CD3 der Baumwollratte gerichteten Antiserums vom Hasen bestimmt, da das CD3 Antigen auf allen Lymphozyten exprimiert wird.

Für die Detektion wurde ein biotinylierter Esel anti-Hase Antikörper verwendet. Die Farbreaktion erfolgte mit dem Streptavidin AP Kit, bei der die alkalische Phosphatase an das Streptavidin gekoppelt ist und die Detektion über die AP Aktivität mithilfe eines Farbsubstrats geschieht.

Pro Tier wurden positive rot gefärbte Zellen in drei Gesichtsfeldern (GF) der 10x Vergrößerung ausgezählt. Erst wurden die Werte pro Tier ermittelt, dann der Mittelwert aller Tiere gebildet und auf eine Fläche von  $F=0,651\text{mm}^2$  bezogen. In der Gruppe B/HPIV3 konnten aufgrund von Aufarbeitungsverlusten nur vier Schnitte berücksichtigt werden.

Die HE-Färbung wurde nach der konventionellen Methode für Haematoxylin und Eosin (HE)-Färbungen durchgeführt. Verglichen wurden hier Art und Form des zellulären Infiltrats und die Dicke der Alveolarsepten.

Abbildung 15a B/HPIV3



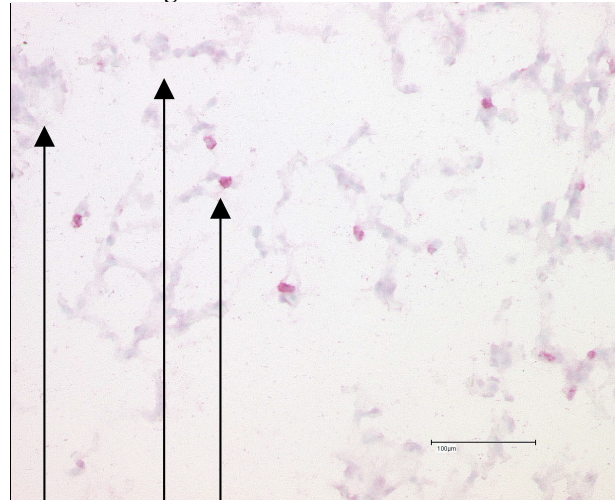
A

D

A

B

Abbildung 15b HPIV 3



C

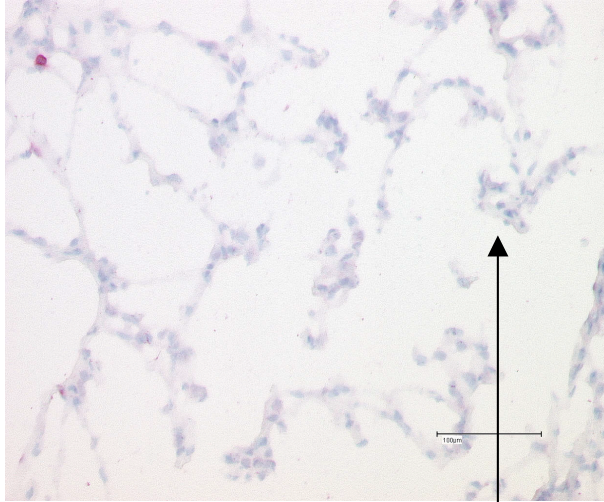
D

A

Abb.15a,b Abgebildet sind exemplarisch immunhistologische Bilder in der 20x Vergrößerung (100µm Balken im Bild), der mit B/HPIV3 (links) und HPIV3 (rechts) infizierten Tiere. Eine Farbumsetzung des Substrats (*Fast Red*) durch die alkalische Phosphatase macht die CD3<sup>+</sup> Zellen sichtbar (Pfeil A). Links ist eine eher unauffällige Lungenstruktur mit wenig positiven T-Zellen zu sehen. Im rechten oberen Quadranten ist ein zelluläres Infiltrat (Pfeil B) zu erkennen. Die Septen sind zart und die Architektur eher unauffällig, jedoch zeigt sich in beiden Abbildungen leichte Hyperplasie von Typ2 Pneumozyten, die im B/HPIV3 verstärkt ist (Pfeil D)(Abb.15a). Das rechte Bild zeigt eine erhöhte Zelldichte mit ebenso zarten Septen und ein im linken oberen Quadranten angedeutetes zelluläres Infiltrat (Pfeil C)(Abb 15b).

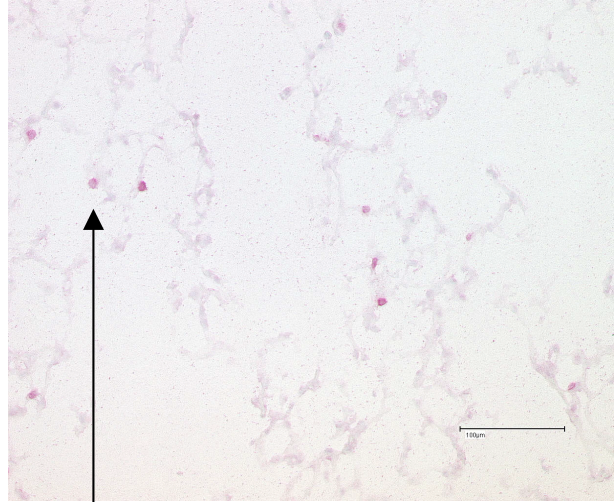
## Ergebnisbeschreibung

Abbildung 16a Mock



D

Abbildung 16b B/HPIV3-IP10



A

Abb.16a,b Abgebildet sind die immunhistologischen Bilder in der 20x Vergrößerung (100 μm Balken im Bild), der mit Medium (links) und B/HPIV3-IP10 (rechts) infizierten Tiere. Eine Farbumsetzung des Substrats (*Fast Red*) durch die alkalischer Phosphatase macht die CD3<sup>+</sup> Zellen sichtbar (Pfeil A). Auf dem linken Bild (16A) sieht man eine spärliche Zelldichte mit unauffälliger und regelrechter Alveolararchitektur, jedoch starker Hyperplasie von Typ 2 Pneumozyten. Das rechte Bild ist von der Architektur mit dem linken Bild vergleichbar, jedoch ist die Zellzahl weitaus größer, die Zahl der Typ 2 Pneumozyten aber geringer.



## Ergebnisbeschreibung

Abbildung 17 HPIV3

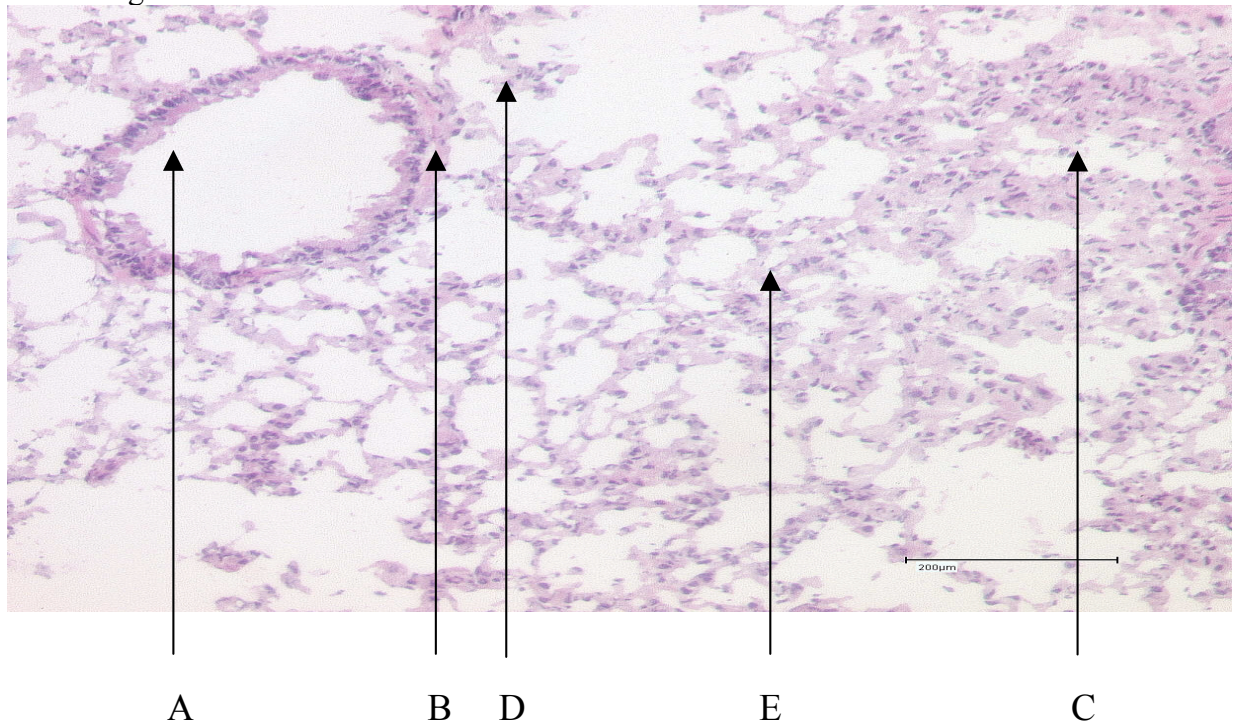


Abbildung 18 B/HPIV3

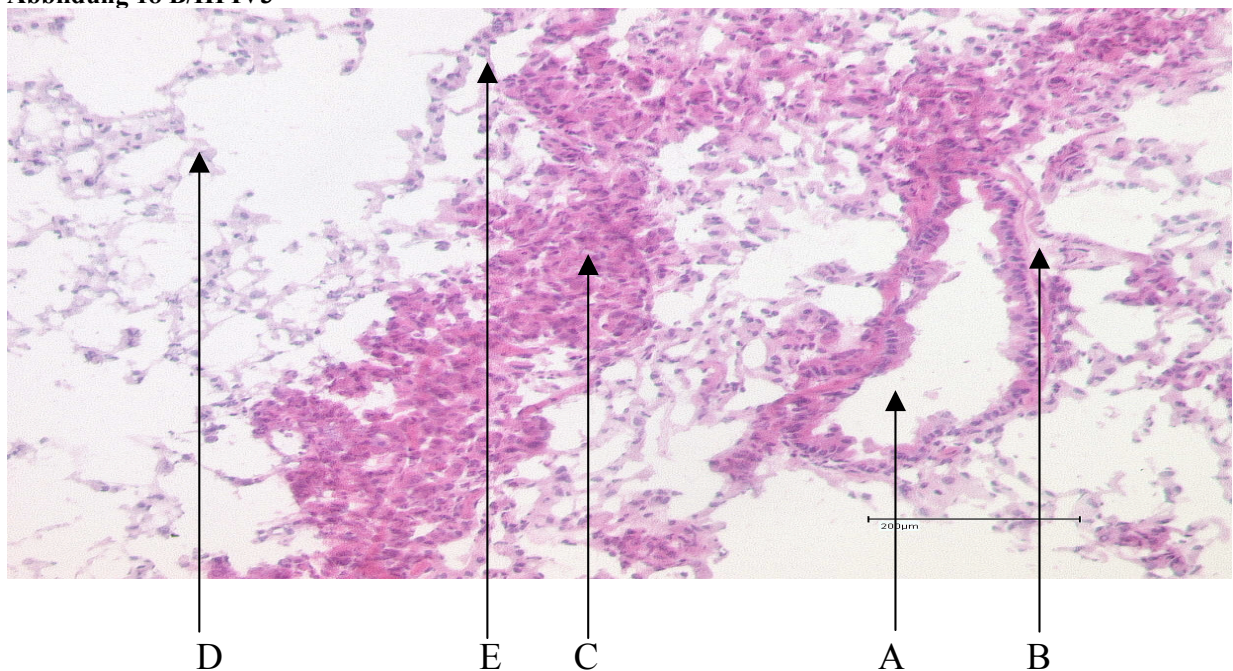


Abb.17 und 18: Abgebildet sind die HE Bilder in der 10x Vergrößerung (200μm Balken im Bild) der mit B/HPIV3 (unten) und HPIV3 (oben) infizierten Tiere. Das untere Bild zeigt einen angeschnittenen Bronchiolus mit hyperplastischem Epithel (Pfeil A) und Zeichen einer Peribronchiolitis (Pfeil B). Angrenzend befinden sich fokale entzündliche Infiltrate (Pfeil C), Zeichen einer Alveolitis mit zellulären Infiltraten in den Alveolen (Pfeil D) und einer



## Ergebnisbeschreibung

interstitiellen Pneumonie (Pfeil E). Die übrige Lungenarchitektur scheint nur wenig verändert zu sein. Das obere Bild zeigt auch einen angeschnittenen Bronchiolus mit hyperplastischem Epithel (Pfeil A), Zeichen einer Peribronchiolitis (Pfeil B) und zellulär entzündlichem Infiltrat (Pfeil C). Weiterhin sind auch hier Zeichen einer Alveolitis (Pfeil D) und interstitiellen Pneumonie (Pfeil E) zu erkennen. Die Entzündung wirkt hier jedoch im Gesamtbild diffus, generalisierter und nicht so umschrieben wie im unteren Bild. Die Alveolarsepten sind auf beiden Bildern im entzündlichen Gebiet stark verdickt.

**Abbildung 19 B/HPIV3-IP10**

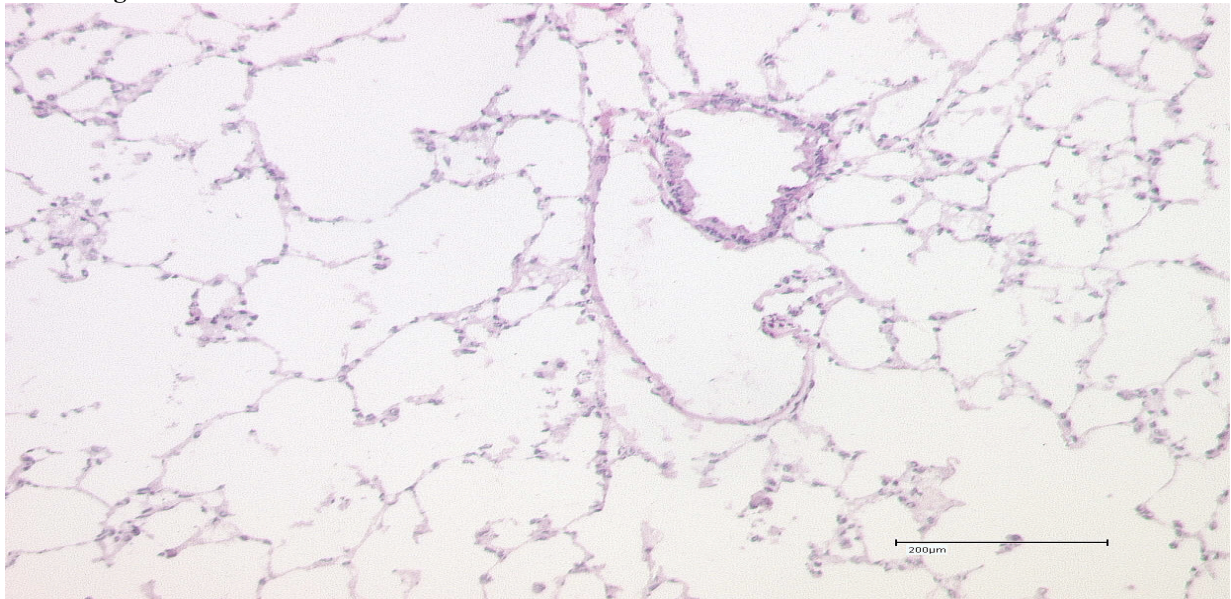


Abb.19 Abgebildet ist das HE -Bild in der 10x Vergrößerung (200µm Balken im Bild) der mit B/HPIV3-IP10 infizierten Tiere. Das Bild zeigt auch einen angeschnittenen Bronchiolus mit unauffälligem Epithel und Alveolarstruktur.

**Abbildung 20 Mock**

