

# Versuche zur Entwicklung eines kompetitiven ELISAs zum Nachweis des pestiviralen Core-Proteins



**Zwaantje Anna Maria Andreoli**

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem  
Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Tillmann Rügenapf

# **Versuche zur Entwicklung eines kompetitiven ELISAs zum Nachweis des pestiviralen Core-Proteins**

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Zwaantje Anna Maria Andreoli**

Tierärztin aus Waldkirch

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Tillmann Rügenapf  
Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Tag der Disputation: 06.07.2012

**für Claus  
und  
meine Familie**

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherheit guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Zwaantje Andreoli

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ag	Antigen
AG	Arbeitsgruppe
Ak	Antikörper
AK	Aujeszký'sche Krankheit
AS	Aminosäure
$\alpha$	anti
BVD	Bovine Virus Diarrhoe
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe Virus
BDV	Border Disease Virus
cDNS	komplementäre DNS
c-ELISA	kompetitiver ELISA
CSFV	Classical Swine Fever Virus
CTB-ELISA	Complex-Trapping-Blocking-ELISA
C-Stamm	Chinese-Strain
c-terminal	carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
°C	Grad Celsius
D-Ak	Detektionsantikörper
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated individuals
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach der Infektion
$\Delta$	Deletion
HCV	Hepatitis C Virus
ELISA	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET	Endtag
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
kb	Kilobasenpaar
KSPV	Virus der Klassischen Schweinepest
KSP	Klassische Schweinepest
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFT	Immunfluoreszenz
IRES	Interne-Ribosomen-Eintritts-Stelle
iv	intravenös
Jiv	J-Domain protein interacting with viral protein
mAk	monoklonaler Antikörper
MD	mucosal disease
min	Minute

MLV	modifizierte Lebendvakzine
NaAc	Natrium-Acetat
NaCl	Natriumchlorid
nAk	neutralisierender Antikörper
NaHCO <sub>3</sub>	Natrium-Carbonat
NS	Nichtstrukturprotein
N-terminal	amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
NTR	Nicht-translatierte Regionen
OD	Optische Dichte
OIE	Office Internationale des Epizooties
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Protektive Dosis
PFA	Paraformaldehyd
pi	post infectionem
PI	prozentuale Inhibition
PLA	Immunperoxidase
PMS	Porzines Myokarditis Syndrom
pv	post vakzinationem
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SK	swine kidney
SP	Signalpeptidase
SPP	Signalpeptidpeptidase
TMB	Tetramethylbenzidine
VNT	Virus-Neutralisationstest
YFP	Yellow Fluorescent Protein

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Klassische Schweinepest	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Klinik	2
1.1.2.1	Akute Verlaufsform	2
1.1.2.2	Chronische Verlaufsform	3
1.1.2.3	Verlaufsform mit KSP-Persistenz	3
1.1.3	Pathogenese	4
1.1.4	Bekämpfung	5
1.1.4.1	Impfung gegen die klassische Schweinepest	6
1.2	Pestiviren	8
1.2.1	Taxonomie	8
1.2.2	Andere pestivirale Erkrankungen	8
1.2.3	Molekularer Aufbau	9
1.2.4	Der pestivirale Infektionszyklus	11
1.3	Labordiagnose der klassischen Schweinepest	12
1.3.1	Direkte Nachweismethoden	12
1.3.2	Indirekte Nachweismethoden	13
1.3.3	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay	13
1.3.3.1	Indirekter ELISA	14
1.3.3.2	Kompetitiver ELISA	15
1.4	Markervakzinen gegen die klassische Schweinepest	17
1.5	Das Core-Protein	21
1.6	Core ist nicht essentiell	22
1.7	Ziel dieser Arbeit	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Material	25

2.1.1	Antigene.....	25
2.1.2	Antikörper.....	25
2.1.2.1	Detektionsantikörper .....	25
2.1.2.2	Sekundärantikörper .....	25
2.1.3	Seren.....	26
2.1.3.1	Positives Kontrollserum .....	26
2.1.3.2	Negatives Kontrollserum.....	26
2.1.3.3	Seren aus dem Tierversuch .....	26
2.1.3.4	Negativ-Seren.....	27
2.1.4	Chemikalien und Puffer.....	27
2.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.6	Geräte.....	28
2.1.7	Eingesetzte Puffer und Lösungen.....	29
2.1.7.1	Beschichtungspuffer.....	29
2.1.7.2	Blockierungspuffer.....	29
2.1.7.3	Wasch- und Verdünnungspuffer .....	29
2.1.7.4	Zwischenfixation.....	29
2.1.7.5	Farblösung.....	30
2.1.7.6	Stopplösung.....	30
2.2	Methoden .....	31
2.2.1	Durchführung eines indirekten ELISAs .....	31
2.2.2	Durchführung eines kompetitiven ELISAs .....	32
2.2.3	Auswertung eines ELISAs.....	33
2.2.3.1	Messung der optischen Dichte .....	33
2.2.3.2	Berechnung der prozentualen Inhibition.....	34
2.2.3.3	Berechnung des „cut-off“-Wertes .....	34
2.2.3.4	Berechnung der Spezifität .....	34
2.2.3.5	Berechnung der Sensitivität .....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Auswahl der wichtigsten Komponenten .....	39
3.1.1	Auswahl von Detektionsantikörper, Antigen und Serum.....	39
3.1.1.1	Auswahl des Detektionsantikörpers.....	39
3.1.1.2	Auswahl des Antigens.....	41

3.1.1.3	Auswahl der Seren .....	41
3.1.2	Auswahl der Konzentrationen und Verdünnungen .....	41
3.1.2.1	Auswahl der Antigenkonzentration.....	41
3.1.2.2	Auswahl der Konzentration des Detektionsantikörpers .....	42
3.1.2.3	Auswahl der Serumverdünnung.....	44
3.1.2.4	Auswahl der Verdünnung des Zweit-Antikörpers .....	45
3.1.3	Auswahl weiterer Bestandteile .....	46
3.1.3.1	Auswahl der Mikrotiter-Platten.....	46
3.1.3.2	Auswahl der Pufferlösungen .....	46
3.1.3.3	Auswahl der Blockierungslösung.....	46
3.1.3.4	Bestimmung der Anzahl der Waschschrte .....	46
3.1.3.5	Ausschluss unspezifischer Bindungen .....	47
3.1.3.6	Zwischenfixation.....	47
3.2	Untersuchung der Testseren.....	48
3.2.1	Verlaufskontrolle der C-Stamm-Gruppe .....	48
3.3	Optimierung der Versuchsbedingungen.....	50
3.3.1	Beschichtung der Mikrotiterplatten.....	51
3.3.2	Optimierung der Blockierung.....	51
3.3.3	Inkubationsbedingungen der Seren .....	51
3.3.3.1	Inkubationstemperatur.....	51
3.3.3.2	Inkubation auf dem Schüttler .....	52
3.3.3.3	Inkubationszeit .....	53
3.3.3.4	Änderung der Mengenverhältnisse.....	53
3.3.4	Inkubationsbedingungen des Detektionsantikörpers .....	54
3.3.4.1	Inkubationszeit .....	54
3.3.4.2	Gleichzeitige Inkubation der Seren mit dem Detektionsantikörper .....	54
3.3.4.3	Gleichzeitige Inkubation der Seren mit Detektions- und Zweit-Antikörper .....	55
3.3.5	Inkubationsbedingungen des Zweit-Antikörpers.....	56
3.3.6	Verwendung eines Dritt-Antikörpers .....	56
3.3.7	Durchführung des ELISAs nach Abschluss der Optimierung.....	58
3.4	Untersuchung der Testseren.....	59
3.4.1	Verlaufskontrolle der C-Stamm-Gruppe .....	59
3.4.2	Verlaufskontrolle der KSPV $\Delta$ Core pCR85-Gruppen .....	60

3.5	Validierung des ELISAs .....	61
3.5.1	Negativ-Seren .....	61
3.5.2	Bildung des „cut-off“-Wertes .....	62
3.5.3	Bestimmung von Spezifität und Sensitivität .....	63
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1	Konzept der $\Delta$ Core-Markervakzine .....	64
4.2	Bewertung der Ergebnisse .....	65
4.3	Systeme zum Nachweis spezifischer Wildtyp-Antikörper sind essentielle Bestandteile der Markerimpfstoff-Entwicklung .....	68
4.4	Vergleich der $\Delta$ Core-Vakzine mit anderen DIVA-Konzepten .....	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Klassische Schweinepest

### 1.1.1 Epidemiologie

Die klassische Schweinepest (KSP) ist eine der wirtschaftlich bedeutendsten Schweinekrankheiten und wird durch das Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) ausgelöst. Sie unterliegt in Deutschland der Anzeigepflicht und wurde von der Office Internationale des Epizooties (O.I.E.) bis 2004 in der Liste A geführt. Diese Einteilung der O.I.E. wurde allerdings aufgegeben, so dass mittlerweile alle Tierseuchen in einer einheitlichen Liste geführt werden. Ausschließlich Haus- und Wildschweine zählen zu den natürlichen Wirten und erkranken an der KSP (Laddomada, 2000). Die Krankheit ist weltweit von Bedeutung, sowohl durch direkte Auswirkungen der Krankheit in betroffenen Gebieten, als auch durch Bedrohung in Gebieten, in denen die Seuche bereits ausgeremert wurde (Vandeputte & Chappuis, 1999). Sie tritt gehäuft in Ländern mit intensiver Schweinehaltung auf.

Eine Übertragung kann direkt und indirekt erfolgen (Terpstra, 1987). Der Hauptweg der Virusausbreitung ist die direkte Übertragung des KSPV von infizierten auf empfängliche Schweine, aber auch die Verfütterung nicht ausreichend erhitzter Küchenabfälle oder Kontakt zu kontaminierten Fahrzeugen und Personen kann zur Infektion führen (Ribbens et al., 2004). Mit Hilfe experimenteller Infektionen in Ställen mit mehreren Abteilen konnte außerdem die Übertragung durch die Luft nachgewiesen werden (Laevens et al., 1998). Nachträgliche Untersuchungen der Übertragungsraten bezüglich der KSP-Epidemie in den Niederlanden (1997-1998) ergaben als häufigste Übertragungsursache den Transport lebender Tiere, gefolgt von Transportfahrzeugen und Personenkontakt (Stegeman et al., 2002).

Eine wichtige Infektionsquelle für Hausschweine sind infizierte Wildschweine (Dahle & Liess, 1992; Kaden, 1998; Fritzemeier et al., 2000). Sie spielen eine große Rolle in der Epidemiologie der KSP. Durch diaplazentare Übertragung des KSPV entstandene persistent infizierte Ferkel führen zur Ausbreitung des Virus in der Population. Zusammen mit einer hohen Wildschweindichte ist dadurch eine Aufrechterhaltung und Ausbreitung des Virus möglich (Kern et al., 1999), was eine ständige Infektionsgefahr für Hausschweine darstellt. Die letzten Fälle der Wildschweinepest wurden im Januar und Februar 2009 in Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz verzeichnet.

## **1.1.2 Klinik**

Das klinische Erscheinungsbild der klassischen Schweinepest kann sehr variabel sein. Die Ausprägung der unspezifischen Symptome ist von mehreren Faktoren abhängig. Eine entscheidende Rolle spielt die Virulenz des beteiligten Virus (Terpstra, 1987). Auch das Alter sowie der Immunstatus der betroffenen Tiere beeinflussen den Verlauf der Infektion (Thiel et al., 1996; Moennig, 2000; Moennig et al., 2003). Die Inkubationszeit in Einzeltieren beträgt etwa eine Woche, aber auch längere Zeiträume sind möglich.

Grundsätzlich können drei Verlaufsformen der KSP unterschieden werden (Liess, 1986).

### **1.1.2.1 Akute Verlaufsform**

Vor allem Absatzferkel und junge Mastschweine sind nach Infektion mit moderaten oder hochvirulenten KSPV-Stämmen von der akuten Verlaufsform betroffen. Sie zeigen zunächst hohes Fieber (häufig über 41°C), Apathie, verminderte Futteraufnahme und Konjunktividen (Dunne, 1970; Blome, 2006). Hinzu kommen Atembeschwerden wie Husten und Niesen, sowie geschwollene Lymphknoten und Obstipation (van Oirschot, 1999a). Diese geht im weiteren Verlauf in schweren Durchfall über. Zentralnervöse Störungen in Form von Hinterhandschwäche, unkoordinierten Bewegungen oder Krämpfen können auftreten (Moennig et al., 2003). Die Spätphase der Erkrankung ist oft durch Hämorrhagien gekennzeichnet. Hiervon betroffen ist meist die Haut im Bereich von Ohren, Schwanz, Gliedmaßen und Unterbauch (van Oirschot, 1999a; Moennig et al., 2003). Innerhalb von 10 bis 20 Tagen nach Infektion kommt es zum Tod der betroffenen Tiere.

Die Infektion mit dem KSPV führt außerdem zu einer massiven Lymphopenie. Durch die damit einhergehende Immunsuppression spielen auch bakterielle Sekundärinfektionen eine wichtige Rolle (Depner et al., 1994; Laevens et al., 1999; Moennig et al., 2003). Sie können zu einer Überlagerung von Symptomen führen, was eine Diagnose zusätzlich erschwert.

Neben der typischen akuten Verlaufsform kommt es auch zu perakuten und subakuten, bzw. transienten Verläufen. Bei jungen Ferkeln kann eine perakute Verlaufsform zum plötzlichen Tod nach einer kurzen Fieberphase führen (Dunne, 1970; Blome, 2006). Bei älteren Mastschweinen oder Zuchttieren, sowie bei Infektionen mit schwach virulenten Virusstämmen kommen transiente, oft subklinische Verläufe vor. Die betroffenen Tiere bilden eine

effektive Immunantwort aus, so dass es nach einer kurzen Phase mit milden klinischen Symptomen zur Genesung kommt. Diese Form wird auch als „atypische“ Verlaufsform bezeichnet, da die klinischen Symptome nicht auf eine KSPV-Infektion hindeuten (Dahle & Liess, 1992; Depner et al., 1996a; Blome, 2006).

### **1.1.2.2 Chronische Verlaufsform**

Die chronische Verlaufsform kommt häufig bei Infektionen mit moderat virulenten KSPV-Stämmen vor (van Oirschot, 1999a). Sie entsteht, wenn betroffene Tiere nicht in der Lage sind, eine effektive Immunantwort auszubilden. Die Krankheitsdauer liegt bei mehr als 30 Tagen (Mengeling & Packer, 1969; Blome, 2006). Betroffene Tiere können mehrere Monate überleben, die chronische Form der KSP endet jedoch immer tödlich (Mengeling & Packer, 1969; van Oirschot, 1999a; Moennig et al., 2003). Im Verlauf der Erkrankung wechseln sich Phasen der akuten klinischen Erkrankung und der Besserung ab (Depner et al., 1996a; Depner et al., 1996b). Zu den Symptomen zählen neben Apathie und Fressunlust auch intermittierendes Fieber, Hautveränderungen sowie chronische Enteritiden. Bei Jungtieren führt die chronische Verlaufsform zu einer gestörten Entwicklung und zum Kümern (van Oirschot, 1999a; Moennig et al., 2003).

### **1.1.2.3 Verlaufsform mit KSP-Persistenz**

Persistente Infektionen entstehen, indem das KSPV die Plazentaschranke tragender Sauen überschreitet (van Oirschot & Terpstra, 1977). Die Infektion der Sau verläuft häufig mild oder subklinisch. Die Folgen für den Fetus hingegen sind abhängig vom Zeitpunkt der Trächtigkeit sowie von der Virulenz des Virus (Moennig & Plagemann, 1992). Infiziert sich eine Muttersau im frühen Stadium der Trächtigkeit mit dem KSPV, so kommt es zu Aborten, bzw. Totgeburten, Mumifikationen und Missbildungen. Zur Geburt persistent-infizierter Ferkel kann eine Infektion zwischen dem 50. und 70. Tag der Trächtigkeit führen (van Oirschot & Terpstra, 1977; Meyer et al., 1981; Moennig et al., 2003). Bei Geburt können diese Ferkel gesund erscheinen, im weiteren Verlauf entwickeln sie jedoch die sogenannte Spätform („late onset“), die tödlich endet. Zu den klinischen Symptomen zählen Wachstumsstörungen, Kümern, Konjunktivitiden, Hautentzündungen sowie Bewegungsstörungen. Betroffene Tiere können bis zu elf Monate überleben. Durch die konstante Ausscheidung großer Mengen an Virus stellen sie als Virusreservoir eine große Infektionsgefahr für andere Schweine dar

(van Oirschot & Terpstra, 1977; Blome, 2006). Dies spielt wie oben bereits erwähnt in der Wildschweinpopulation eine entscheidende Rolle. Infektionen nach dem 85. Tag der Trächtigkeit führen zur Geburt von nicht-virämischen Ferkeln (Frey et al., 1980; Moennig & Plagemann, 1992).

Vergleichbar ist diese Situation mit der Bovinen Virus Diarrhoe (BVD) bei Rindern. Auch hier kann es durch Infektionen während der Trächtigkeit zur Geburt persistent infizierter Kälber kommen.

### **1.1.3 Pathogenese**

Die Infektion mit dem KSPV erfolgt meist oronasal (Dunne et al., 1959; van Oirschot & Terpstra, 1989), aber auch die künstliche Besamung, bzw. der Deckakt stellen mögliche Infektionswege dar (de Smit et al., 1999; Floegel et al., 2000).

Die ersten infizierten Zellen nach oronasaler Aufnahme sind die Epithel- und Kryptenzellen im Bereich der Tonsillen (Ressang, 1973a; Liess et al., 1974; van Oirschot & Terpstra 1989). 48 Stunden nach der Infektion (p.i.) ist der Nachweis von Antigen in den germinalen Zentren der Tonsillen möglich. Antigen-aktivierte B-Lymphozyten sind bereits 72 Stunden p.i. vorhanden (Jamin et al., 2008). Die primären Zielzellen des Virus sind Monozyten und Makrophagen. Die Infektion führt zu deren Aktivierung und der massiven Produktion von Zytokinen (Gómez-Villamandos et al., 2001; Sánchez-Cordón et al., 2002; Sánchez-Cordón et al., 2005a). Dies führt im Laufe der Infektion zur Apoptose der Lymphozyten. Diese ist nicht auf den direkten Kontakt mit dem Virus zurückzuführen, sondern auf die Zytokine (Sánchez-Cordón et al., 2005b; Summerfield et al., 2006). Aus der entstehenden Lymphopenie resultiert auch eine Immunsuppression, die zu Sekundärinfektionen führen kann. Die aktivierten Makrophagen geben außerdem platelet activating factor (PAF) ab. Es kommt nach einer massiven Aktivierung von Thrombozyten zur Bildung von Thrombozytenaggregaten (Bautista et al., 2002; Núñez et al., 2005). Die Folge dieser Verbrauchskoagulopathie ist eine Thrombopenie.

Der Nachweis von Virus im Blut ist nach 16-24 Stunden nach Infektion möglich (Ressang, 1973b), im Knochenmark erst 2 Tage nach Infektion. Durch Apoptose der hämatopoetischen Zellen kommt es zu einer schweren Atrophie des Knochenmarks, was den Mangel an Thrombozyten und Lymphozyten im peripheren Blut noch verstärkt (Gómez-Villamandos et al., 2003; Summerfield et al., 2000).

Auch im Darm kommt es zur Aktivierung von Makrophagen und zur Apoptose von Lymphozyten. Intestinale nekrotische Läsionen erklären die klinischen Beschwerden der Tiere (Sánchez-Cordón et al., 2003).

### **1.1.4 Bekämpfung**

Die Bekämpfung der klassischen Schweinepest wird durch zahlreiche Gesetze geregelt:

- Verordnung zum Schutz gegen die klassische Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest (Schweinepest-Verordnung) vom 29.09.2011
- Verordnung zum Schutz vor der Verschleppung der Schweinepest (Schweinepest-Schutzverordnung) vom 06.04.2006
- Verordnung über hygienische Anforderungen beim Halten von Schweinen (SchweinehaltungsHygiene-Verordnung) vom 17.06.2009
- Verordnung zum Schutz gegen die Verschleppung von Tierseuchen im Viehverkehr (Viehverkehrsverordnung) vom 03.03.2010
- Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz vom 09.12.2010

Im Folgenden soll näher auf die Schweinepest-Verordnung eingegangen werden. Sie verbietet grundsätzlich Heilversuche an seuchenkranken und seuchenverdächtigen Schweinen, sowie Impfungen gegen die klassische Schweinepest. Im Einzelfall können jedoch Impfungen für wissenschaftliche Versuche und Impfstoffprüfungen durch die zuständige Behörde genehmigt werden (§2).

Schutzmaßnahmen werden unterschieden nach „vor amtlicher Feststellung“ (§4) und „nach amtlicher Feststellung“ (§5-14).

#### *Vor amtlicher Feststellung:*

Bei Verdacht auf klassische Schweinepest in einem Betrieb muss eine klinische, virologische und serologische Untersuchung der Schweine, sowie eine Überprüfung des Bestandsregisters und der Kennzeichnung der Schweine erfolgen. Bei Anhaltspunkten für einen Ausbruch der Schweinepest folgt die Tötung und unschädliche Beseitigung aller Schweine des Verdachtsbetriebes. Außerdem werden epidemiologische Nachforschungen durchgeführt (§4).

*Nach amtlicher Feststellung :*

Nach amtlicher Feststellung der klassischen Schweinepest in einem Betrieb und der öffentlichen Bekanntmachung (§5) ordnet die zuständige Behörde die Genotypisierung des Erregerisolates an. Außerdem folgt die Tötung und unschädliche Beseitigung der nicht bereits vor amtlicher Feststellung getöteten Schweine des Betriebes. Auch Material von Schweinen (Fleisch, Fleischerzeugnisse, Sperma, Eizellen und Embryonen), das zwischen Einschleppung und amtlicher Feststellung gewonnen wurde, muss unschädlich beseitigt werden (§6).

Die Genehmigung von Ausnahmen bezüglich Untersuchungseinrichtungen, Zoos oder Wildparks ist möglich, sofern eine Ausbreitung des Seuchenerregers ausgeschlossen werden kann (§8).

Des Weiteren wird um den betroffenen Betrieb ein Sperrbezirk (Radius von mindestens 3 Kilometern), und ein Beobachtungsgebiet (Radius von Sperrbezirk und Beobachtungsgebiet zusammen mindestens 10 Kilometer) festgelegt. Detaillierte Vorschriften regeln die Vorgehensweisen in beiden Regionen (§11).

**1.1.4.1 Impfung gegen die klassische Schweinepest**

Zwar ist die Impfung nach §2 der Schweinepest-Verordnung ausgeschlossen, dennoch kann für ein bestimmtes Gebiet eine Notimpfung angeordnet werden, falls die Schweinepest amtlich festgestellt und eine Ausbreitung zu befürchten ist. Hierbei werden alle Einzelheiten, z.B. Kennzeichnung der zu impfenden Schweine, in einem Impfplan festgelegt, sowie genaue Anweisungen für das Impfgebiet beschrieben (§13). Auch bei Verdacht auf oder Ausbruch der klassischen Schweinepest bei Wildschweinen regelt die Schweinepest-Verordnung alle Vorgehensweisen, einschließlich der Einrichtung eines gefährdeten Bezirkes und einer Notimpfung (§14).

Zur Anwendung kam dies nach Auftreten der Wildschweinepest zu Beginn des Jahres 2009 in Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz. Nach Genehmigung durch die EU kam eine Notimpfung in Form einer Lebendvakzine zum Einsatz.

Dieser hochwirksamen und sicheren Lebendvakzine liegt der C-Stamm (Chinese-Strain) zugrunde, der durch Passage in Zellkultur attenuiert wurde (Terpstra, 1978; OIE, 2008). Die Anwendung im Rahmen der Wildschweinepest in Deutschland erfolgt oral (van Oirschot 2003a; Moennig et al., 2003; Tignon et al., 2010). Eine parenterale Applikation ist aber auch möglich (Beer et al., 2007). Innerhalb weniger Tage bildet sich eine solide Immunität, die lebenslang anhält (van Oirschot, 2003a; van Oirschot, 2003b) und die Tiere bei korrekter

Anwendung vor Infektion und Erkrankung schützt (Penrith et al., 2011). Um die Bildung von Virus-Carriern in geimpften Tieren nach Kontakt mit dem Feldvirus zu vermeiden, ist eine minimale Dosis von 100 PD50 (protektive Dosis 50) nötig (Leunen & Strobbe, 1977). Ein grundsätzlicher Nachteil der Lebendvakzinen ist die nicht auszuschließende Restvirulenz und Möglichkeit der Reversion zum pathogenen Wildtyp. Trotzdem spielen sie eine wichtige Rolle in der Kontrolle und Eradikation viraler Infektionen (Meeusen et al., 2007).

Ziel der Notimpfung gegen die Schweinepest ist im Gegensatz zu einer Schutzimpfung nicht der Schutz der geimpften Tiere, sondern die Verhinderung einer weiteren Ausbreitung. Allerdings verschleiert die Notimpfung durch die entstehende Seroprävalenz die Präsenz von Wildtypvirus. Diese Verschleierung wird als Argument verwendet, um internationale Handelssperren einzurichten (de Smit, 2000; Greiser-Wilke & Moennig, 2004; Kortekaas et al., 2010). Die Tatsache, dass eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren nicht möglich ist (van Oirschot, 2003b; Beer et al., 2007; OIE, 2008; Tignon et al., 2010; Penrith et al., 2011), ist auch der Grund für das in der EU seit den 90er Jahren bestehende Impfverbot (Vandeputte & Chappuis, 1999; Moennig et al., 2003; Greiser-Wilke & Moennig, 2004).

## 1.2 Pestiviren

### 1.2.1 Taxonomie

Pestiviren gehören zur Familie der Flaviviridae, die außerdem die Genera Flavivirus und Hepacivirus beinhaltet (Horzinek, 1991). Zu den Pestiviren zählen wiederum die Spezies Bovines Virus Diarrhoe Virus 1 und 2 (BVDV-1, BVDV-2), Border Disease Virus (BDV) der Schafe, Klassisches Schweinepest Virus (KSPV), sowie ein Isolat aus der Giraffe (Becher et al., 2003; Fauquet et al., 2005; Rümenapf & Thiel, 2008). In Australien wurde außerdem 2003 als neue Spezies das Bungowannah-Virus nachgewiesen, welches das Porcine Myocarditis Syndrom (PMS) auslöst (Kirkland et al., 2007; Finlaison et al., 2010). Des Weiteren existieren die Isolate „Hobi“, „Antilope“, sowie die „tunesischen Isolate“, die durch das International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) bisher nicht klassifiziert wurden (Rümenapf & Thiel, 2008).

### 1.2.2 Andere pestivirale Erkrankungen

Da Pestiviren ausschließlich Paarhufer infizieren, sind außer Schweinen auch Wiederkäuer von pestiviralen Erkrankungen betroffen.

Die Bovine Virus Diarrhoe (BVD) unterliegt seit 2004 wie die Klassische Schweinepest (KSP) in Deutschland der Anzeigepflicht und ist in der Tierseuchenliste der OIE aufgeführt. Mit ihrem meist subklinischen oder milden Verlauf löst die BVD Symptome wie Fieber, reduziertes Allgemeinbefinden und Diarrhoe aus (Baker, 1987; Braun et al., 1996). Sekundärinfektionen werden durch die entstehende Lymphopenie und damit einhergehende Immunsuppression begünstigt und können zu Atemwegserkrankungen führen (Potgieter et al., 1985). BVDV-2 wurde in Kanada als Auslöser des Hämorrhagischen Syndroms mit Thrombozytopenien und sehr hoher Mortalität beschrieben (Pellerin et al., 1994; Ridpath & Bolin, 1995). Von epidemiologisch großer Wichtigkeit ist die Fähigkeit des BVDV die Plazentaschranke zu passieren und kongenitale Infektionen auszulösen. Je nach Zeitpunkt der Infektion in der Trächtigkeit kommt es zu Aborten oder der Geburt persistent infizierter Kälber (PI) (Liess et al., 1974; Nettleton & Entrican, 1995). In diesen PI-Tieren findet keine spezifische Immunantwort statt, eine Virämie und die kontinuierliche Ausscheidung von

großen Mengen Virus sind die Folge (Liess et al., 1974). Entsteht in virämischen Tieren durch Rekombination des viralen Genoms ein zytopathogener Biotyp des BVDV, kommt es zum Ausbruch der stets letal verlaufenden Mucosal Disease (MD) (Liess et al., 1974; McClurkin et al., 1985; Meyers et al., 1997; Corapi et al., 1988; Nettleton & Entrican, 1995).

Nicht nur Rinder, sondern auch Schweine können von einer BVDV-Infektion betroffen sein. Die damit einhergehenden Symptome, wie Wachstumsstörungen und Kümmerern, sind denen der chronischen Schweinepest sehr ähnlich (Terpstra & Wensvoort, 1988; Liess & Moennig, 1990).

Schafe und Ziegen sind von dem Border Disease Virus (BDV) betroffen. Die Krankheit ist weltweit von Bedeutung und seit 1959 bekannt (Nettleton et al., 1998). Bei den Mutterschafen kommt es zu reduzierter Produktionsleistung in Form von Unfruchtbarkeit und Aborten (Vantsis et al., 1979; Nettleton et al., 1998). Infizierte Lämmer zeigen Tremor und Missbildungen („hairy shaker disease“) (Meyers & Thiel, 1996; Nettleton et al., 1998). Außerdem sind auch enterale Manifestationen möglich (Nettleton & Entrican, 1995).

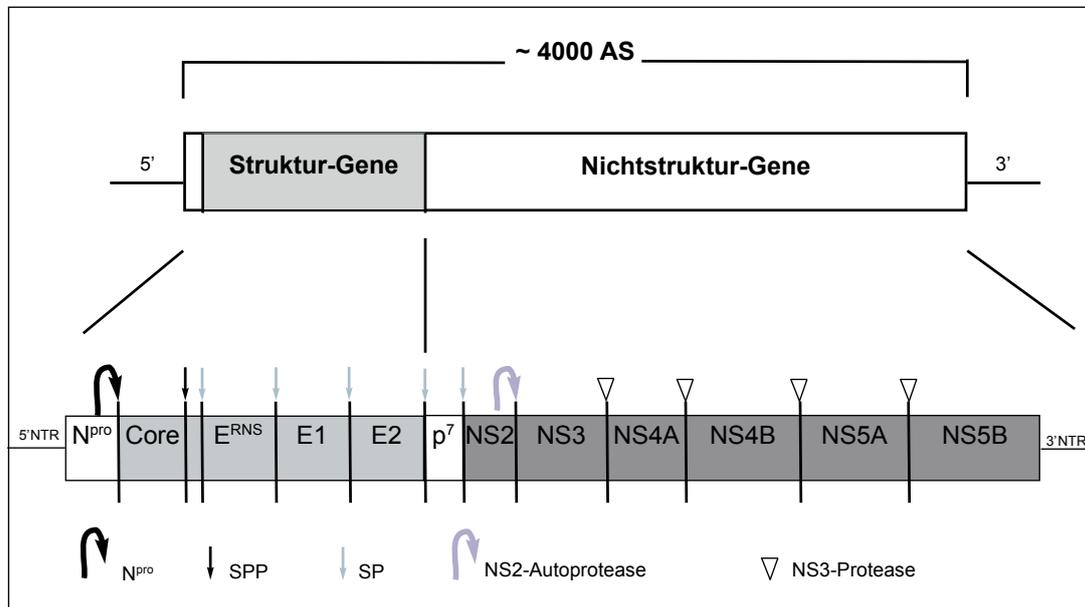
Das erst 2003 in Australien identifizierte Bungowannavirus führt bei Schweinen zum Porcinen Myokarditis Syndrom (PMS), es kommt zu einem Anstieg der Totgeburtenrate (Kirkland et al., 2007; Finlaison et al., 2010).

### 1.2.3 Molekularer Aufbau

Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von 40-60nm (Horzinek et al., 1967; Enzmann & Weiland, 1978; Lindenbach et al., 2007). Sie verfügen über eine von der Zelle stammende Lipidmembran, in der virale Glykoproteine verankert sind. Diese Lipidhülle umgibt das Nukleokapsid, das aus dem viralen Genom und dem Core-Protein gebildet wird (Horzinek et al., 1971; Rümenapf et al., 1991; Lindenbach et al., 2007).

Das pestivirale Genom hat eine Größe von 12,3 kb; das BVDV-Genom kann allerdings durch Insertion und Duplikation eine Größe von bis zu 16,5 kb erreichen (Meyers & Thiel, 1996). Das Genom besteht aus Einzelstrang-RNS positiver Polarität, das für einen offenen Leserahmen kodiert (Collett et al., 1988a; Moennig, 1992). Zwei nicht-translatierte Regionen (NTR) bilden das 5'- bzw. das 3'-Ende, wobei das 5'-Ende über eine „Interne-Ribosomen-Eintrittsstelle“ (IRES) verfügt. Hierüber erfolgt die Initiation der Translation (Poole et al., 1995; Rijnbrand et al., 1997; Kolupaeva et al., 2000). Durch die Translation entsteht das virale Polyprotein, das etwa 4000 Aminosäuren (AS) umfasst (siehe Abb. 1).

Durch virale und zelluläre Proteasen wird es co- und posttranslational in die 12 viralen Proteine gespalten (Collett et al., 1988a; Collett et al., 1988b; Rümenapf et al., 1993; Stark et al., 1993).



**Abb. 1: Struktur des pestiviralen Genoms und Prozessierung des Polyproteins**  
(Nach: Rümenapf & Thiel, 2008; Molecular biology of pestiviruses)

Das Polyprotein kann in mehrere Fraktionen unterteilt werden. Auf das N-terminale N<sup>pro</sup> folgen die Strukturproteine. Dazu zählen das Core-Protein, sowie die Glykoproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2. Auf das p7 folgt die Fraktion der Nicht-Strukturproteine mit den Proteinen NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Der C-Terminus bildet den Abschluss des Polyproteins.

NTR = nicht translatierte Region; SPP = Signalpeptidase; SP = Signalpeptidase

Am N-terminalen Ende des Polyproteins befindet sich das Protein N<sup>pro</sup>. Es existiert nur im Genus Pestivirus und bildet durch seine Autoprotease-Aktivität den N-Terminus des nachfolgenden Core-Proteins (Rümenapf et al., 1993, Stark et al., 1993). Die Abspaltung des Core erfolgt wie beim Hepatitis-C-Virus durch die Signalpeptidase (SPP) (McLauchlan et al., 2002; Heimann et al., 2006). Zusammen mit den 3 nachfolgenden Glykoproteinen E<sup>ms</sup> („ribonuclease secreted“), E1 und E2 bildet das Core-Protein die Fraktion der Strukturproteine. Das E<sup>ms</sup> ist das einzige bisher bekannte virale Strukturprotein, das über eine RNase-Aktivität verfügt (Schneider et al., 1993; Hulst et al., 1994). Die Freisetzung der Strukturproteine sowie des darauffolgenden p7 erfolgt durch die Spaltaktivität der Signalpeptidase (SP) (Rümenapf et al., 1993; Lin et al., 1994; Elbers et al., 1996; Harada et al., 2000). Auf das p7 folgt die Fraktion der Nicht-Struktur-Proteine. Hierzu zählen NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. NS3 verfügt über 2 funktionelle Domänen, eine N-terminale Protease und eine C-terminale Helikase (Bazan & Fletterick, 1989; Gorbalenya et al., 1989). Die Serin-Protease führt zusammen mit dem Cofaktor NS4A zur Prozessierung

von NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (Wiskerchen & Collett, 1991; Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997), während NS3 durch die autoproteolytische Aktivität des NS2 abgespalten wird (Lackner et al., 2004). Als Cofaktor von NS2 agiert das zelluläre Jiv (J-domain protein interacting with viral protein). Es kontrolliert die Replikation und ist essentiell für die Bildung von persistenten Infektionen (Lackner et al., 2005).

Gegenüber Äther, Chloroform und Detergenzien reagieren Pestiviren als behüllte Viren empfindlich. Sauren pH-Werten begegnen sie allerdings mit einer bemerkenswerten Toleranz (Depner et al., 1992; Krey et al., 2005).

#### 1.2.4 Der pestivirale Infektionszyklus

Am ausführlichsten wurde bisher der Infektionszyklus des BVDV beschrieben. Als Rezeptor auf der Zelloberfläche dient dem BVDV das CD46. Es handelt sich dabei um ein Oberflächenmolekül, das der Zelle Schutz vor Schäden durch das Komplementsystem bietet (Maurer et al., 2004). Der LDL-Rezeptor ist hingegen nicht am Eintritt des BVDV in die Zelle beteiligt (Krey et al., 2006). Auch die Strukturproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2 spielen in diesem Zusammenhang eine große Rolle. Während E<sup>ms</sup> beim Viruseintritt in die Zelle keine Bedeutung hat, ist das Vorhandensein von E1-E2-Heterodimeren, durch Interaktion der Transmembrandomänen der Proteine gebildet, für den Eintritt essentiell (Ronecker et al., 2008). Die Aufnahme des BVDV in die Zelle erfolgt über Clathrin-vermittelte Endozytose. Die Fusion der viralen Hülle mit der Membran des Endosoms wird über eine Absenkung des pH-Wertes im Endosom initiiert (Krey et al., 2005). Danach wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma abgegeben. In der Nähe des endoplasmatischen Retikulums (ER) finden Transkription und RNS-Replikation statt. Die Viruspartikel werden vermutlich durch budding an der ER-Membran gebildet.

Pestiviren verfügen über einen dualen Mechanismus zur Hemmung von Superinfektionen (superinfection exclusion). Er bietet mit BVDV infizierten Zellen Schutz vor einer Infektion mit homologem BVDV, jedoch nicht vor Infektion mit heterologem vesikulärem Stomatitis Virus. Bei Kontakt des superinfizierenden Virus mit der Zelle wird durch intrazelluläre Expression von E2 der Viruseintritt gehemmt. Außerdem wird die Replikation des superinfizierenden Virus gehemmt (Lee et al., 2005; Tscherne et al., 2008).

### 1.3 Labordiagnose der klassischen Schweinepest

Aufgrund der variablen Symptomatik in Abhängigkeit von Virulenz des Virus, sowie Alter und Immunstatus der infizierten Tiere (Moennig, 2000), ist anhand der klinischen und pathologischen Befunde lediglich ein Verdacht auf Infektion mit dem KSPV möglich. Untersuchungen im Labor sind daher unbedingt erforderlich, um eine eindeutige Diagnose stellen zu können (Greiser-Wilke et al., 2007; OIE, 2008; Penrith et al., 2011). Zum Einsatz kommen einerseits direkte Methoden zum Nachweis von Virus, Antigen (Ag) oder viralen Nukleinsäuren oder indirekte Verfahren, die durch Detektion von KSPV-spezifischen Antikörpern (Ak) eine bestehende oder vorangegangene Infektion anzeigen (de Smit, 2000; Blome et al., 2006; Greiser-Wilke et al., 2007; OIE, 2008).

#### 1.3.1 Direkte Nachweismethoden

Die Virusisolierung in Zellkultur ist zwar zeitaufwändig, war aber dennoch lange Zeit der Goldstandard des Virusnachweis (Blome et al., 2006; Greiser-Wilke et al., 2007). Da das KSPV keine zytopathogenen Effekte zeigt, sind zur Detektion in Zellkultur indirekte Methoden in Form von Immunfluoreszenz (IFT) oder Immunperoxidase (PLA) notwendig. Eine schnellere Methode ist der Nachweis von viralem Antigen in gefrorenen Gewebeproben. Auch hier erfolgt eine Detektion durch IFT oder PLA (Greiser-Wilke et al., 2007; OIE, 2008; Penrith et al., 2011). Beide Verfahren ermöglichen durch Anwendung spezifischer monoklonaler Antikörper eine Unterscheidung sowohl zwischen Feld- und Impfstämmen, als auch zwischen KSPV und anderen Pestiviren (Wensvoort et al., 1986; Wensvoort et al., 1989; Edwards et al., 1991; OIE, 2008). Zur schnellen Diagnose in lebenden Tieren empfiehlt sich ein Antigen-Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay (Ag-capture-ELISA), wobei die Möglichkeit einer automatischen Durchführung besteht. Für Einzelproben nicht geeignet, kommt er in der Überwachung (Screening) von Herden zum Einsatz. Im Vergleich von 7 Sandwich-ELISAs zum Nachweis verschiedener KSPV-Antigene (E<sup>ms</sup>, E2, NS3) waren alle in der Lage, eine KSPV-Infektion zu Beginn der Fieberphase (9-14 Tage nach Infektion) zu erkennen. Bezüglich der Detektion einer frühen Virämie ergab jedoch die Virusisolierung eine höhere Sensitivität (Depner et al., 1995). Ein ebenso schnelles und gleichzeitig sehr sensitives Verfahren ist der Nachweis von viraler Nukleinsäure mittels Reverse-

Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Sie zählt mittlerweile zur Routinediagnostik der KSP. Auch hier ermöglicht eine automatische Durchführung die Untersuchung einer großen Probenanzahl. Nachteilig ist allerdings die Anfälligkeit für falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse (Greiser-Wilke et al., 2007; OIE, 2008).

### **1.3.2 Indirekte Nachweismethoden**

Ca. 2-3 Wochen nach einer Infektion mit KSPV kommt es zur Bildung von spezifischen, lebenslang persistierenden Antikörpern, die gegen die viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine gerichtet sind. Die indirekten Verfahren beruhen auf dem Nachweis dieser Antikörper (de Smit, 2000; Greiser-Wilke et al., 2007). Sie sind essentiell für die Detektion von Infektionen mit niedrig-virulentem Virus, im Rahmen von Eradikationsprogrammen zur Aufdeckung restlicher Infektionsherde, aber auch zur Aufrechterhaltung des internationalen Status „KSPV-frei“ (OIE, 2008). Am zuverlässigsten ist der auf Zellkultur basierende Virus-Neutralisationstest (VNT). Durch seinen erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand ist er aber nur für kleine Probenzahlen geeignet. Während eine Unterscheidung zwischen Infektionen mit KSPV und anderen Pestiviren möglich ist, kann zwischen Antikörpern aus Feldinfektionen und solchen aus einer Immunisierung mit modifizierten Lebendvakzinen (MLV) nicht differenziert werden (Greiser-Wilke et al., 2007). Eine schnelles und einfaches Screening von großen Probenzahlen ist mit dem Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) möglich (Depner et al., 1995; Colijn et al., 1997; Greiser-Wilke et al., 2007), wobei der indirekte durch den kompetitiven ELISA (c-ELISA) abgelöst wurde (OIE, 2009).

### **1.3.3 Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay**

Die Grundlage für das Prinzip eines Enzym-Linked-Immunosorbent-Assays ist die Antigen-Antikörperreaktion des Immunsystems. Mithilfe des ELISAs kann man je nach Aufbau des Detektionssystems Antigene oder Antikörper nachweisen. Das Grundprinzip eines ELISAs (indirekt und kompetitiv) zum Nachweis von Antikörpern wird im Folgenden dargestellt.

Verschiedene Reagenzien werden nacheinander in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, wobei für jedes Reagenz eine bestimmte Inkubationszeit eingehalten werden muss. Zwischen den einzelnen Schritten wird mit einem speziellen Puffer gewaschen, um ungebundene Reagenzien zu entfernen.

### 1.3.3.1 Indirekter ELISA

Zunächst wird das Antigen pipettiert, das an den Boden der Vertiefung bindet. Danach wird ein zu testendes Serum dazugegeben, das an das Antigen bindende Antikörper enthält. Als dritter Schritt wird ein Enzym-gekoppelter Sekundär-Antikörper dazugegeben, der selektiv an die gebundenen Serum-Antikörper bindet. Das danach zugegebene Substrat wird von dem Enzym des Sekundär-Antikörpers umgesetzt. Die so ausgelöste Farbreaktion wird nach einer bestimmten Inkubationszeit gestoppt. Die Intensität des Farbsignals ist dabei proportional zur Menge der Antikörper im Serum (siehe Abb. 2).

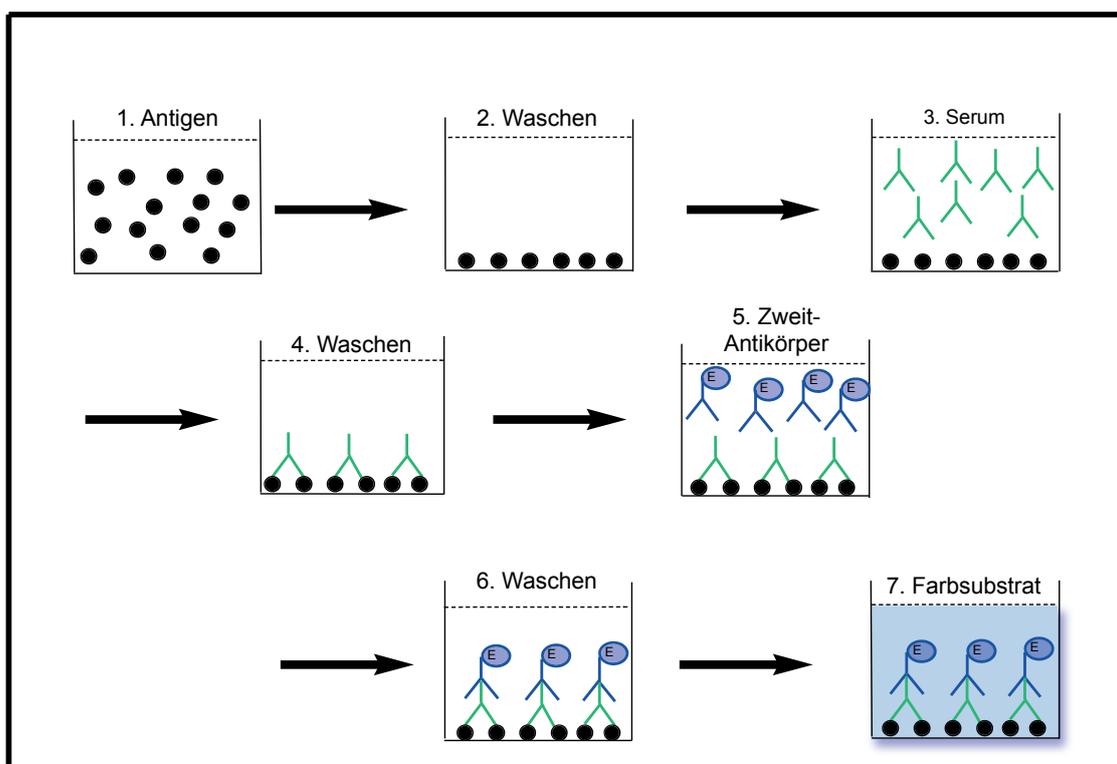


Abb. 2: Schematische Darstellung eines indirekten ELISAs

### 1.3.3.2 Kompetitiver ELISA

Das Prinzip eines kompetitiven ELISAs besteht in der Konkurrenz der Serum-Antikörper mit einem Detektionsantikörper um die Bindungsstellen am Antigen. Die entscheidende Rolle spielt dabei die Wahl des Detektionsantikörpers, dessen Epitop konserviert sein muss und bei allen Tieren die Bildung von Antikörpern bewirkt.

Wie beim indirekten ELISA wird zunächst das Antigen und anschließend das zu testende Serum inkubiert. Bei einem negativen Serum, das keine Antikörper gegen das an die Platte gebundene Antigen enthält, findet folglich auch keine Bindung von Serum-Antikörpern an das Antigen statt. Nach dem Serum wird der spezifische monoklonale Antikörper (Detektionsantikörper) dazugegeben, der an das gebundene Antigen binden kann. Der danach zugegebene Sekundär-Antikörper bindet ausschließlich an die monoklonalen Antikörper. Wie beim indirekten ELISA wird durch Zugabe von Substrat die Farbreaktion ausgelöst. Die Intensität des Farbsignals ist dabei umgekehrt proportional zur Menge der Antikörper im Serum. Ein negatives Serum löst also eine starke Farbreaktion aus und umgekehrt (siehe Abb. 3).

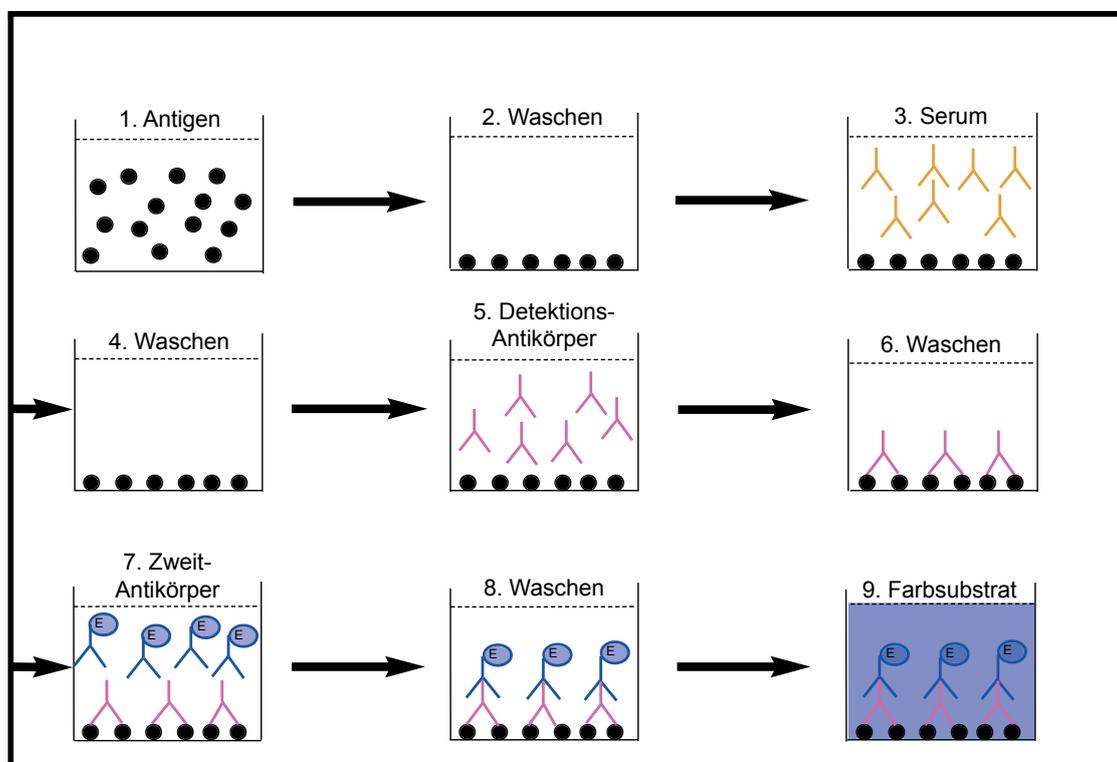


Abb. 3: Schematische Darstellung der Reaktion eines negativen Serums im kompetitiven ELISA

Bei einem positiven Serum können die enthaltenen Antikörper an das an die Platte gebundene Antigen binden. Die Bindung des anschließend zugegebenen Detektionsantikörpers an das Antigen ist allerdings nicht möglich, da die Bindungsstellen bereits durch Serum-Antikörper besetzt sind. Auch der Sekundär-Antikörper kann nicht binden und folglich findet nach Substratzugabe auch keine Farbreaktion statt (siehe Abb. 4).

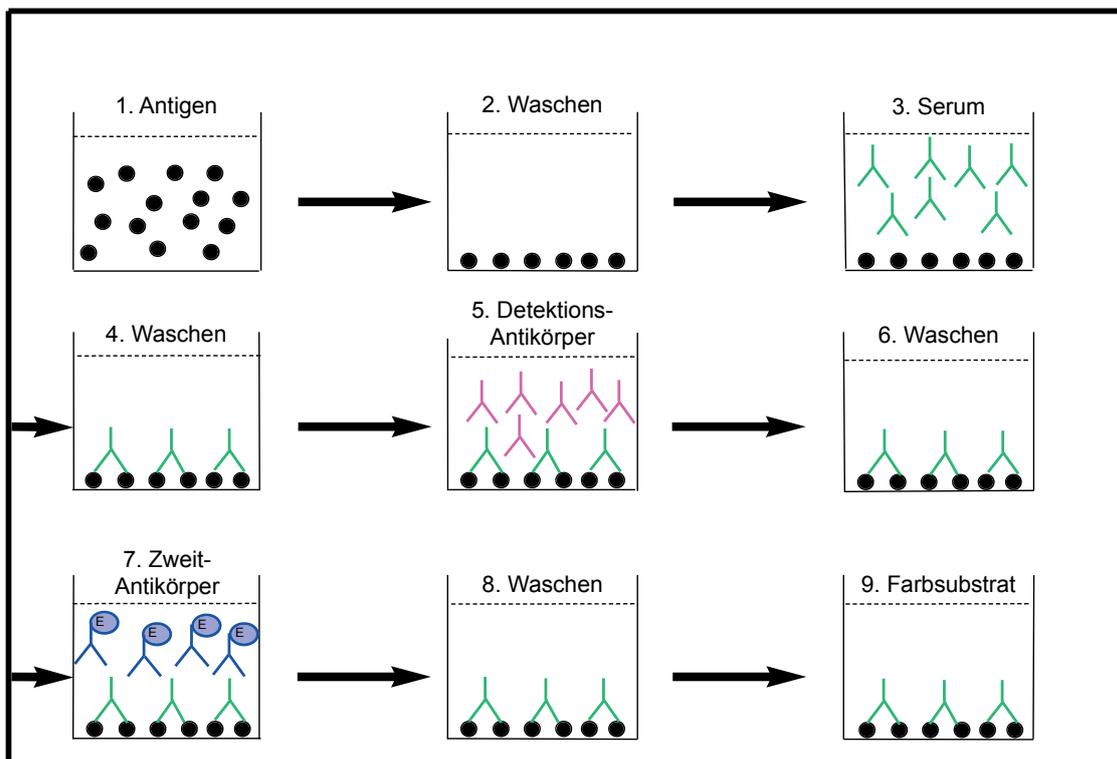


Abb. 4: Schematische Darstellung der Reaktion eines positiven Serums im kompetitiven ELISA

Der ELISA, ob indirekt oder kompetitiv, kommt im Rahmen der Herdenüberwachung während und nach Ausbruch der KSP, aber auch bei der Überwachung von KSPV-Infektionen und des postvakzinalen Immunstatus in Wildschweinen zum Einsatz (Greiser-Wilke et al., 2007). Während für den indirekten ELISA eine aufwändige Aufbereitung des Antigens nötig ist, besteht ein Vorteil des kompetitiven ELISAs (c-ELISA) im Einsatz nicht aufbereiteter Antigene. Auch unspezifische Reaktionen (Hintergrund) fallen beim kompetitiven ELISA wesentlich geringer aus als im indirekten Verfahren. Die Spezifität des Assays steht dabei in direkter Abhängigkeit zur Spezifität des Detektionsantikörpers (OIE, 2009).

Der kompetitive ELISA wurde vor vielen Jahren entwickelt und kam seither mehrfach zum Einsatz (Anderson, 1984). Durch viele Untersuchungen zur Optimierung, u.a. bezüglich Automatisierung und Inkubationstemperatur, entstand der Ceditest-ELISA mit einer hohen Spezifität und Sensitivität (Colijn et al., 1997). Die Verwendung eines chimären Antigens

(C21E<sup>ms</sup>E2) bestehend aus antigenen Regionen des E2 und des E<sup>ms</sup> führt einerseits zu deutlichen Verbesserungen bezüglich der Sensitivität, andererseits aber auch zu der Möglichkeit der Detektion einer KSPV-Infektion ab dem 7. Tag nach der Infektion (Lin et al., 2005).

Eine Unterscheidung von Antikörpern gegen KSPV und andere Pestiviren ist nur begrenzt möglich (Leforban et al., 1990; Moser et al., 1996; Colijn et al., 1997; Penrith et al., 2011). Eine Verbesserung diesbezüglich kann durch Verwendung des C-terminalen Endes des E<sup>ms</sup> als Antigen erzielt werden. Während ein ELISA unter Verwendung einer festen Phase (solid-phase) zu Kreuzreaktionen mit mehreren pestiviralen Antikörpern führt, ermöglicht die Verwendung einer flüssigen Phase (liquid-phase) die Detektion von typspezifischen pestiviralen Antikörpern (Langedijk et al., 2001). Der Unterschied besteht darin, dass bei der flüssigen Phase das Antigen und das Serum zunächst 1 Stunde zusammen inkubiert wird, bevor die Mischung auf die Mikrotiterplatte gegeben wird. Bei der festen Phase wird die Platte wie oben beschrieben mit dem Antigen beschichtet, bevor die restlichen Komponenten inkubiert werden.

Eine grundsätzliche Voraussetzung eines Antikörper-ELISAs ist die Erkennung aller KSPV-Infektionen in allen Stadien der Immunantwort. Dabei dürfen nur minimale Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen ruminante Pestiviren auftreten (Blome et al., 2006; OIE, 2008), denn das Vorkommen von BVDV oder BDV im Schwein ist häufig nachgewiesen worden. Ist der Test nicht KSP-spezifisch, muss bei positiven Proben durch weitere Untersuchungen eine Differenzierung zwischen Antikörpern gegen KSPV und andere Pestiviren vorgenommen werden.

## 1.4 Markervakzinen gegen die klassische Schweinepest

Die entstehende Seroprävalenz nach Impfung mit dem C-Stamm verschleiert die Präsenz von Wildtypvirus, was als Grundlage für die Errichtung von Handelssperren verwendet wird. Das bestehende Impfverbot begründet sich ebenfalls in dieser Tatsache. Umso größer ist der Bedarf an einer Impfung, nach deren Anwendung eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren möglich ist. Dadurch könnten auch Handelsschranken entfallen.

Der Begriff DIVA, oder auch „Differentiating Infected from Vaccinated individuals“ wurde 1999 von van Oirschot geprägt. Die Verwendung von DIVA-Vakzinen (= Marker-Vakzinen) ermöglicht im dazugehörigen diagnostischen Test eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren (van Oirschot, 1999b). Das Prinzip beruht auf dem Nachweis

spezifischer Antikörper gegen Proteine, die in der Impfung nicht enthalten sind und deshalb nur nach Infektion auftreten können. Die genaue Kenntnis der viralen Proteine und antigenen Determinanten ist bei der Entwicklung von Impfstoffen sehr wichtig.

Neueste Untersuchungen berichten von der Etablierung eines C-Stamms mit einer Mutation in der Domäne A des Glycoproteins E2. Diese Mutante ist genetisch stabil und induziert bei Einzelimpfung eine protektive Immunität. Aufgrund der Mutation, die eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren möglich macht, kommt eine Anwendung als DIVA-Vakzine in Frage. Untersuchungen ergaben jedoch, dass als komplementärer diagnostischer Test zu der DIVA-Vakzine entweder ein kommerziell erhältlicher E2-ELISA modifiziert, bzw. neu validiert, oder ein neuer geeigneter ELISA entwickelt werden muss. Der verwendete kommerzielle ELISA zum Nachweis von E2 (PrioCHECK CSFV Ab 2.0 E2 ELISA, Prionics, Lelystad, The Netherlands) war als begleitender diagnostischer Test nicht geeignet (Kortekaas et al., 2010; Kortekaas et al., 2011).

Die meisten DIVA-Vakzinen basieren jedoch nicht auf dem intakten Virus, sondern auf Untereinheiten (sog. Subunits), viralen Peptiden, Proteinen, DNS oder sogenannten Virus-Chimären.

Von den verschiedenen Möglichkeiten gibt es nur aus dem Bereich der Subunit-Vakzinen zugelassene KSPV-Impfstoffe mit passendem diagnostischem Test. Die Grundlage für solche Subunit-Vakzinen bilden rekombinante Proteine oder immunogene Peptide, wobei das virale Glycoprotein E2 eine entscheidende Rolle spielt. Es stellt das Hauptimmunogen dar (Beer et al., 2007) und induziert die Bildung einer protektiven Immunität. Die zwei kommerziell verfügbaren Subunit-Vakzinen mit dazugehörigen diagnostischen Tests basieren auf E2-Protein, das von Insektenzellen exprimiert wurde (Ahrens et al., 2000; Moormann et al., 2000; Floegel-Niesmann, 2001; Greiser-Wilke & Moennig, 2004; OIE, 2008; Penrith et al., 2011). Bei dem diagnostischen Test handelt es sich um einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das virale Glycoprotein E<sup>ms</sup>, die nur bei einer Infektion mit dem Feldvirus gebildet werden ( Moormann et al., 2000; van Oirschot, 2003b; Greiser-Wilke & Moennig, 2004; Beer et al., 2007). Dadurch ist die Differenzierung zu geimpften Tieren möglich. Die Wirksamkeit ist allerdings deutlich geringer als bei der attenuierten Lebendvakzine (van Oirschot, 2003b; Greiser-Wilke & Moennig, 2004); Mehrfachimpfungen sind notwendig. Erst 2-3 Wochen nach der Impfung (p.v.) kommt es zur Bildung einer Immunität, die einige Monate anhält (Moormann et al., 2000; van Oirschot, 2003a; Penrith et al., 2011). Untersuchungen ergaben divergierende Ergebnisse bezüglich des Schutzes vor Erkrankung

und horizontaler Infektionen. Diaplazentare Übertragungen waren jedoch bei allen Untersuchungen möglich (Ahrens et al., 2000; Moormann et al., 2000; Depner et al., 2001; Uttenthal et al., 2001; Dewulf et al., 2001; van Oirschot, 2003a; Beer et al., 2007; Penrith et al., 2011), was zur Aufrechterhaltung der Infektion in der Herde führen kann. Die Zuverlässigkeit der dazugehörigen ELISAs bezüglich Sensitivität entspricht außerdem nicht dem Standard konventioneller KSPV-ELISAs (Floegel-Niesmann, 2001; Greiser-Wilke & Moennig, 2004). Aufgrund dieser Nachteile sind beide Impfstoffe für einen Einsatz als Notimpfung nicht geeignet (Floegel-Niesmann, 2001; Penrith et al., 2011).

Als DNS-Vakzinen können E2-Expressionsplasmide verwendet werden. Auch hier ist durch Nachweis von E<sup>ms</sup>- oder NS3-Antikörpern im ELISA eine Differenzierung zwischen geimpften und infizierten Tieren möglich. Allerdings sind für eine protektive Immunantwort hohe DNA-Mengen und Mehrfachapplikationen nötig (Beer et al., 2007). Mögliche Risiken der DNA-Vakzinen liegen in der Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen sowie in der Aktivierung von Onkogenen (Temin, 1990). Sie unterliegen außerdem dem Gentechnikgesetz. Eine weitere Möglichkeit sind virale Vektor-Vakzinen. Sie entstehen z.B. durch Rekombination des Vaccinia- bzw. des Aujeszky-Virus mit einem cDNS-Fragment des KSPV, das für Strukturproteine oder einzelne Glykoproteine codiert. Die exprimierten Proteine induzieren die Bildung neutralisierender Antikörper (nAk), die vor Infektion mit KSPV schützen (Rümenapf et al., 1991b; van Zijl et al., 1991; Beer et al., 2007). Die DIVA durch Nachweis der entsprechenden KSPV-spezifischen Antikörper ist möglich (Beer et al., 2007).

Mit Hilfe E<sup>ms</sup>-komplementierender Zelllinien ist die Herstellung von Mutanten des KSPV mit einer Deletion der E<sup>ms</sup>-Sequenz möglich. Sie werden auch als Replicon bezeichnet und sind nicht in der Lage infektiöses Virus zu bilden. Nach intradermaler Applikation führen sie zur Bildung einer protektiven Immunität. Durch das Fehlen des E<sup>ms</sup> ist eine DIVA durchführbar (Widjojoatmodjo et al., 2000; Frey et al., 2006; Beer et al., 2007). Der technische Aufwand zur Herstellung dieser Vakzine ist jedoch erheblich.

Eine vielversprechende Alternative kann auch die derzeit viel untersuchte modifizierte Lebendvakzine (MLV) „CP7\_E2alf“ sein. Sie fällt in die Kategorie der Pestivirus-Chimären, die E2-codierende Region des BVDV CP7 wurde durch die analoge Region des KSPV Alfort ausgetauscht. Sie bietet den Tieren nach Challenge mit hochvirulentem Virus Schutz vor klinischer Erkrankung und Virämie. Im Gegensatz zu der erhältlichen attenuierten Lebendvakzine ist durch Nachweis von KSPV-spezifischen E<sup>ms</sup>-Antikörpern eine Unterscheidung zwischen infizierten und geimpften Tieren möglich (Reimann et al., 2004;

Koenig et al., 2007). Darüber hinaus tritt der vollständige klinische Schutz schon innerhalb kurzer Zeit ein; bei intramuskulärer Applikation nach einer Woche, bei oraler Immunisierung nach zwei Wochen (Leifer et al., 2009a). Daher könnte „CP7\_E2alf“ die erste effiziente und sichere Markervakzine zur oralen Immunisierung von Haus- und Wildschweinen darstellen (Koenig et al., 2007; Tignon et al., 2010), und damit zur Kontrolle und Eradikation der KSP beitragen. Ungeklärt sind allerdings noch Fragen der Langzeitsicherheit.

Die Problematik der klassischen Schweinepest ist das Reservoir in Wildschweinen. Dies erschwert eine weltweite Ausrottung erheblich. Eine regionale Eliminierung ist nur mit Hilfe von Impfungen und/oder Hygienemaßnahmen inklusive Ausmerzen und unschädlicher Beseitigung möglich. Die Lösung sind Marker-Vakzinen mit passendem diagnostischem Test zur Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren (Pastoret, 2005). Voraussetzungen für die „ideale“ Marker-Vakzine sind die Induktion einer schnellen Immunität, der vollständige Schutz vor Infektion und Erkrankung, sowie die DIVA (Penrith et al., 2011). Zu den diesbezüglich vielversprechendsten Vakzinen zählen die viralen Vektoren sowie die Pestivirus-Chimären, da sie zu einer ähnlich starken Immunität führen wie die attenuierte Lebendvakzine, während bei den anderen Arten von Marker-Vakzinen die Immunantwort verzögert stattfindet und auch weniger protektiv ausfällt (Beer et al., 2007).

## 1.5 Das Core-Protein

Das pestivirale Core-Protein, das zusammen mit der viralen RNS das Nukleokapsid bildet, liegt innerhalb der Lipidhülle des Viruspartikels. Es handelt sich um ein stark positiv geladenes Protein, das als BVDV-Core aus 90, als KSPV-Core aus 87 Aminosäuren besteht. Während der N-Terminus des Core-Proteins durch die virale Autoprotease N<sup>Pro</sup> generiert wird (Stark et al., 1993), erfolgt die Abspaltung des Core und somit die Generierung des C-Terminus durch die zelluläre SPP, analog zum Hepatitis C Virus (HCV) (Heimann et al., 2006).

Untersuchungen von Flaviviren sowie des HCV ergaben eine dimere, alphahelikale Struktur des Core-Proteins (Jones et al., 2003; Boulant et al., 2005). Lediglich im N-terminalen Bereich fehlt dem Protein eine stabile Sekundärstruktur; es ist dort ungeordnet; was eine spezifische Interaktion zwischen RNS und Core-Protein ermöglicht (Fan et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist das pestivirale Core-Protein vollständig ungeordnet (Hansen et al., 2006; Ivanyi-Nagy et al., 2008; Murray et al., 2008). Der einzige strukturierte Bereich mit alphahelikaler Konformation befindet sich am C-Terminus und umfasst 15 Aminosäuren. Dennoch müssen die Core-Domänen räumlich korrekt angeordnet sein, um die Funktion des Proteins zu gewährleisten (Riedel et al., 2010).

Untersuchungen des BVDV ergaben, dass bei einer Deletion von Core ohne Helfer-Zelllinie keine Produktion von infektiösen Viruspartikeln mehr möglich ist. Steht allerdings von der Zelle exprimiertes Core-Protein zur Verfügung, ist zusammen mit den vorhandenen Strukturproteinen eine Virusmorphogenese möglich. Das BVDV-Core-Protein stellt folglich einen essentiellen Faktor der Virusmorphogenese dar (Reimann et al., 2007). Außerdem besitzt das BVDV Core-Protein RNS-Chaperon-Aktivität (Ivanyi-Nagy et al., 2008), deren Funktion im Lebenszyklus des Virus bisher nicht bekannt ist. Es bindet RNS mit geringer Affinität und Spezifität und ist in der Lage, die unspezifische RNS-Bindungs- und Kondensationsregion eines nicht verwandten viralen Kapsidproteins (Sindbis Virus) funktionell zu ersetzen (Murray et al., 2008).

Das C-terminale, hydrophobe Ende des HCV Core-Proteins ist sowohl für die Assoziation mit „lipid droplets“ als auch für die Prozessierung durch die SPP an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) essentiell (Boulant et al., 2006).

Untersuchungen zur Struktur des Dengue-Virus ergaben, dass der innere Teil unstrukturierter erscheint als die äußere Lipidhülle, die mit einem ikosaedralen Glykoprotein-Gerüst versehen ist (Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2003). Zum gleichen Ergebnis kamen Untersuchungen am Kapsid des HCV (Yu et al., 2007). Die Annahme, alle Mitglieder der Flaviviridae würden über ein Nukleokapsid in Form eines Ikosaeders verfügen, wurde also für Flavi- und Hepaciviren nicht bestätigt. Zur Struktur des Nukleokapsids von Pestiviren fehlen jegliche Untersuchungen.

## **1.6 Core ist nicht essentiell**

Reimann et al. 2007 beschrieben die Tatsache, dass nach einer Deletion von Core die Produktion von infektiösen Viruspartikeln nur dann möglich ist, wenn von der Zelle exprimiertes Core-Protein zur Verfügung steht.

In der Arbeitsgruppe Rümenapf wurden Untersuchungen am KSPV mit Modifikationen des Core-Proteins durchgeführt. Diese Modifikationen beinhalteten eine Fusion des N-Terminus mit „Yellow Fluorescent Protein“ (YFP), eine Inaktivierung der SPP-Spaltstelle sowie eine interne Deletion im Core-Protein. Durch die fehlende Bildung von reifem Core war die Virusproduktion zunächst stark eingeschränkt. Nach einer verlängerten Inkubationszeit der Zellen (>48h) ergab sich jedoch eine deutliche Zunahme der Virusproduktion. Durch Analyse der viralen Genome konnte diese Zunahme auf einzelne Aminosäureaustausche in der NS3 Helikase Subdomäne 3 zurückgeführt werden (Riedel et al., 2010; Riedel et al., 2012). Dies ließ den Schluss zu, dass unterschiedliche Modifikationen im Core Protein durch einzelne Aminosäureaustausche in einem Nichtstrukturprotein kompensiert werden können.

Diese Aminosäureaustausche wurden in das Genom eines nicht vermehrungsfähigen KSPV (Vp1017) mit nahezu kompletter Deletion des Core-Gens eingefügt. Dadurch konnte die Virusproduktion wiederhergestellt werden, das Niveau gegenüber dem Wildtyp war um ein 10faches reduziert. Das Fehlen eines Strukturproteins kann folglich durch einen einzelnen Aminosäureaustausch in einem Nichtstrukturprotein kompensiert werden. Der Mechanismus dieser Kompensation konnte leider noch nicht aufgeklärt werden.

Das Fehlen eines Gens und somit auch der Verlust der Expression eines Proteins mit antigenen Eigenschaften ist die Voraussetzung für die Entwicklung einer Markervakzine. Zur Überprüfung, ob das Vp1017 als Impfstoffkandidat geeignet ist, wurden Virulenz und Induktion einer protektiven Immunität in Tierversuchen untersucht. Die Isolierung von Virus aus dem Serum infizierter Schweine war nicht möglich, auch zeigten die Tiere keine

Anzeichen von Erkrankung. Die Induktion einer protektiven Immunität sowohl gegen ein homologes KSPV (Stamm Alfort Tübingen, Vp447) (Riedel et al., 2010) als auch gegen ein heterologes KSPV (Stamm Koslov) konnte nachgewiesen werden.

Durch die Deletion des Core-Gens und die erfolgreiche Induktion einer protektiven Immunantwort im Tierversuch stellt das etablierte KSPV eine vielversprechende Möglichkeit einer Markervakzine dar. Im Gegensatz zur attenuierten Lebendvakzine besteht durch die Deletion ein erheblich verringertes Risiko der Reversion zum pathogenen Wildtyp. Ob die theoretisch denkbare Differenzierung zwischen infizierten und geimpften Tieren durch Nachweis von Antikörpern gegen das Core-Protein im Serum infizierter Tiere auch praktisch durchführbar ist, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

In der Arbeitsgruppe wurde im Rahmen von Vorversuchen bereits ein indirekter ELISA zum Nachweis von Anti-Core-Antikörpern durchgeführt. Da dessen Sensitivität allerdings nicht ausreichend war, soll im Rahmen dieser Arbeit durch Verwendung eines kompetitiven ELISAs die Sensitivität gesteigert werden.

## 1.7 Ziel dieser Arbeit

Die Basis dieser Arbeit ist das in der AG Rügenapf entwickelte KSPV mit einer Deletion der für das Core-Protein codierenden Gensequenz. Die fehlende Expression des Core-Proteins ermöglicht grundsätzlich die Anwendung des Virus als DIVA-Vakzine. Voraussetzung ist allerdings die Identifizierung infizierter Tiere durch den Nachweis von Anti-Core-Antikörpern in Schweineseren im dazugehörenden diagnostischen Test.

Ziel ist die Entwicklung und Evaluierung eines kompetitiven ELISAs zum Nachweis dieser Anti-Core-Antikörper in KSPV-infizierten Tieren. Durch Variation und Optimierung jeder einzelnen Komponente im Ablauf des ELISAs sollen die Versuchsbedingungen optimiert werden. Dadurch soll letztendlich eine Beurteilung der immunogenen Eigenschaften des Core-Proteins ermöglicht und abschließend eine Aussage bezüglich der Anwendbarkeit der Markervakzine getroffen werden.

Ziele:

- Entwicklung eines kompetitiven ELISAs
- Optimierung der Versuchsbedingungen
- Beurteilung der immunogenen Eigenschaften des Core-Proteins
- Beurteilung der Markervakzine im Vergleich mit anderen DIVA-Konzepten

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antigene

KSPV-Core<sub>169-250</sub> (Core p250, 7 His-Tag)

KSPV-Core<sub>169-253</sub> (Core p1689, 10 His-Tag)

#### 2.1.2 Antikörper

##### 2.1.2.1 Detektionsantikörper

Im Rahmen der Dissertation von Gleyder Roman-Sosa erfolgte die Herstellung 8 monoklonaler Antikörper, die jeweils gegen ein bestimmtes Epitop des Core-Proteins gerichtet sind. 2 der monoklonalen Antikörper (C1, C2) banden spezifisch an das KSPV-Core. Bei 6 monoklonalen Antikörpern (C3, C4, C5, C6, C7, C8) traten Kreuzreaktionen zwischen BVDV und KSPV auf. Der Bereich in der Core-Proteinsequenz, in dem die Antikörper binden, konnte eingegrenzt werden:

C1, C2: Aminosäuren 22-32

C3, C6, C7: Aminosäuren 36-53

C4, C5, C8: Aminosäuren 54-69

##### 2.1.2.2 Sekundärantikörper

Ziege-anti-Maus, Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova)

Ziege-anti-Schwein, Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova)

Esel-anti-Ziege, Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova)

### 2.1.3 Seren

Vor Verwendung erfolgte eine Inaktivierung aller Seren für 30 Minuten bei 56°C.

#### 2.1.3.1 Positives Kontrollserum

Serum von einem Schwein (Tier 16), das doppelt mit gereinigtem Core<sub>169-250</sub> immunisiert wurde.

#### 2.1.3.2 Negatives Kontrollserum

Schweineserum vom Schlachthof in Gießen

#### 2.1.3.3 Seren aus dem Tierversuch

Die Seren stammen aus einem Tierversuch, der vom 02. März 2010 bis zum 02. Mai 2010 im Referenzlabor für Klassische Schweinepest am Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt wurde. Die Genehmigung erfolgte durch das niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Genehmigungsnummer AZ 09/1719; interne Referenz V2010/01). Innerhalb des Versuches wurden 3 Gruppen untersucht:

C-Stamm-Gruppe (297-301):

5 Schweine: Immunisiert mit dem KSPV C-Stamm, 28 Tage nach der Infektion (dpi) Challenge mit dem KSPV Koslov;

folgende Seren kamen zum Einsatz: Nulltag (=Präimmunsersum), 2dpi, 4dpi, 7dpi, 10dpi, 14dpi, 22dpi, 56dpi (=Endtagsserum)

KSPV  $\Delta$ Core pCR85-Gruppe ( $10^4$ ) (302-306):

5 Schweine: Immunisiert mit dem KSPV  $\Delta$ Core pCR85 ( $10^4$ ), 28dpi Challenge mit dem KSPV Koslov;

folgende Seren kamen zum Einsatz: 2dpi, 22dpi, 49dpi (=Endtagsserum)

KSPV  $\Delta$ Core pCR85-Gruppe ( $10^6$ ) (307-309):

3 Schweine: Immunisiert mit dem KSPV  $\Delta$ Core pCR85 ( $10^6$ ), 28dpi Challenge mit dem KSPV Koslov;

folgende Seren kamen zum Einsatz: 2dpi, 22dpi, 49dpi (=Endtagsserum)

### 2.1.3.4 Negativ-Seren

Zur Ermittlung des „cut-off“-Wertes kamen 10 Schweine-Seren aus der Schweineklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen zum Einsatz (N1-N10).

### 2.1.4 Chemikalien und Puffer

Aceton	Roth
Chicken-Albumin	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethanol (EtOH)	Fluka
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA
Magermilchpulver	Frema
Methanol	Fluka
Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumcarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Nonidet-P40	Fluka
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka
Pferde-Serum	Lonza
Roti-Block	Roth
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma
Tween20	Fluka
Ultra-Block	Serotec
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Greencaps	Nerbeplus
Handschuhe	Roth
Klebeband	Tesa
Pipettenspitzen	Biozym
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zellstoff	Tork
Mikrotiterplatten:	
4HBX	Nunc
2HB	Nunc
TSP-Deckel	Nunc
Maxisorp	Nunc

### 2.1.6 Geräte

Brutschrank	Heraeus
ELISA-Reader	Tecan
Glaswaren	Schott/Seromed
Gefrierschränke	Liebherr
Heizblöcke	Eppendorf
Kühlschränke	Liebherr
Pipetten	Eppendorf; Gilson; Biohit
Reinstwasseranlage	Purolab
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Schüttler	Edmund Bühler
Vortex	IKA
Waagen	Mettler
Wasserbad	Braun

## **2.1.7 Eingesetzte Puffer und Lösungen**

### **2.1.7.1 Beschichtungspuffer**

Destilliertes Wasser

Natriumcarbonat-Puffer (0,1M); pH 9,5

Natriumchlorid (0,9%)

PBS

### **2.1.7.2 Blockierungspuffer**

Chicken-Albumin (2%)

Fetales Kälberserum (0,5%; 5%; 10%)

Milchpulver (2%)

Pferde-Serum (10%)

Roti-Block (1:10)

Ultra-Block (pur)

(jeweils verdünnt mit PBS + 0,05% Tween20)

### **2.1.7.3 Wasch- und Verdünnungspuffer**

PBS + Tween20 (0,1%; 0,05%; 0,01%)

PBS + Nonidet-P40 (0,1%; 0,05%; 0,01%)

NaCl (0,9%) + Tween20 (0,1%; 0,05%; 0,01%)

PBS

NaCl (0,9%)

Destilliertes Wasser

### **2.1.7.4 Zwischenfixation**

Ethanol 70%

Ethanol 100%

Methanol-Aceton

PFA

#### **2.1.7.5 Farblösung**

- 8,7ml Wasser
- + 300µl TMB-Puffer (3M Natriumacetat, pH 5,3)
- + 1ml TMB-Stock (100mg TMB in 40ml DMSO)
- + 1,5µl Wasserstoffperoxid (30%)

#### **2.1.7.6 Stopplösung**

Schwefelsäure (1:4 verdünnt)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Durchführung eines indirekten ELISAs

Antigen:	KSPV Core-Protein
Antikörper:	Maus mAk C2 Ziege-anti-Maus Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova)
Lösungen:	Beschichtungs-Puffer: 0,1M Natriumcarbonat-Puffer, pH 9,5 Blockierungs-Puffer: 10% FKS in PBS + 0,05% Tween20 Wasch- und Verdünnungspuffer: PBS + 0,1% Tween20 Farblösung: H <sub>2</sub> O + Na-Acetat + TMB-Stock + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Stopplösung: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Geräte:	Mikrotiterplatte der Marke 4HBX

Als erster Schritt erfolgt das Beschichten der Mikrotiterplatten. Dabei wird das Antigen in Beschichtungs-Puffer (0,1M Natriumcarbonat-Puffer, pH 9,5) verdünnt und 100µl pro Vertiefung (Well) aufgetragen, so dass pro Vertiefung 0,1µg Antigen vorliegen. Während einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C kommt es zur Bindung des Antigens (Peptid) an die Platte. Der nächste Schritt ist das Blockieren, wobei übrig gebliebene freie Bindungsstellen durch das Blockierungsreagenz besetzt werden. Die Platte wird auf Zellstoff ausgeklopft, danach werden 200µl Blockierungs-Puffer (10% FKS in PBS + 0,05% Tween20) zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Platte wieder auf Zellstoff ausgeklopft. Nun erfolgt ein 2maliger Waschschrift, bei dem je 100µl Waschpuffer (PBS + 0,1% Tween20) pro Vertiefung zugegeben werden und die Platte danach ausgeklopft wird. Nichtgebundene Anteile werden dadurch entfernt. Anschließend werden die gegen das Antigen gerichteten Detektionsantikörper (Primär-Antikörper) in der entsprechenden Verdünnung (100µl pro Vertiefung) zugegeben. Es handelt sich hierbei um monoklonale Antikörper, die aus der Maus stammen. Die Inkubation erfolgt wieder bei 37°C über 1 Stunde. In dieser Zeit können die Antikörper an das an die Platte gebundene Antigen binden. Danach wird die Platte 3x mit dem Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Der Zweit-Antikörper ist ein gegen den Detektionsantikörper gerichteter (Maus-spezifisch) und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper aus der Ziege (Ziege-anti-Maus). Er wird 1:3000 mit Waschpuffer verdünnt und auf die Mikrotiterplatten aufgetragen (100µl pro

Vertiefung). Während einer Inkubation von 1 Stunde bei 25°C binden die Zweit-Antikörper an die gebundenen Detektionsantikörper. Danach folgen wieder 3 Waschschrte. Um nun die im Dunkeln stattfindende Farbreaktion zu starten, werden 100µl TMB-Farblösung pro Vertiefung zugegeben. Diese reagiert mit der Peroxidase der gebundenen Zweit-Antikörper und löst eine Blaufärbung aus. Gestoppt wird die Färbung nach Erreichen des gewünschten Farbergebnisses durch Zugabe von 100µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:4 verdünnt) pro Vertiefung. Danach kann die Reaktion im ELISA-Reader bei 450nm gemessen werden.

Je mehr Detektionsantikörper vorhanden sind und an das Antigen gebunden haben, desto mehr Zweit-Antikörper können binden und desto intensiver fällt auch die Färbung aus.

Zur Etablierung des ELISAs, insbesondere zur Bestimmung der optimalen Konzentrationen der grundlegenden Komponenten, wurde der indirekte ELISA wie beschrieben durchgeführt. Kommen statt dem monoklonalen Detektionsantikörper jedoch Schweine-Seren zum Einsatz, muss dementsprechend auch ein anderer Zweit-Antikörper verwendet werden. Dieser muss speziesspezifisch sein, d.h. gegen Schweine-Antikörper gerichtet (Ziege-anti-Schwein).

### 2.2.2 Durchführung eines kompetitiven ELISAs

Antigen:	KSPV Core-Protein
Seren:	Positives und Negatives Kontrollserum
Antikörper:	Maus mAk C2 Ziege-anti-Maus Meerrettich-Peroxidase konjugiert (Dianova)
Lösungen:	Beschichtungs-Puffer: 0,1M Natriumcarbonat-Puffer, pH 9,5 Blockierungs-Puffer: 10% FKS in PBS + 0,05% Tween20 Wasch- und Verdünnungspuffer: PBS + 0,1% Tween20 Farblösung: H <sub>2</sub> O + Na-Acetat + TMB-Stock + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Stopplösung: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Geräte:	Mikrotiterplatte der Marke 4HBX

Der ELISA dient dem Nachweis im Serum enthaltener Antikörper, die gegen das an die Platte gebundene Antigen gerichtet sind. Das Beschichten der Mikrotiterplatte mit dem Antigen sowie das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt wie im indirekten ELISA. Nach dem Blockieren werden die Seren zugegeben (100µl pro Vertiefung). Während der Inkubation von 1 Stunde bei 37°C binden die Serum-Antikörper an das an die Platte gebundene Antigen. Es

folgen 3 Waschschrirte. Wie im indirekten ELISA wird nun der Detektionsantikörper zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Er bindet an Stellen des Antigens, die nicht schon von Serum-Antikörpern besetzt sind. Im Anschluss wird die Platte 3x mit dem Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Es folgt die Zugabe des Zweit-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:3000. Während einer Inkubation von 1 Stunde bei 25°C binden die mit Peroxidase gekoppelten Zweit-Antikörper an die gebundenen Detektionsantikörper. Danach folgen wieder 3 Waschschrirte. Der Zweit-Antikörper ist nur gegen die aus der Maus stammenden monoklonalen Detektionsantikörper gerichtet. Mit den Antikörpern aus den Seren erfolgt keine Bindung. Je weniger Antikörper im Serum enthalten sind und an das Antigen binden, desto mehr Detektionsantikörper und infolge dessen auch Zweit-Antikörper können eine Bindung eingehen. Die Farbreaktion wird auch diesmal mit TMB-Farblösung initiiert und nach Erreichen des gewünschten Farbergebnisses mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Danach erfolgt die Messung im ELISA-Reader bei 450nm.

Anders als im indirekten ELISA fällt die Farbreaktion hier umso stärker aus, je weniger Antikörper in den Seren vorhanden sind, da dementsprechend mehr Bindungsstellen für die Detektionsantikörper und somit auch für die Zweit-Antikörper vorhanden sind. Eine starke Färbung entspricht also einer geringen Antikörperkonzentration im Serum. Eine schwache Färbung entspricht einer starken Kompetition zwischen Serum-Antikörper und Detektionsantikörper, resultierend aus einem hohen Gehalt an spezifischen Antikörpern im Serum.

### **2.2.3 Auswertung eines ELISAs**

Zur Kontrolle sollte bei jedem ELISA ein positives und ein negatives Kontroll-Serum verwendet werden. Bei der Auswertung werden zunächst die beiden Kontroll-Seren beurteilt und anschließend die Proben.

#### **2.2.3.1 Messung der optischen Dichte**

Die optische Dichte (OD) wird im ELISA-Reader bei 450nm gemessen.

### 2.2.3.2 Berechnung der prozentualen Inhibition

Außerdem wird aus den gemessenen OD-Werten die prozentuale Inhibition (PI) des negativen Kontroll-Serums berechnet.

$$PI (\%) = 100 - \frac{OD \text{ Probe}}{OD \text{ negatives Kontroll-Serum}} * 100$$

*PI (%)*: Prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums  
*OD Probe*: Optische Dichte der Probe; im Laufe der Versuchsoptimierung immer das positive Kontroll-Serum  
*OD negatives Kontroll-Serum*: Optische Dichte des negativen Kontroll-Serums

### 2.2.3.3 Berechnung des „cut-off“-Wertes

Der „cut-off“-Werte dient der Unterscheidung zwischen positiven und negativen Seren. Ermittelt wird er aus dem Arithmetischen Mittelwert der negativen Kontroll-Seren und der dreifachen Standardabweichung. Seren, die unterhalb dieses Wertes liegen, können als positiv eingestuft werden, während Seren im Bereich oberhalb der Grenze als zweifelhaft eingestuft werden.

### 2.2.3.4 Berechnung der Spezifität

Die Spezifität bezeichnet den Anteil der richtig-negativen Resultate.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Richtig-Negativ}}{(\text{Richtig-Negativ} + \text{Falsch-Positiv})}$$

### 2.2.3.5 Berechnung der Sensitivität

Die Sensitivität stellt den Anteil der richtig-positiven Resultate dar.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Richtig-Positiv}}{\text{(Richtig-Positiv + Falsch-Negativ)}}$$

### 3 Ergebnisse

Die Voraussetzung einer, für die Tierseuchenbekämpfung geeigneten Markervakzine ist die serologische Unterscheidbarkeit zwischen geimpften und infizierten Tieren. Durch die Bildung spezifischer Antikörper muss sich die Immunreaktion nach Anwendung der Vakzine von der Immunreaktion nach Infektion mit dem Wildtyp unterscheiden. Die Verwendung des entwickelten KSPV mit einer Deletion des Core-Gens als Markervakzine soll diese Voraussetzung erfüllen. Durch Nachweis von Anti-Core-Antikörpern in Testseren muss die Identifizierung infizierter Tiere möglich sein. Diesbezüglich wurden 2 Tierversuche durchgeführt, deren Seren untersucht werden konnten.

Um Anti-Core-Antikörper nachweisen zu können, sollte ein Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) auf der Basis von bakteriell erzeugtem Core-Protein entwickelt werden. Hierzu wurde von der Arbeitsgruppe hochgereinigtes, lösliches Core-Protein bereitgestellt; zunächst als Core<sub>169-250</sub> (p250), später als Core<sub>169-253</sub> (p1689). Die Proteine tragen einen C-terminalen 7-Histidin-Tag, der eine effiziente Reinigung über Nickel-NTA-Säulen ermöglichte. Da bei bakteriell erzeugten Proteinen eine geringe Kontamination mit E.coli-Antigenen nicht ausgeschlossen werden kann und sich im Serum von Schweinen stets Antikörper gegen E.coli befinden, war der Kompetitions-ELISA das Mittel der Wahl. Seine hohe Spezifität wird durch die Spezifität des Detektionsantikörpers festgelegt. Der Hintergrund durch unspezifische Bindungen fällt dadurch im Gegensatz zum indirekten ELISA wesentlich geringer aus. Daher war das kompetitive Verfahren für diese Arbeit am besten geeignet.

Die Entwicklung des ELISAs konnte in mehrere Schritte unterteilt werden. Nach Auswahl der wichtigsten Komponenten (Detektionsantikörper, Testantigen, Testseren, Zweit-Antikörper) wurden deren optimale Konzentrationen ermittelt und die Durchführung des ELISAs geprüft. Zusätzliche Vorversuche dienten der Auswahl weiterer Bestandteile, bzw. Vorgehensweisen (Mikrotiterplatten, Puffer- und Blockierungslösungen, Waschschritte, Zwischenfixation). Nach Untersuchung der Seren aus einem Tierversuch wurden die Versuchsbedingungen (u.a. Inkubationszeiten und -temperaturen) optimiert. Dies erfolgte, indem für jeden einzelnen Schritt, bzw. für jede einzelne Komponente mehrere Varianten miteinander verglichen wurden. Dabei wurde stets eine bereits bekannte Variante als Kontrolle mitgeführt. Ergab sich

bei einer neuen Variante durch Vergleich mit der bereits bekannten Variante eine Verbesserung, so wurde sie in den Ablauf des ELISAs eingefügt und für die weiteren Versuche übernommen. Jede Verbesserung zog also eine Veränderung im praktischen Ablauf des ELISAs nach sich. So entstand im Laufe der Experimente eine optimierte Vorgehensweise zur Durchführung des ELISAs.

Die Durchführung des kompetitiven ELISAs erfolgte nach einem Standardprotokoll (Engvall & Perlmann, 1971). Zur Übersicht die praktische Durchführung vor Beginn der Experimente:

1. 100µl Antigen pro Vertiefung, verdünnt in Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,5);  
Inkubation: 1 Stunde bei 37°C
2. 200µl Blockierungspuffer (10% FKS in PBS + 0,05% Tween20) pro Vertiefung  
Inkubation: 30 Minuten bei 37°C
3. 2x waschen mit je 100µl Waschpuffer (PBS + 0,1% Tween20)
4. 100µl Serum pro Vertiefung, unverdünnt  
Inkubation: 1 Stunde bei 37°C
5. 3x waschen mit je 100µl Waschpuffer
6. 100µl Detektionsantikörper pro Vertiefung, verdünnt in Waschpuffer  
Inkubation: 1 Stunde bei 37°C
7. 3x waschen mit je 100µl Waschpuffer
8. 100µl Zweit-Antikörper pro Vertiefung, verdünnt in Waschpuffer  
Inkubation: 1 Stunde bei 25°C
9. 3x waschen mit je 100µl Waschpuffer
10. 100µl TMB-Farblösung pro Vertiefung  
Inkubation: 5 Minuten bei 25°C
11. 100µl Stopplösung (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Vertiefung
12. Messung bei 450nm im ELISA-Reader

Der ELISA-Reader ermittelte zu jeder Probe die optische Dichte (OD). In vielen Fällen war dieser Wert zur Beurteilung allerdings nicht ausreichend. Zur Anwendung kam dann die sogenannte prozentuale Inhibition (PI) des negativen Kontroll-Serums.

$$PI (\%) = 100 - \frac{OD \text{ Probe}}{OD \text{ negatives Kontroll-Serum}} * 100$$

<i>PI (%)</i> :	<i>Prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums</i>
<i>OD Probe</i> :	<i>Optische Dichte der Probe; im Laufe der Versuchsoptimierung immer das positive Kontroll-Serum</i>
<i>OD negatives Kontroll-Serum</i> :	<i>Optische Dichte des negativen Kontroll-Serums</i>

Bei positiven Seren kommt es durch spezifische Antikörper zu einer Konkurrenz mit dem Detektionsantikörper. Das Farbsignal von positiven Seren fällt folglich geringer aus als das Farbsignal von negativen Seren (die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur Antikörpermenge im Serum). Dieser Farbunterschied kann mit Hilfe der prozentualen Inhibition berechnet werden.

In allen Experimenten kamen 2 Kontroll-Seren zum Einsatz (+ Kontrolle, - Kontrolle) und nach jedem Experiment wurde für jede einzelne Variante die prozentuale Inhibition des negativen Kontrollserums ermittelt. Der Vergleich der Ergebnisse innerhalb eines Experimentes (eine bereits bekannte Variante, mehrere neue Varianten) ermöglichte die Beurteilung der einzelnen Varianten und die Entscheidung, welche davon fortgeführt werden sollte. Der Vergleich der Ergebnisse zwischen einzelnen Experimenten (bereits bekannte Varianten) sowie die Durchführung von Doppelbestimmungen dienten der Kontrolle für eventuelle Pipettierfehler.

Nach der Optimierung der Versuchsbedingungen stellte ein ELISA mit den Seren aller Versuchstiere den Abschluss dar.

Aus den Ergebnissen sollte letztendlich eine Aussage bezüglich der immunogenen Eigenschaften des Core-Proteins, der Anwendbarkeit dieses kompetitiven ELISAs als diagnostischer Test, sowie eine Beurteilung der Markervakzine getroffen werden.

### **3.1 Auswahl der wichtigsten Komponenten**

Der entscheidende Bestandteil des Kompetitions-ELISAs ist der Detektionsantikörper, da über ihn die Spezifität bestimmt wird. Weitere Grundlagen sind außerdem das Antigen, die Seren sowie der Zweit-Antikörper. Wichtig ist eine optimale Abstimmung dieser Komponenten aufeinander.

#### **3.1.1 Auswahl von Detektionsantikörper, Antigen und Serum**

Da die Auswahl von Detektionsantikörper, Antigen und Serum parallel in mehreren Versuchen stattfand, soll auch die Beschreibung der Ergebnisse kombiniert erfolgen. Erst anschließend wird auf die Auswahl der jeweils besten Konzentration, bzw. Verdünnung eingegangen.

##### **3.1.1.1 Auswahl des Detektionsantikörpers**

Grundlage jedes Kompetitions-ELISAs ist die Verfügbarkeit eines oder mehrerer Antikörper, die ein Epitop auf dem Antigen erkennen, gegen das im Tier Serum-Antikörper gebildet werden. Im Rahmen der Dissertation von Gleyder Roman-Sosa erfolgte die Herstellung gegen das KSPV-Core-Protein gerichteter Antikörper. Nach mehrfacher Immunisierung von Mäusen mit gereinigtem KSPV Core-Protein gelang die Produktion von 8 verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die jeweils gegen ein bestimmtes Epitop des Core-Proteins gerichtet sind. Während 2 der monoklonalen Antikörper (C1, C2) nur spezifisch an das KSPV-Core banden, traten bei 6 anderen monoklonalen Antikörpern (C3, C4, C5, C6, C7, C8) Kreuzreaktionen zwischen BVDV und KSPV auf. Der Bereich in der Core-Proteinsequenz, in dem die Antikörper binden, konnte eingegrenzt werden:

C1, C2: Aminosäuren 22-32

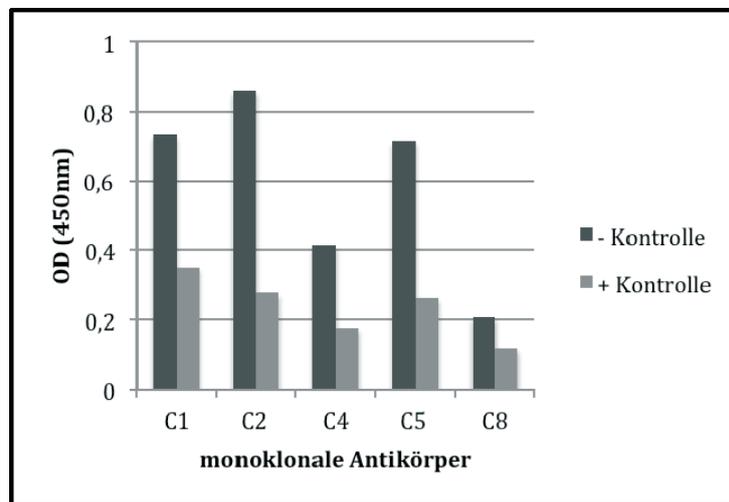
C3, C6, C7: Aminosäuren 36-53

C4, C5, C8: Aminosäuren 54-69

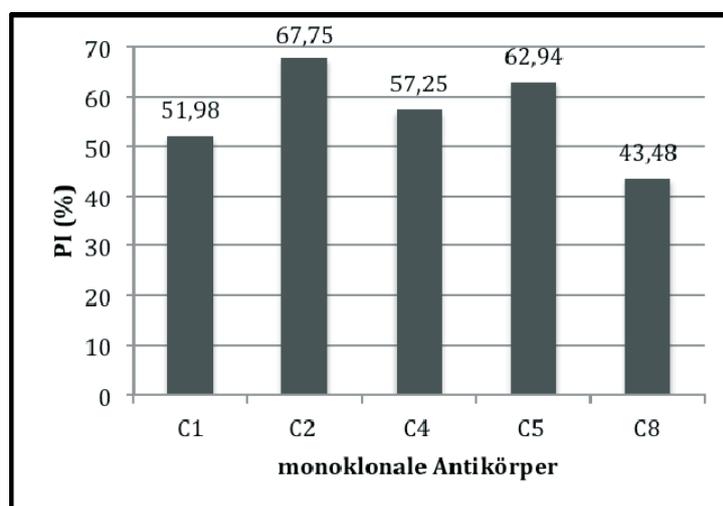
Drei dieser Antikörper (C3, C6, C7) ergaben schon in Vorversuchen keine zufriedenstellenden Ergebnisse und kamen daher nicht weiter zum Einsatz. Die anderen 5 Antikörper (C1, C2, C4, C5, C8) wurden weiter untersucht und miteinander verglichen. In

allen Versuchen wurden die beiden Kontroll-Seren eingesetzt, die monoklonalen Antikörper fungierten als Detektionsantikörper. Nach Betrachtung der OD-Werte und Ermittlung der prozentualen Inhibition des negativen Kontroll-Serums konnte ein Vergleich zwischen den Antikörpern gezogen werden. Ein „optimaler“ Antikörper soll spezifisch an das Antigen binden. Die Affinität darf allerdings auch nicht zu hoch sein, da sonst Serum-Antikörper nicht mehr binden können und eine Kompetition nicht möglich ist.

Der KSPV-spezifische Antikörper C2 brachte kontinuierlich die besten Ergebnisse. Die prozentuale Inhibition fiel stets hoch aus; eine Kompetition mit Serum-Antikörpern fand also statt. Daher war dieser monoklonale Antikörper am besten geeignet und wurde für den weiteren Versuchsablauf ausgewählt (siehe Abb. 5 & Abb. 6).



**Abb. 5: Kompetitiver ELISA mit 5 verschiedenen monoklonalen Antikörpern;** dargestellt ist die optische Dichte, gemessen bei 450nm.



**Abb. 6: Kompetitiver ELISA mit 5 verschiedenen monoklonalen Antikörpern;** dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontrollserums.

### 3.1.1.2 Auswahl des Antigens

Zur Auswahl als Antigen standen 2 bakteriell erzeugte, hochgereinigte und lösliche Core-Proteine. Sie wurden beide von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Während das Core<sub>169-250</sub> nur im Rahmen von Vorversuchen zum Einsatz kam, diente das Core<sub>169-253</sub> in allen weiteren Versuchen als Antigen. Es verfügt über einen längeren His-Tag, was eine bessere Reinigung ermöglicht. Durch seine bekannte Konzentration konnte die Menge an Protein optimal an die anderen Komponenten angepasst werden.

### 3.1.1.3 Auswahl der Seren

Essentiell für den ELISA ist die Verwendung eines positiven, sowie eines negativen Kontroll-Serums. Deren Einsatz erlaubt nicht nur eine Aussage bezüglich des Funktionierens des ELISAs, sondern ermöglicht durch Steigerung der prozentualen Inhibition auch die Optimierung der Versuchsbedingungen. Während als negatives Kontroll-Serum (- Kontrolle) ein Schweine-Serum vom Schlachthof zum Einsatz kam, diente als positives Kontroll-Serum (+ Kontrolle) das Endtagsserum eines doppelt mit gereinigtem Core<sub>169-250</sub> immunisierten Schweines (Tier 16).

## 3.1.2 Auswahl der Konzentrationen und Verdünnungen

Nach der Auswahl des Antigens, des Detektionsantikörpers und der Seren wurden mehrere indirekte und kompetitive ELISAs durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen und Verdünnungen der Komponenten miteinander kombiniert. Ziel war die Auswahl einer Kombination, die zu optimalen Ergebnissen führt.

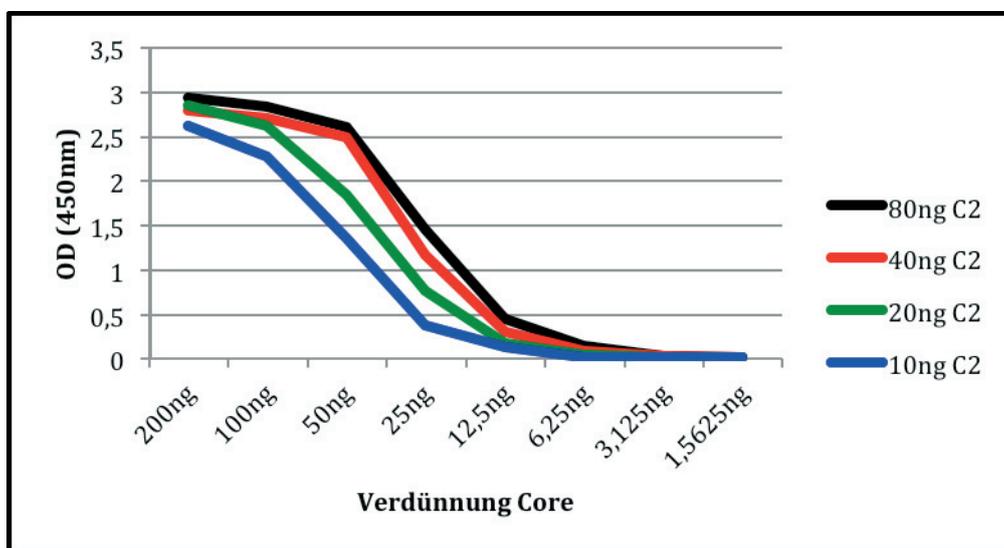
### 3.1.2.1 Auswahl der Antigenkonzentration

Die Menge an Protein sollte so gewählt werden, dass eine vollständige Beladung der Mikrotiterplatte gewährleistet ist. Eine Überladung sollte jedoch vermieden werden. Eine Verdünnungsreihe des Core<sub>169-253</sub> wurde in einem indirekten ELISA mit 4 verschiedenen Konzentrationen des Detektionsantikörpers C2 kombiniert.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Konzentration von mehr als 50-100ng eine Übersättigung vorliegt. Die Kurven befinden sich hier in der Plateauphase. Zwischen 100ng

und 25ng befinden sich die Kurven in einem linearen Bereich. Ab einer Konzentration von 12,5-25ng ist dieser lineare Bereich zu Ende und man spricht von Untersättigung. Es ist zu wenig Antigen vorhanden, um die Platte vollständig zu beladen. Dieser Kurvenverlauf resultiert aus der Reaktion zwischen Antigen und Detektionsantikörper. Diesem steht mit sinkender Protein-Konzentration weniger Antigen zur Bindung zur Verfügung und es kommt zu einem Abfall der Kurven (siehe Abb. 7).

Da ein ELISA-System am besten funktioniert, wenn alle Abläufe im linearen Bereich ablaufen, befindet sich die gesuchte Konzentration des Core-Proteins also im oberen Bereich des linearen Abschnittes.



**Abb. 7: Indirekter ELISA mit einer Verdünnungsreihe des Core<sub>169-253</sub> kombiniert mit 4 verschiedenen Konzentrationen des Detektionsantikörpers C2; dargestellt ist die optische Dichte, gemessen bei 450nm.**

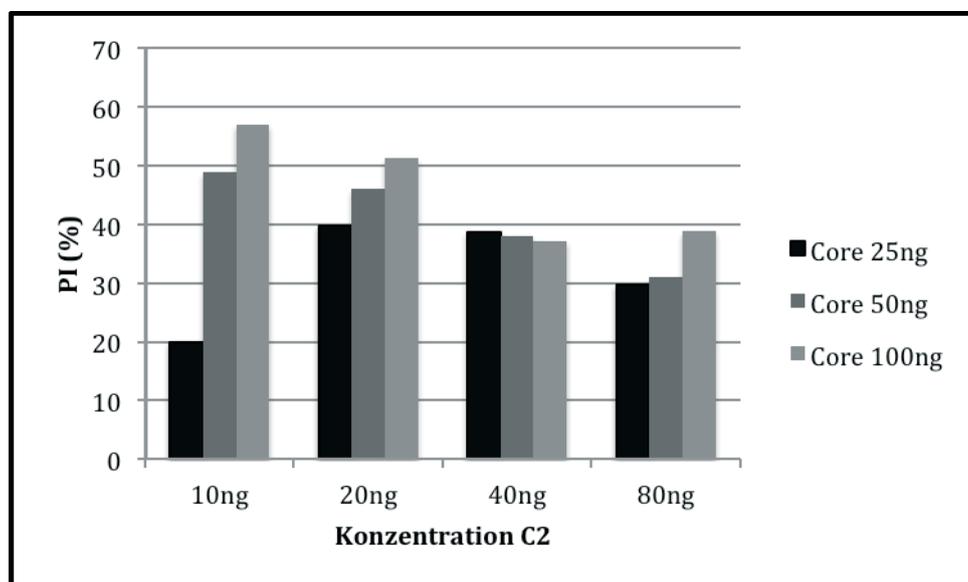
### 3.1.2.2 Auswahl der Konzentration des Detektionsantikörpers

4 Konzentrationen des aufgereinigten Antikörpers C2 (10ng, 20ng, 40ng, 80ng) wurden im kompetitiven ELISA mit jeweils 3 Konzentrationen des Antigens Core<sub>169-253</sub> (25ng, 50ng, 100ng) kombiniert. Zur Auswertung wurde auch hier wieder die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums bestimmt.

Bei 40ng und bei 80ng C2 fielen die PI-Werte insgesamt eher niedrig aus. Eine Änderung der Core-Konzentration führte außerdem zu keiner deutlichen Veränderung der prozentualen Inhibition, im Gegensatz zu 10ng und 20ng C2. Eine Konzentration von 10ng C2 lieferte gute Werte. Die prozentuale Inhibition stieg mit steigender Core-Konzentration deutlich an. Allerdings kann die Ursache dafür auch eine zu geringe Konzentration an

Detektionsantikörper sein; bei einer hohen Konzentration an Antigen ist im Verhältnis zu wenig Detektionsantikörper vorhanden. Es findet keine Konkurrenz mit Serum-Antikörpern statt, da ausreichend freie Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Die besten Ergebnisse gab es bei 20ng C2. Dort zeigte sich mit Steigerung der Core-Konzentration ein kontinuierlicher, aber nicht zu extremer Anstieg der prozentualen Inhibition (siehe Abb. 8).

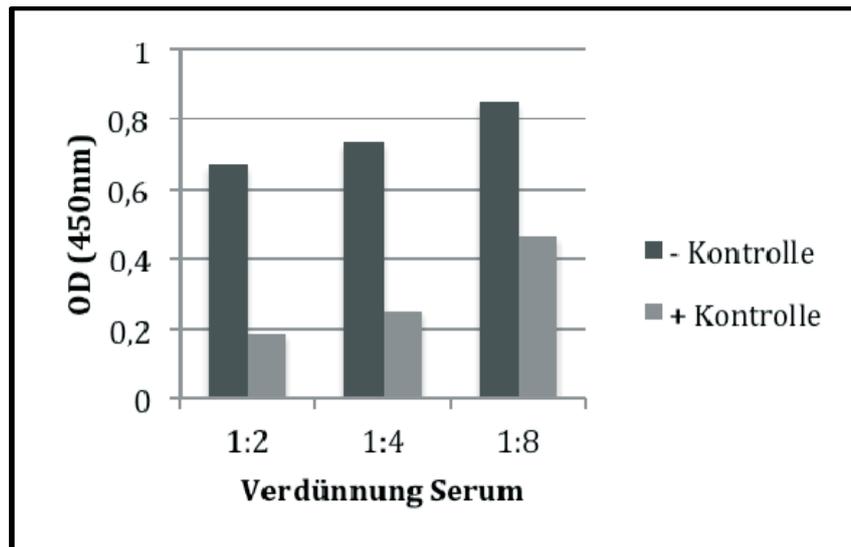
Es wurde eine Kombination des Core-Proteins mit dem monoklonalen Antikörper C2 für die weiteren Versuche ausgewählt. Bei allen folgenden Versuchen erfolgte die Beschichtung der Platte mit 50ng Core<sub>169-253</sub> und als Detektionsantikörper wurde der monoklonale Antikörper C2 in einer Konzentration von 20ng verwendet.



**Abb. 8: Kompetitiver ELISA mit 4 verschiedenen Konzentrationen des Detektionsantikörpers C2 kombiniert mit 3 verschiedenen Konzentrationen des Core<sub>169-253</sub>; dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.**

### 3.1.2.3 Auswahl der Serumverdünnung

Nach Auswahl der beiden Kontroll-Seren wurden ein kompetitiver ELISA mit dem Ziel durchgeführt, die optimale Verdünnung der beiden Seren zu ermitteln. Beide Seren wurden dabei in 3 verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:4, 1:8) eingesetzt. Die niedrigste Verdünnung von 1:2 brachte die besten Ergebnisse (siehe Abb. 9). Die Kontroll-Seren wurden daher in den folgenden Versuchen in dieser Verdünnung verwendet.



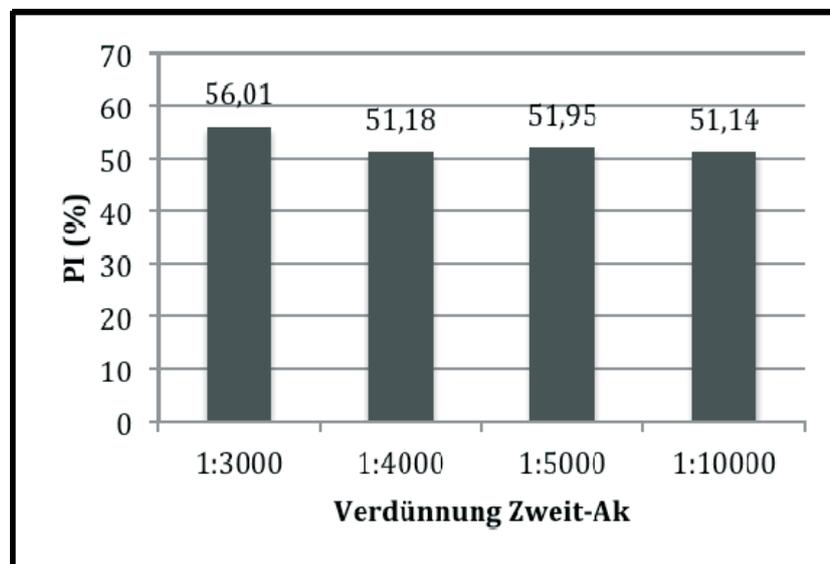
**Abb. 9: Kompetitiver ELISA mit 3 verschiedenen Verdünnungen der beiden Kontroll-Seren;** dargestellt ist die optische Dichte, gemessen bei 450nm.

Das positive Kontroll-Serum zeigte in allen Versuchen sehr gute Reaktionen in Form einer starken Konkurrenz und daraus resultierend einer hohen prozentualen Inhibition. Folglich enthält das Serum gegen das Core-Protein gerichtete Antikörper, die mit dem Detektionsantikörper um die Bindungsstellen am Protein konkurrieren. Da dieser Antikörper-Spiegel auf einer Doppel-Immunisierung mit aufgereinigtem Core-Protein beruhte, war davon auszugehen, dass die Antikörper-Spiegel nach Infektion mit dem Wildtyp wesentlich geringer ausfallen. Um damit vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde für das positive Kontroll-Serum eine Verdünnung von 1:40 festgelegt.

### 3.1.2.4 Auswahl der Verdünnung des Zweit-Antikörpers

Als Zweit-Antikörper wurde ein kommerzieller Peroxidase-gekoppelter Ziege  $\alpha$  Maus-Antikörper verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Verdünnung wurden in einem ELISA unter Verwendung der bereits ausgewählten Kombination aus Protein, Serum und Detektionsantikörper mehrere Verdünnungsstufen (1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:10000) getestet. Nach Berechnung der prozentualen Inhibition für jede untersuchte Variante wurden die Ergebnisse verglichen.

Die niedrigste Verdünnungsstufe von 1:3000 erzielte den höchsten Wert und brachte damit das beste Ergebnis (siehe Abb. 10). In allen nachfolgenden Versuchen wurde der Zweit-Antikörper also in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt.



**Abb. 10: Kompetitiver ELISA mit 4 verschiedenen Verdünnungen des Zweit-Antikörpers;** dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

### **3.1.3 Auswahl weiterer Bestandteile**

Wie oben bereits erwähnt wurde im Rahmen zusätzlicher Vorversuche die Auswahl weiterer Bestandteile, bzw. Vorgehensweisen getroffen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Vorversuche zusammengefasst werden.

#### **3.1.3.1 Auswahl der Mikrotiter-Platten**

Zur Auswahl standen 4 verschiedene Platten (4HBX, Maxisorp, TSP-Deckel, 2HB). Zum Vergleich der Platten wurden mehrere ELISAs durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass Maxisorp-Platten am besten geeignet waren.

#### **3.1.3.2 Auswahl der Pufferlösungen**

Weitere Versuche ergaben, dass die Verwendung von Natrium-Carbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,5 als Beschichtungs-Puffer die besten Resultate erzielte. PBS, NaCl und H<sub>2</sub>O waren hingegen weniger geeignet. Als Wasch- und Verdünnungspuffer wurde aus 12 verschiedenen Puffern PBS + 0,1% Tween 20 ausgewählt (siehe 2.1.7.3).

#### **3.1.3.3 Auswahl der Blockierungslösung**

Eine bestmögliche Blockierung der freien Bindungsstellen wurde durch Roti-Block in einer Verdünnung von 1:10 erreicht. Die restlichen untersuchten Substanzen (Fetales Kälberserum, Milchpulver, Chicken-Albumin, Pferde-Serum, Ultra-Block) wurden daher vernachlässigt. Als Blockierungspuffer kam PBS + 0,05%Tween20 zum Einsatz.

#### **3.1.3.4 Bestimmung der Anzahl der Waschschrte**

Durch Einfügen, bzw. Auslassen der Waschschrte nach Inkubation der einzelnen Komponenten konnten ebenfalls Verbesserungen erzielt werden. Als optimal erwies es sich, nach dem Beschichten 2x zu waschen, nach dem Blockieren jedoch nicht. Die üblichen 3 Waschschrte nach Inkubation der Seren, des Detektions- sowie des Zweit-Antikörpers wurden beibehalten.

### 3.1.3.5 Ausschluss unspezifischer Bindungen

Um unspezifische Bindungen der Seren, des Detektions- oder des Zweit-Antikörpers an die unbeschichtete Platte auszuschließen, wurde nur der Zweit-Antikörper, bzw. zuerst der Detektionsantikörper und danach der Zweit-Antikörper direkt auf die Platte gegeben, ohne die Platte vorher mit dem Core-Protein zu beladen. Anschließend folgte wie üblich die Zugabe des Farbsubstrates.

Außerdem wurden die Seren direkt auf die unbeschichtete Platte gegeben; nach Zugabe eines Enzym-gekoppelten Zweit-Antikörpers (diesmal gegen Schweine-Antikörper gerichtet) erfolgte auch hier die Zugabe des Farbsubstrates.

In allen Vertiefungen zeigte sich nach der Messung im ELISA-Reader eine  $OD < 0,08$ . Damit wurde ausgeschlossen, dass die Seren, bzw. Detektions- oder Zweit-Antikörper direkt an die Platte binden.

Des Weiteren wurde der Zweit-Antikörper auf die beschichtete Platte aufgetragen und anschließend mit dem Farbsubstrat inkubiert. Auch hier zeigten die OD-Werte, dass zwischen Zweit-Antikörper und Core-Protein keine Bindung stattfindet.

### 3.1.3.6 Zwischenfixation

Der Hintergrund einer Fixierung ist die Denaturierung und Vernetzung von Proteinen. Dies dient der Immobilisation gebildeter Antigen-Antikörper-Komplexe. Allerdings kann es auch zur Reduktion der Antigenität oder zur Behinderung der Antikörperbindung führen. Anwendung findet dieses Verfahren meist in der Arbeit mit Zellkulturen.

In Erwartung, durch Zwischenfixation eine Stabilisierung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe zu erreichen und damit bessere Ergebnisse zu erzielen, wurde im Rahmen der Vorversuche eine Fixierung mit Ethanol (70%, 100%), Methanol-Aceton und Paraformaldehyd durchgeführt. Eine Inkubation mit 70% Ethanol nach Inkubation der Seren erzielte eine Verbesserung der Ergebnisse und wurde deswegen in allen weiteren Versuchen fortgeführt.

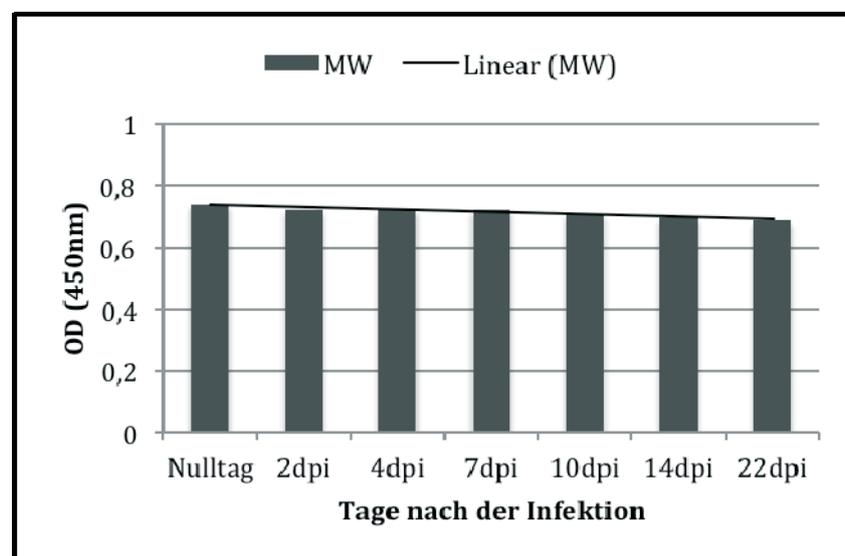
## 3.2 Untersuchung der Testseren

### 3.2.1 Verlaufskontrolle der C-Stamm-Gruppe

Im Rahmen eines Tierversuches wurden 2 Gruppen mit insgesamt 8 Tieren (302-309) mit dem KSPV  $\Delta$ Core pCR85 immunisiert. Eine weitere Gruppe aus 5 Tieren (297-301) wurde mit dem C-Stamm immunisiert. 28 Tage nach der Infektion (dpi) erfolgte die Infektion mit dem KSPV-Koslov. Weitere 28 Tage (C-Stamm-Gruppe), bzw. 21 Tage ( $\Delta$ Core pCR85-Gruppe) später wurden die Tiere euthanasiert und die Endtags-Seren gewonnen. Außerdem wurden im Verlauf des Tierversuches in regelmäßigen Abständen Serumproben gewonnen.

Nachdem die wichtigsten Komponenten des kompetitiven ELISAs sowie weitere Bestandteile ausgewählt worden waren, wurden nun die Seren der C-Stamm-Gruppe aus dem Tierversuch unter den ermittelten Bedingungen getestet.

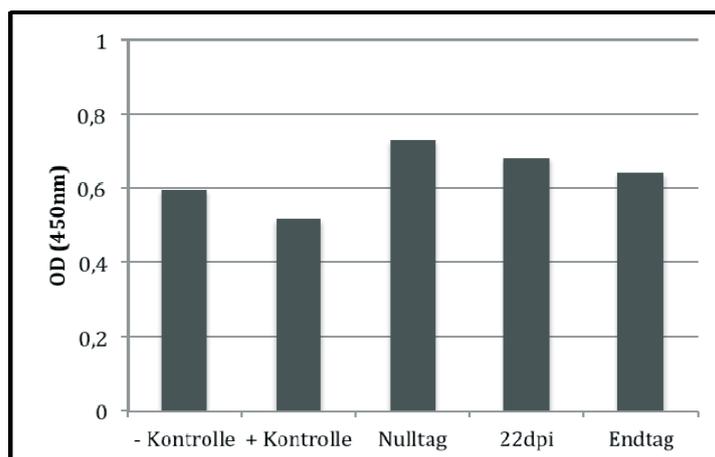
Von jedem Tier wurden Seren von 7 verschiedenen Zeitpunkten (Nulltag, 2dpi, 4dpi, 7dpi, 10dpi, 14dpi, 22dpi) verwendet. Für jeden Zeitpunkt wurde aus den gemessenen OD-Werten der 5 Tiere der Mittelwert gebildet. In Abbildung 11 kann man anhand der Trendlinie über den Mittelwerten einen geringgradigen Abfall vom Nulltag bis hin zum 22dpi erkennen.



**Abb. 11: Kompetitiver ELISA mit jeweils 7 Seren (Nulltag bis 22dpi) aller 5 Tiere der C-Stamm-Gruppe (297-301); für jeden Zeitpunkt wurde aus den OD-Werten der 5 Tiere der Mittelwert gebildet.**

Um eine Übersicht der Antikörperbildung von Anfang bis Ende des Tierversuches zu bekommen, wurden anschließend 2 Tiere (299, 300) ausgewählt. Von diesen 2 Tieren wurden Serumproben vom Nulltag, 22dpi und vom Endtag ausgewählt und ebenfalls im kompetitiven

ELISA unter den ermittelten Bedingungen getestet. Wieder wurde für jeden Zeitpunkt der Mittelwert der gemessenen OD-Werte ermittelt. Auch hier kann man einen geringen Abfall der OD-Werte erkennen (siehe Abb. 12). Dies bedeutet, dass die Tiere im Laufe der Zeit tatsächlich geringe Mengen spezifischer Antikörper gegen das Core-Protein gebildet haben. Diese Antikörper konkurrieren mit dem Detektionsantikörper um die Bindungsstellen des Core-Proteins und führen zu dem geringgradigen Abfall der optischen Dichte.



**Abb. 12: Kompetitiver ELISA mit den Kontroll-Seren sowie jeweils 3 Seren (Nulltag, 22dpi, Endtag) von 2 Tieren aus der C-Stamm-Gruppe (299, 300); für jeden Zeitpunkt wurde aus den OD-Werten der 2 Tiere der Mittelwert gebildet.**

In Abbildung 12 sind außerdem die beiden Kontroll-Seren aufgeführt. Es ist erkennbar, dass alle Proben, auch das Endtagsserum, zu höheren OD-Werten führten als das negative Kontroll-Serum. Die Bestimmung eines „cut-off“-Wertes, um zwischen positiven und negativen Seren zu unterscheiden, war dadurch nicht möglich.

Diese Ergebnisse machten es erforderlich, weitere Optimierungsschritte zur Verbesserung des ELISAs zu unternehmen. Als Orientierung diente dabei die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums. Nach der Durchführung eines ELISAs auf Basis der bisher ermittelten Bedingungen wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Ausgangswerte der Kontroll-Seren, bzw. der Seren der C-Stamm-Gruppe berechnet. Sie sollten im Laufe und nach Abschluss der Optimierung als Vergleich dienen.

	PI (%)
Tier 299 (ET zu Nulltag)	5,78
Tier 300 (ET zu Nulltag)	18,44
Kontroll-Seren (positiv zu negativ)	46,55%

### 3.3 Optimierung der Versuchsbedingungen

Durch die Verbesserung jedes einzelnen Schrittes sollte der bisher entwickelte ELISA optimiert werden. In den folgenden Versuchen wurden immer die beiden Kontroll-Seren sowie alle bisher ermittelten Konzentrationen und Vorgehensweisen eingesetzt und jeweils ein Schritt oder eine Komponente im Ablauf variiert. Zum Vergleich wurde stets die bekannte Variante durchgeführt und mit dem Ergebnis neuer Varianten verglichen. Ergab sich eine Verbesserung, so wurde diese Variante in den Ablauf des ELISAs übernommen und fortan beibehalten. Mit jedem Schritt ergab sich also eine Veränderung im praktischen Ablauf. Beurteilt wurde dabei stets die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums. Der Ausgangswert von 46,55% sollte mit jedem Schritt gesteigert werden.

Zur Übersicht noch einmal die bisher ermittelten Konzentrationen, bzw. Vorgehensweisen:

- Antigen: Core<sub>169-253</sub>, 50ng
- Seren: - Kontrolle, 1:2 verdünnt; + Kontrolle, 1:40 verdünnt
- Detektionsantikörper: C2, 20ng
- Zweit-Antikörper: Ziege  $\alpha$  Maus, 1:3000 verdünnt
- Mikrotiterplatten: Maxisorp
- Puffer:
  - o Beschichten: Natriumcarbonat, pH 9,5
  - o Blockieren: Roti-Block (1:10) in PBS + 0,05% Tween20
  - o Waschen: PBS + 0,1% Tween20
- Waschschritte:
  - o Nach Beschichten 2x waschen
  - o Nach Blockieren nicht waschen
  - o Nach Seren, Detektions- bzw. Zweit-Antikörper 3x waschen
- Zwischenfixation: Ethanol 70%, nach Inkubation der Seren

Ansonsten erfolgte die Durchführung wie im allgemeinen Versuchsablauf vor Beginn der Experimente beschrieben.

### 3.3.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten

Entscheidend für eine erfolgreiche Beschichtung der Platte ist nicht nur der richtige Puffer und die Platten, sondern auch die Temperatur und Inkubationszeit. Deshalb wurde in diesem Versuch jeweils eine Platte bei 25°C bzw. bei 37°C über eine Stunde inkubiert. Die dritte Platte wurde bei 4°C über Nacht inkubiert (siehe Abb. 13).

Die besten Ergebnisse lieferte die Inkubation bei 4°C über Nacht, so dass diese Variante weitergeführt wurde.

	4°C über Nacht	25°C 1 Stunde	37°C 1 Stunde
PI (%)	46,247	43,158	43,563

**Abb. 13: Kompetitiver ELISA mit Variation der Inkubationstemperatur und -zeit während der Beschichtung;** dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

### 3.3.2 Optimierung der Blockierung

Ebenso wie die Auswahl der Blockierungslösung wurde auch die Inkubationszeit in mehreren Vorversuchen untersucht. Eine Verkürzung von bisher 30 Minuten auf 15 Minuten brachte allerdings nur eine geringe Steigerung der prozentualen Inhibition um ca. 2%, während eine Verlängerung auf 60 Minuten sogar mit einer deutlichen Verschlechterung einherging. Die prozentuale Inhibition sank dabei um ca. 5% ab. Eine Änderung der Inkubationszeit erschien daher nicht sinnvoll.

### 3.3.3 Inkubationsbedingungen der Seren

#### 3.3.3.1 Inkubationstemperatur

Auch eine Variation der Temperatur während der Inkubation der Seren erfolgte im Rahmen der Versuche. Inkubiert wurde bei 37°C, 25°C und bei 4°C jeweils 1 Stunde (siehe Abb. 14). Als gut geeignet erwies sich eine Temperatur von 25°C, die daher für die folgenden Versuche übernommen wurde.

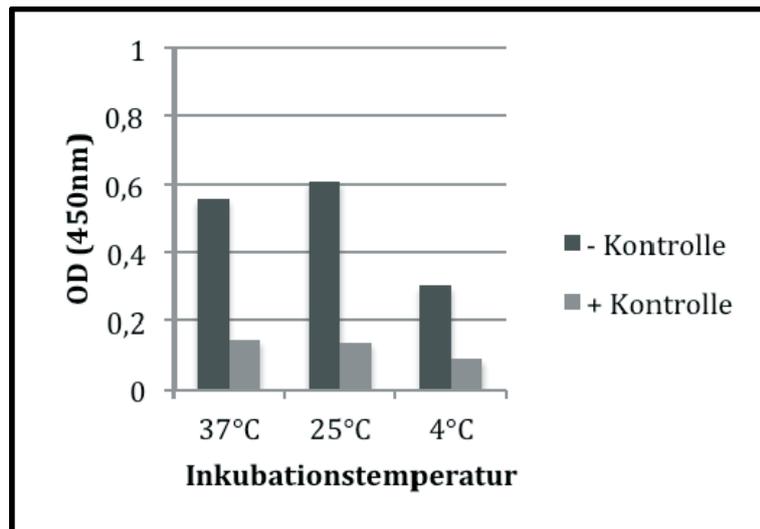


Abb. 14: Kompetitiver ELISA mit Variation der Inkubationstemperatur der Seren; dargestellt ist die optische Dichte, gemessen bei 450nm.

### 3.3.3.2 Inkubation auf dem Schüttler

Außerdem wurde in 2 Fällen zusätzlich zur Temperaturveränderung während der Inkubation geschüttelt. Dadurch sollte eine bessere Bindung der Antikörper erreicht werden. Einmal wurde nur während der Inkubation der Seren geschüttelt, im zweiten Fall sowohl während der Inkubation der Seren, als auch während der Inkubation des Detektions- und Zweit-Antikörpers (siehe Abb. 15). Die erzielte Verbesserung durch das Schütteln war allerdings minimal, so dass diese Veränderung nicht beibehalten wurde.

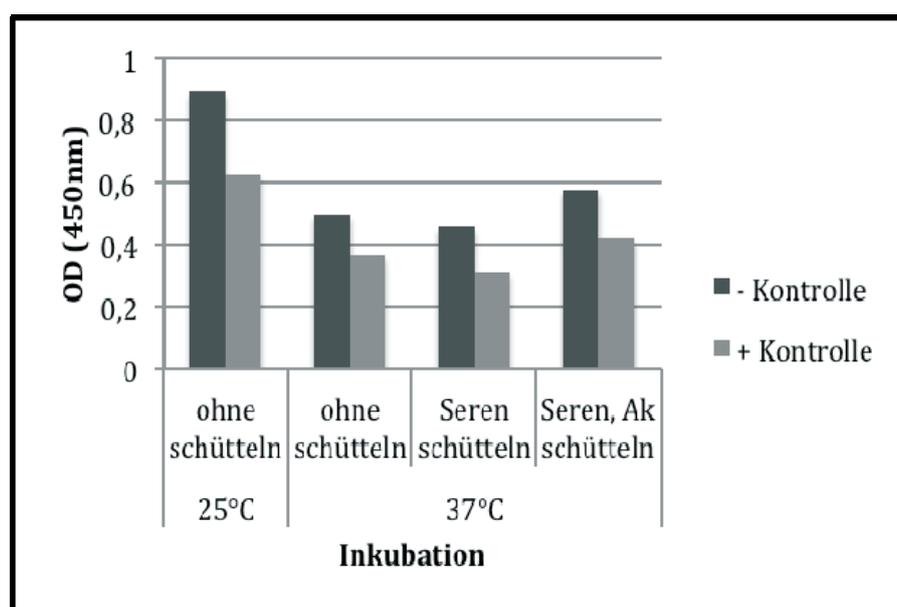


Abb. 15: Kompetitiver ELISA mit 4 unterschiedlichen Inkubationsarten der Seren, variiert wurden Temperatur und Schüttler; dargestellt ist die optische Dichte, gemessen bei 450nm.

### 3.3.3.3 Inkubationszeit

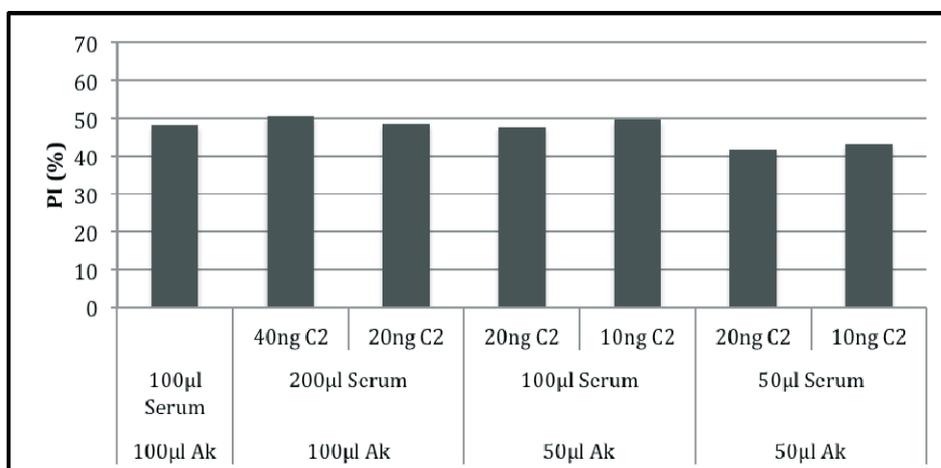
Außerdem wurde wie bei der Blockierung auch bei den Seren die Inkubationszeit variiert. Die übliche Zeit von 60 Minuten wurde auf 30 Minuten verkürzt, bzw. auf 120 Minuten verlängert. Die Verlängerung auf 120 Minuten brachte eine Verbesserung der prozentualen Inhibition um ca. 6% (siehe Abb. 16). Bei den folgenden Versuchen wurden die Seren also 2 Stunden inkubiert.

	60 Minuten	30 Minuten	120 Minuten
PI(%)	56,007	31,958	62,037

**Abb. 16: Kompetitiver ELISA mit Variation der Inkubationszeit der Seren;** dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

### 3.3.3.4 Änderung der Mengenverhältnisse

Bisher wurden von Serum, bzw. von Detektions- und Zweit-Antikörper jeweils 100µl eingesetzt. Ein weiterer Versuch bestand darin, das Mengenverhältnis des Serums zu den Antikörpern zu verändern. Ziel dieses Versuches war eine bessere Bindung der Serum-Antikörper an die beschichtete Platte und folglich auch eine Verbesserung der Competition. Die eingesetzte Menge wurde einmal auf 200µl Serum erhöht, von Detektions- und Zweit-Antikörper wurden jeweils aber nur 100µl pipettiert. In 2 weiteren Reihen wurde das Serum bei 100µl belassen, die beiden Antikörper allerdings auf je 50µl reduziert. Außerdem wurden in 2 Reihen alle 3 Komponenten auf je 50µl reduziert. Der Detektionsantikörper wurde dabei jeweils in 2 Konzentrationen eingesetzt (siehe Abb. 17). Eine deutliche Verbesserung konnte mit diesen Methoden allerdings nicht erreicht werden.



**Abb. 17: Kompetitiver ELISA mit Erhöhung der Menge an Serum, bzw. Verringerung der Menge an Detektions- und Zweit-Antikörper;** dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

### 3.3.4 Inkubationsbedingungen des Detektionsantikörpers

#### 3.3.4.1 Inkubationszeit

Auch beim Einsatz des Detektionsantikörpers wurde nach einer Optimierung der Inkubationszeit gesucht. Zusätzlich zur bisherigen Inkubationszeit von 1 Stunde wurden Mikrotiterplatten für 30 Minuten, bzw. für 120 Minuten inkubiert. Es stellte sich heraus, dass die Kombination einer Inkubationszeit der Seren von 2 Stunden mit einer Inkubationszeit des Detektionsantikörpers von 30 Minuten zu einer deutlichen Verbesserung der prozentualen Inhibition von ca. 9% führte (siehe Abb. 18).

	60 Minuten	30 Minuten	120 Minuten
PI (%)	57,056	66,970	52,795

**Abb. 18: Kompetitiver ELISA mit Variation der Inkubationszeit des Detektionsantikörpers;** dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

#### 3.3.4.2 Gleichzeitige Inkubation der Seren mit dem Detektionsantikörper

In allen bisherigen Versuchen wurden die Seren getrennt von Detektions- bzw. Zweit-Antikörper inkubiert. Durch eine gleichzeitige Inkubation sollte die Kompetition zwischen Serum- und Detektionsantikörper verstärkt werden. Entweder, der Detektionsantikörper wurde nach 1h zu den Seren hinzugegeben, oder aber Seren und Detektionsantikörper wurden von Anfang an zusammen inkubiert, wobei jeweils die Mengen (je 50µl, bzw. 100µl) sowie die Inkubationszeit (1h, bzw. 2 h) variiert wurden. Nach Abschluss der Inkubation und 3 anschließenden Waschschritten wurde der Zweit-Antikörper einzeln inkubiert (siehe Abb. 19).

Bei einer Variante (100µl Serum 1h Inkubation, 100µl Detektionsantikörper dazu, 1h Inkubation) zeigte sich eine Verbesserung der prozentualen Inhibition um ca. 7% gegenüber der bekannten Variante (getrennte Inkubation der 3 Komponenten; Serum 2h, Detektionsantikörper 1h, Zweit-Antikörper 1h).

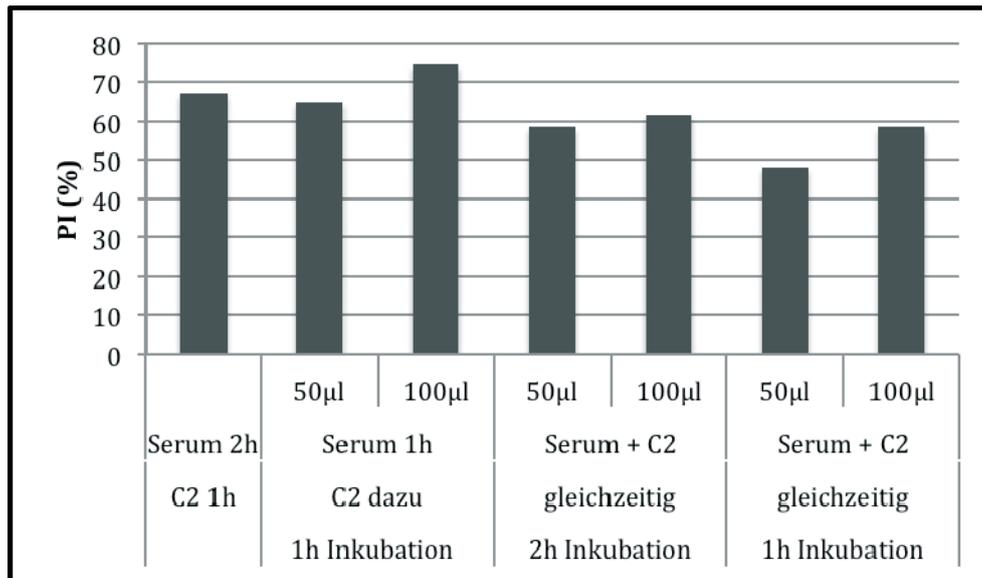


Abb. 19: Kompetitiver ELISA mit verschiedenen Varianten von gleichzeitiger Inkubation von Serum und Detektionsantikörper (C2); dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

### 3.3.4.3 Gleichzeitige Inkubation der Seren mit Detektions- und Zweit-Antikörper

Ein weiterer Versuch war die gleichzeitige Inkubation von Seren, Detektions - und Zweit-Antikörper. Dabei wurden jeweils 50µl pro Well pipettiert und unterschiedlich lange inkubiert (30, 60, 120 Minuten). Auch hier zeigte sich bei einer Variante (Inkubation 120 Minuten) eine geringe Verbesserung der prozentualen Inhibition von ca. 7% (auch hier wieder im Vergleich zur getrennten Inkubation der 3 Komponenten; Seren 2h, Detektionsantikörper 1h, Zweit-Antikörper 1h) (siehe Abb. 20). Dies stellte also ebenfalls eine Möglichkeit dar, die prozentuale Inhibition zu verstärken.

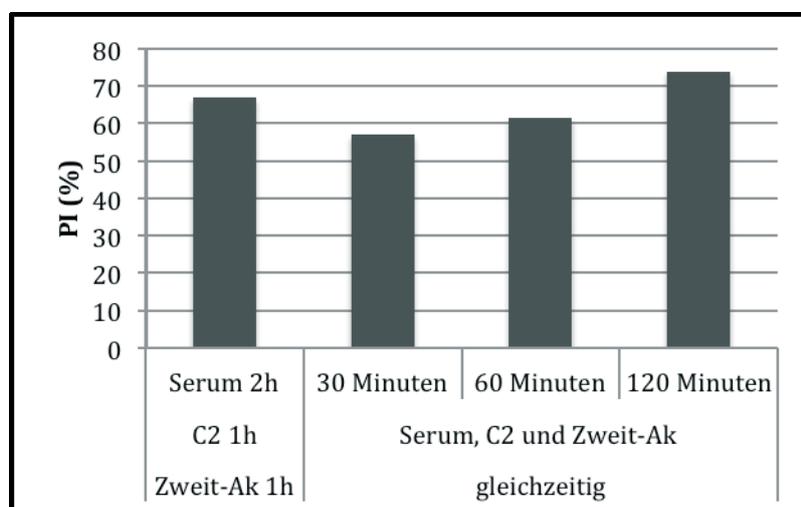


Abb. 20: Kompetitiver ELISA mit gleichzeitiger Inkubation von Serum, Detektions- und Zweit-Antikörper; dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

Bei beiden Versuchen konnte eine Verbesserung gegenüber der getrennten Inkubation von ca. 7% erreicht werden. Da im vorangegangenen Versuch zur Inkubationszeit des Detektionsantikörpers die Verbesserung von 9% jedoch noch deutlicher war, wurde die Entscheidung getroffen, zukünftig die Seren 2 Stunden und den Detektionsantikörper 30 Minuten zu inkubieren. Die Varianten mit einer gleichzeitigen Inkubation wurden nicht beibehalten.

### 3.3.5 Inkubationsbedingungen des Zweit-Antikörpers

Nachdem bereits die Inkubationszeiten der Seren und des Detektionsantikörpers optimiert worden waren, kam nun der Zweit-Antikörper an die Reihe. Die übliche Inkubationszeit von 60 Minuten wurde auch diesmal auf 30 Minuten verkürzt, bzw. auf 120 Minuten verlängert. Die Verlängerung der Inkubationszeit war in sofern nicht sinnvoll, als sie mit einer Verschlechterung der prozentualen Inhibition einherging. Eine Verkürzung von 60 Minuten auf 30 Minuten brachte zwar keine Verbesserung, allerdings auch keine Verschlechterung der Ergebnisse (siehe Abb. 21). Daher wurde der Zweit-Antikörper bei den weiteren Versuchen 30 Minuten lang inkubiert.

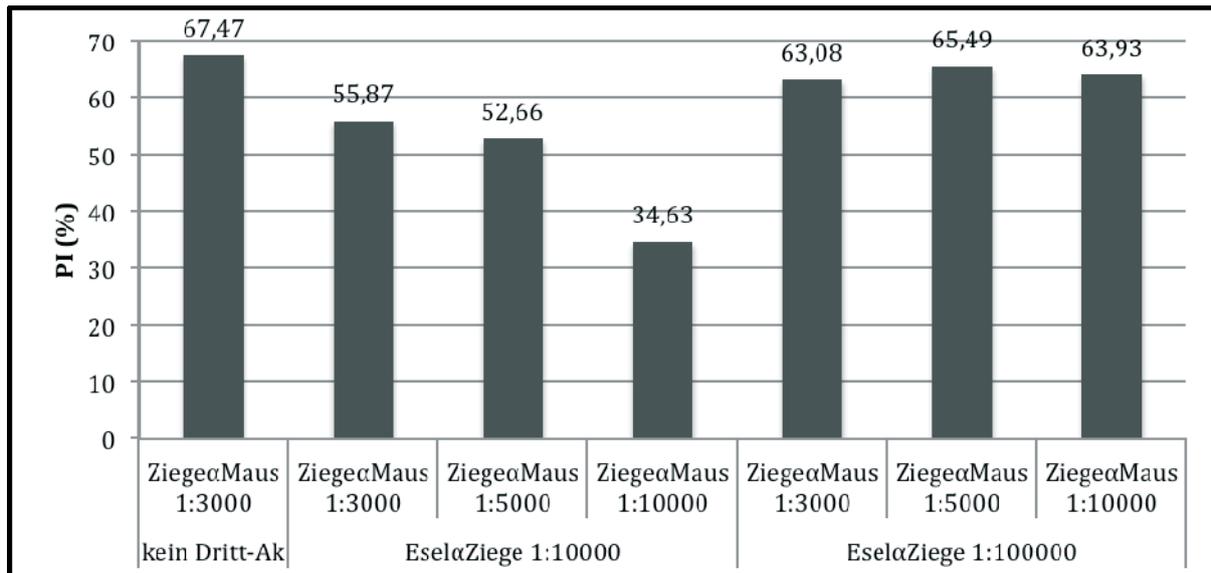
	60 Minuten	30 Minuten	120 Minuten
PI (%)	67,471	67,391	59,041

**Abb. 21: Kompetitiver ELISA mit Variation der Inkubationszeit des Zweit-Antikörpers;** dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

### 3.3.6 Verwendung eines Dritt-Antikörpers

Bei dem verwendeten Zweit-Antikörper Ziege  $\alpha$  Maus handelte es sich um einen Peroxidasegekoppelten Antikörper, der gegen die monoklonalen, aus der Maus stammenden Detektionsantikörper gerichtet war. Durch Einsatz eines Dritt-Antikörpers wurde nun versucht, das durch die TMB-Farblösung erreichte Farbergebnis zu intensivieren und dadurch den Unterschied zwischen positivem und negativem Kontroll-Serum hervorzuheben.

Als Dritt-Antikörper wurde deshalb ein Peroxidase-gekoppelter Esel  $\alpha$  Ziege-Antikörper eingesetzt, der gegen die aus der Ziege stammenden Zweit-Antikörper gerichtet war. Der Zweit-Antikörper wurde dabei in 3 verschiedenen Konzentrationen verwendet (1:3000, 1:5000, 1:10000) und jeweils mit 2 Konzentrationen des Dritt-Antikörpers kombiniert (1:10000, 1:100000) (siehe Abb. 22). Die prozentuale Inhibition konnte dadurch jedoch nicht verbessert werden. Die Anwendung des Dritt-Antikörpers erschien daher nicht sinnvoll.



**Abb. 22: Kompetitiver ELISA mit Verwendung eines gegen den Zweit-Antikörper gerichteten Dritt-Antikörpers;** dargestellt ist die prozentuale Inhibition des negativen Kontroll-Serums.

Nach Abschluss der Vorversuche ergab sich für die prozentuale Inhibition ein Ausgangswert von ca. 46%. Das Ziel der Optimierung war die größtmögliche Steigerung dieses Wertes. Bei jedem Optimierungsschritt wurde durch gezielte Auswahl die Variante mit den besten Ergebnissen übernommen. Dadurch konnte eine kontinuierliche Steigerung des PI-Wertes bis zum Endwert von ca. 67% erzielt werden, was eine Steigerung von ca. 45% zum Ausgangswert bedeutet.

### 3.3.7 Durchführung des ELISAs nach Abschluss der Optimierung

1. Mikrotiterplatte: Maxisorp
2. Antigen: 50ng Core<sub>169-253</sub>, in Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,5);  
Inkubation: über Nacht bei 4°C
3. Platte 2x waschen mit Waschpuffer (PBS + 0,1% Tween20)
4. 200µl Roti-Block (1:10) (in 10% FKS in PBS + 0,05% Tween20)  
Inkubation: 30 Minuten bei 37°C
5. Platte nicht waschen
6. 100µl Serum, 1:2 verdünnt  
Inkubation: 2 Stunden bei 25°C
7. Platte 1x waschen
8. 100µl EtOH (70%)  
Inkubation: 1 Minute bei 25°C
9. Platte 2x waschen
10. Detektionsantikörper: 20ng C2  
Inkubation: 30 Minuten bei 37°C
11. Platte 3x waschen
12. 100µl Ziege α Maus 1:3000  
Inkubation: 30 Minuten bei 25°C
13. Platte 3x waschen
14. 100µl TMB-Farblösung  
Inkubation: 5 Minuten bei 25°C
15. 100µl Stopplösung (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
16. Messung bei 450nm im ELISA-Reader

## 3.4 Untersuchung der Testseren

### 3.4.1 Verlaufskontrolle der C-Stamm-Gruppe

Nach Abschluss der Optimierung wurden die Serumproben aller Tiere der C-Stamm-Gruppe erneut untersucht. Ausgewählt wurden die Seren 2dpi, 22dpi sowie das Endtagsserum. Als Präimmuns serum diente nun das Serum 2dpi. Da davon ausgegangen werden kann, dass 2 Tage nach der Infektion noch keine Antikörper-Bildung stattgefunden hat, ist eine Verwendung anstelle des Nulltag-Serums möglich. Bis auf Tier 298 (22dpi) war bei allen Tieren ein kontinuierlicher Abfall der optischen Dichte erkennbar (siehe Abb. 23). Zur Auswertung wurde wieder für jeden Zeitpunkt der Mittelwert aus den OD-Werten der 5 Tiere gebildet. Auch hier ist ein Abfall der Trendlinie zu sehen (siehe Abb. 24).

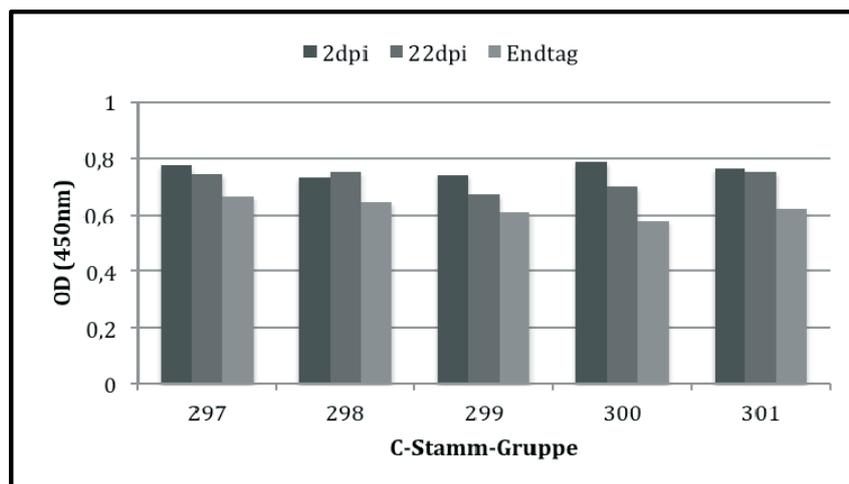


Abb. 23: Kompetitiver ELISA mit jeweils 3 Seren (2dpi, 22dpi, Endtag) aller Tiere der C-Stamm-Gruppe (297-301); dargestellt ist die optische Dichte, gemessen bei 450nm.

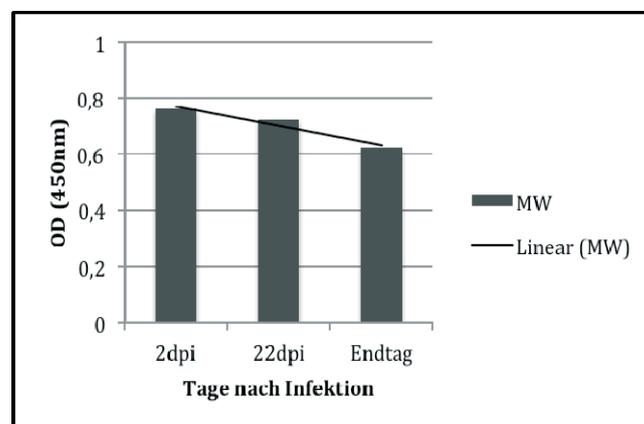


Abb. 24: Kompetitiver ELISA mit jeweils 3 Seren (2dpi, 22dpi, Endtag) aller Tiere der C-Stamm-Gruppe (297-301); für jeden Zeitpunkt wurde aus den OD-Werten der 5 Tiere der Mittelwert gebildet.

Vor Beginn der Optimierung war die PI (Endtag zu Nulltag) der beiden untersuchten Tiere noch relativ gering. Nach Anschluss der Optimierung wurden erneut die PI-Werte sowohl von den Kontroll-Seren als auch von Tier 299 und Tier 300 bestimmt.

	PI (%)
Tier 299 (ET zu 2dpi)	18,15
Tier 300 (ET zu 2dpi)	26,43
Kontroll-Seren (positiv zu negativ )	67,47

### 3.4.2 Verlaufskontrolle der KSPV $\Delta$ Core pCR85-Gruppen

Zwei andere Gruppen bestehend aus 8 Tieren wurden im Tierversuch mit dem KSPV  $\Delta$ Core pCR85 immunisiert. 5 Tiere (302-306) erhielten eine Dosis von  $10^6$ , 3 Tiere (307-309) hingegen eine geringere Dosis von  $10^4$ . Auch bei diesen beiden Gruppen erfolgte nach 28 Tagen die Infektion mit dem KSPV-Koslov. Nach weiteren 21 Tagen wurden die Tiere euthanasiert; auch hier wurden die Endtagsseren gewonnen.

Analog zur C-Stamm-Gruppe wurden Untersuchungen der entsprechenden Seren (2dpi, 22dpi, Endtag) durchgeführt und ausgewertet. Zur besseren Übersicht wurden auch hier wieder für jeden Zeitpunkt der Mittelwert aus den OD-Werten der 8 Tiere gebildet. Ein Abfall der OD-Werte konnte erst ab 22dpi erwartet werden, da die Tiere erst mit der Infektion mit dem KSPV-Koslov in Kontakt mit dem Core-Protein gekommen waren. Es war kein Abfall der OD-Werte zwischen 22dpi und Endtag erkennbar (siehe Abb. 25).

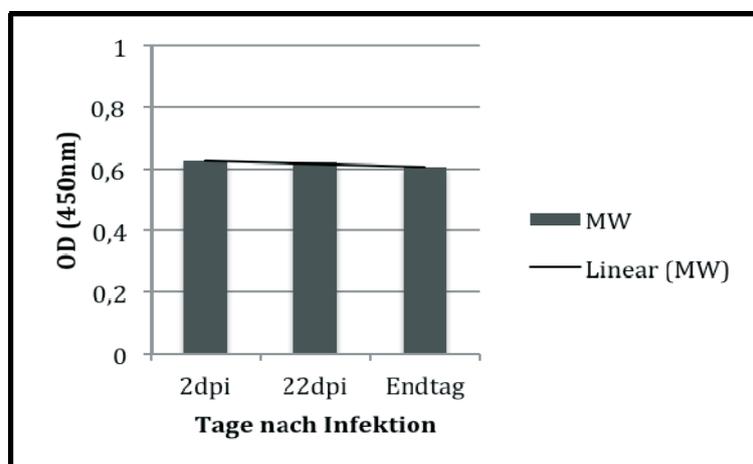
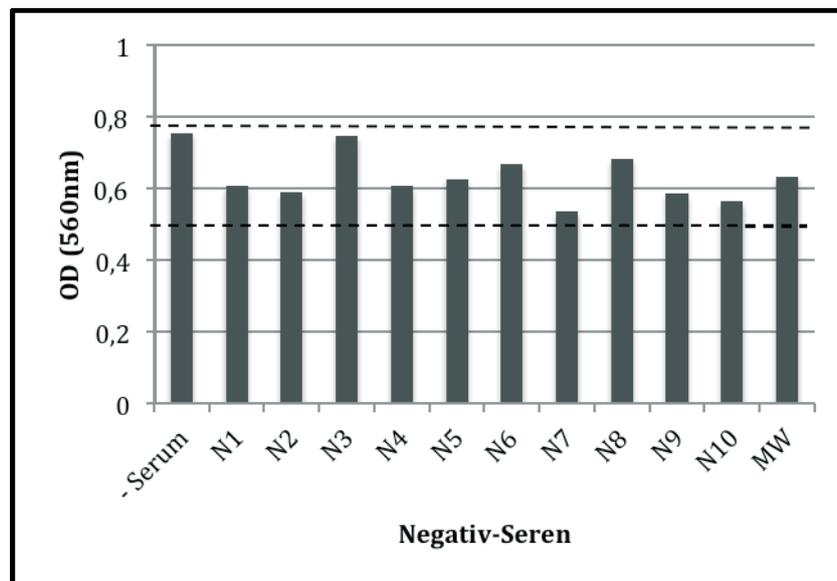


Abb. 25: Kompetitiver ELISA mit jeweils 3 Seren (2dpi, 22dpi, Endtag) aller Tiere der KSPV  $\Delta$ Core pCR85-Gruppe (302-309); für jeden Zeitpunkt wurde aus den OD-Werten der 8 Tiere der Mittelwert gebildet.

## 3.5 Validierung des ELISAs

### 3.5.1 Negativ-Seren

10 Schweine-Seren aus der Schweineklinik der Justus-Liebig Universität Gießen wurden mit dem bisher benutzten negativen Kontrollserum verglichen. Alle 11 Werte befanden sich innerhalb der doppelten Standardabweichung um den Mittelwert und waren somit als Kontrolle und zur Bestimmung des „cut-off“-Wertes geeignet (siehe Abb. 26).



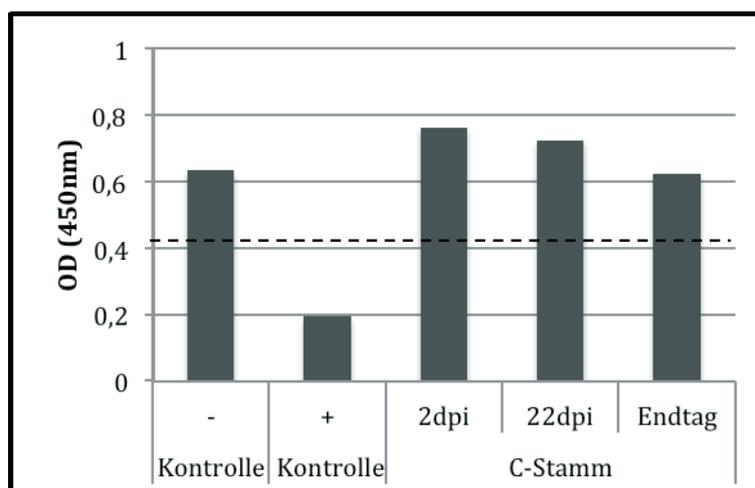
**Abb. 26: Kompetitiver ELISA mit dem negativen Kontroll-Serum, sowie 10 negativen Schweine-Seren aus der Schweine-Klinik und dem gebildeten Mittelwert der 11 OD-Werte; dargestellt als gestrichelte Linien sind ausserdem die doppelte positive und negative Standardabweichung.**

### 3.5.2 Bildung des „cut-off“-Wertes

Das andere durch die Optimierung zu lösende Problem war die Tatsache, dass die Immunsereen der Tiere aus der C-Stamm-Gruppe höhere OD-Werte aufwiesen als das negative Kontroll-Serum, und somit die Bestimmung eines „cut-off“-Wertes nicht möglich war. Er dient der Unterscheidung zwischen positiven und negativen Seren. Ermittelt wird er aus dem arithmetischen Mittelwert der negativen Kontroll-Seren und der dreifachen Standardabweichung. Alle Seren, die unterhalb dieses Wertes liegen, können als positiv betrachtet werden, während Seren im Bereich oberhalb der Grenze als zweifelhaft eingestuft werden.

	OD-Wert
Mittelwert der Negativ-Seren	0,633
Dreifache Standardabweichung	0,216
cut-off-Wert	0,417

Von allen getesteten Proben der C-Stamm-Gruppe lag keine unterhalb des bestimmten „cut-off“-Wertes von 0,417. Alle Proben befanden sich innerhalb der dreifachen Standardabweichung zum Mittelwert und waren daher als negativ einzustufen. Nur durch Vergleich des Endtagsserums mit dem jeweiligen Präimmunserum war die Bildung spezifischer Antikörper gegen das Core-Protein nachweisbar (siehe Abb. 27).



**Abb. 27: Kompetitiver ELISA mit jeweils 3 Seren (2dpi, 22dpi, Endtag) aller Tiere der C-Stamm-Gruppe (297-301); für jeden Zeitpunkt wurde aus den OD-Werten der 5 Tiere der Mittelwert gebildet. Dargestellt sind außerdem die Kontroll-Seren. Als gestrichelte Linie dargestellt ist der „cut-off“-Wert.**

### 3.5.3 Bestimmung von Spezifität und Sensitivität

Die Untersuchung der Seren aus dem Tierversuch nach Abschluss der Optimierung der Versuchsbedingungen ermöglichte es auch, Erkenntnisse bezüglich Spezifität und Sensitivität des ELISAs zu gewinnen.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Richtig-Negativ}}{\text{(Richtig-Negativ + Falsch-Positiv)}}$$

Die Spezifität bezeichnet den Anteil der richtig-negativen Resultate. Alle negativen Seren wurden als solche erkannt. Da keine falsch-positiven Resultate auftraten, betrug die Spezifität 100%.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Richtig-Positiv}}{\text{(Richtig-Positiv + Falsch-Negativ)}}$$

Sie stellt den Anteil der richtig-positiven Resultate dar. Da im Falle dieses ELISAs keines der positiven Seren als solches erkannt wurde, betrug die Sensitivität 0%.

## 4 Diskussion

### 4.1 Konzept der $\Delta$ Core-Markervakzine

Die zugelassene attenuierte Lebendvakzine (C-Stamm) kommt aufgrund der ständigen Infektionsgefahr für Hausschweine durch endemisch infizierte Wildschweine (Dahle & Liess, 1992; Kaden, 1998; Fritzsche et al., 2000) im Rahmen der oralen Immunisierung von Wildschweinen zum Einsatz (Kaden et al., 2000; Kaden & Lange, 2001). Innerhalb weniger Tage führt sie zur Bildung einer soliden Immunität (van Oirschot, 2003a; van Oirschot, 2003b) und schützt die Tiere vor Infektion und Erkrankung (Penrith et al., 2011). Die entstehende Seroprävalenz verschleiert jedoch die Erkennung von Tieren, die subklinisch mit dem Wildtyp infiziert sind. Die Folgen sind erhebliche Handelseinschränkungen (de Smit, 2000; Greiser-Wilke & Moennig, 2004; Kortekaas et al., 2010), was vor allem in Regionen mit weit verbreiteter KSP (z.B. Asien, Südamerika) von Bedeutung ist (Moennig, 2000). Diese Problematik führte zu dem in der EU seit den 90er Jahren bestehenden Impfverbot (Vandeputte & Chappuis, 1999; Moennig et al., 2003) und zur Einführung der großflächigen präventiven Keulung als Bekämpfungsstrategie. Der KSP-Ausbruch in den Niederlanden (1997/98) zeigte jedoch, dass dies nicht effizient ist, da nur 5 % der gekeulerten Tiere mit KSPV infiziert waren (Terpstra & de Smit, 2000). Aus tierschutzrechtlichen und ökonomischen Gründen ist die Entwicklung einer Markervakzine, die eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren ermöglicht, wünschenswert. Sie könnte die präventive Keulung verhindern (Moennig, 2000).

Zur Zeit sind zwei „Subunit“-Vakzinen gegen die KSP zugelassen, die Eigenschaften einer Markervakzine erfüllen. Aufgrund der eingeschränkten Wirksamkeit wird jedoch eine KSP-Marker-Lebendvakzine für die Bekämpfung der KSP gefordert. Im Rahmen der Eradikation der Aujeszky'schen Krankheit ist seit ca. 10 Jahren eine Deletions-Markervakzine weltweit im Einsatz (Stegeman et al., 1994; van Oirschot et al., 1996; Komáromi & Szabó, 2005; Moennig, 2005; Gómez-Sebastián et al., 2008). Durch Nachweis spezifischer Antikörper gegen das fehlende Glykoprotein im kompetitiven Enzym-Immuno-Assay gelang zunächst die Unterscheidung zwischen Antikörpern gegen Impfvirus und Wildtyp. Als Antigen dienten dabei infizierte Schweinenierenzellen (van Oirschot et al., 1986). Später erfolgte die Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren (DIVA) unter Verwendung des

Glykoproteins als Antigen mittels ELISA (van Oirschot et al., 1990; Gómez-Sebastián et al., 2008).

Hintergrund dieser Arbeit ist die Entwicklung einer KSP-Markervakzine mit dem Ziel der Anwendung als Schutzimpfung. Grundlage dieser Markervakzine ist die Deletion der für das Strukturprotein Core codierenden Gensequenz. Reimann et al. beschrieben 2007 die essentielle Funktion des Core-Proteins in der Virusmorphogenese. Infektionsfähiges KSP konnte nur durch Kultivierung auf Core-exprimierenden Zellen erzielt werden. In der Arbeitsgruppe Rümenapf gelang die Etablierung eines KSPV mit einer nahezu kompletten Deletion des Core-Gens. Die Fähigkeit infektiöse Partikel zu bilden, konnte durch eine kompensatorische Mutation im Nichtstrukturprotein NS3 wiederhergestellt werden. In Tierversuchen wurde der Impfstoffkandidat bezüglich Virulenz und Induktion einer protektiven Immunität untersucht. Die Virusisolierung aus dem Serum infizierter Schweine war nicht möglich. Auch zeigten die Tiere keine Anzeichen von Erkrankung. Sie bildeten sowohl gegen ein homologes KSPV (Stamm Alfort Tübingen, Vp447) (Riedel et al., 2010) als auch gegen ein heterologes KSPV (Stamm Koslov) eine protektive Immunantwort aus.

## 4.2 Bewertung der Ergebnisse

Ziel der Markervakzine ist neben dem Schutz der Tiere vor Infektion und Erkrankung auch die Erkennung von Tieren, die mit der Markervakzine geimpft und anschließend mit dem Feldvirus infiziert wurden. Diese Tiere können zu Virusausscheidern werden und müssen daher identifiziert werden. Ob durch die Infektion mit dem Feldvirus spezifische Antikörper gegen das Core-Protein gebildet werden und dadurch eine Unterscheidung zu geimpften Tieren möglich ist, soll mit Hilfe dieser Arbeit beantwortet werden. Vorversuche in der Arbeitsgruppe deuteten auf einen geringen Antikörper-Titer der Testseren hin. Es ist daher notwendig, dass der Test eine hohe Sensitivität mit einer hohen Spezifität verbindet. Ein im Rahmen von Vorversuchen in der Arbeitsgruppe durchgeführter indirekter ELISA zum Nachweis von Anti-Core-Antikörpern ergab eine unzureichende Sensitivität. Sie sollte durch die Verwendung eines kompetitiven ELISAs gesteigert werden. Dieser bietet die Vorteile, dass einerseits nicht aufbereitete Antigene eingesetzt werden können und andererseits unspezifische Reaktionen (Hintergrund) wesentlich geringer ausfallen als im indirekten ELISA (OIE, 2009). Er ermöglicht neben einem einfachen und schnellen Screening von großen Probenzahlen (Depner et al., 1995; Colijn et al., 1997; Greiser-Wilke et al., 2007) auch die Identifizierung einzelner infizierter Tiere. Durch einen spezifischen

Detektionsantikörper kann außerdem die Spezifität gesteigert werden. Analog zur Bekämpfung der Aujeszky'schen Krankheit soll daher der Nachweis spezifischer Antikörper gegen das fehlende Protein im kompetitiven ELISA stattfinden.

Durch Einsatz der beiden Kontroll-Seren (+ Kontrolle, - Kontrolle) während aller Versuche gelang die Etablierung und Optimierung des ELISAs. Die Ergebnisse des positiven Kontroll-Serums, das kontinuierlich eine hohe prozentuale Inhibition zeigte, erlauben eine Beurteilung der Immunogenität des Core-Proteins. Eine experimentelle Infektion mit aufgereinigtem, bakteriell erzeugtem Core<sub>169-250</sub> induziert offensichtlich die Bildung spezifischer Anti-Core-Antikörper. Entscheidend für den Erfolg dieser Arbeit war jedoch die Immunogenität des Core-Proteins nach Infektion mit dem KSPV. Die daraus resultierende Antikörper-Bildung muss eine Differenzierung von Tieren erlauben, die mit KSPV  $\Delta$ Core geimpft wurden. Damit sollte eine Bewertung der Marker-Vakzine bezüglich ihrer Anwendbarkeit getroffen werden. Im Rahmen der Versuche wurden deshalb unterschiedliche Tiergruppen untersucht und verglichen. Zum Einsatz kamen Testseren von Tieren, die mit dem KSPV  $\Delta$ Core bzw. dem C-Stamm immunisiert wurden. 28 Tage später erfolgte bei beiden Gruppen eine Belastungsinfektion (Challenge) mit dem KSPV Koslov.

Die Ergebnisse der C-Stamm-Gruppe zeigten, dass das Core-Protein nicht nur als einzelnes Protein, sondern auch nach Infektion mit dem KSPV über immunogene Eigenschaften verfügt und die Bildung spezifischer Antikörper bewirkt. Das Endtagsserum zeigte im Vergleich zum Präimmunserum ein geringgradig positives Signal. Die daraus resultierende prozentuale Inhibition (PI) ist durch einen geringen Gehalt an Antikörpern zu erklären, die gegen das vom Detektionsantikörper erkannten Epitop gerichtet sind. Durch Optimierung der Versuchsbedingungen konnte sowohl die PI der Kontroll-Seren als auch die PI der Testseren deutlich gesteigert werden. Aber auch nach Abschluss der Versuche war ein Unterschied zu erkennen. Sowohl vor als auch nach der Optimierung zeigten die Testseren eine deutlich geringere prozentuale Inhibition als die Kontroll-Seren.

	PI (%) vor Optimierung	PI (%) nach Optimierung	Steigerung der PI in %
Tier 299	5,78	18,15	214,01
Tier 300	18,44	26,43	43,33
Kontroll-Seren	46,55	67,47	44,94

Die Immunsereen (22dpi, Endtag) der C-Stamm-Gruppe wiesen außerdem höhere, bzw. in etwa gleiche OD-Werte auf wie das negative Kontroll-Serum. Daher konnte die Antikörperbildung nur durch Vergleich mit dem jeweiligen Präimmunsereum nachgewiesen werden. Mit Hilfe des gebildeten „cut-off“-Wertes war keine Identifizierung der Immunsereen (22dpi, Endtag) möglich. Weder durch Optimierung der Beschichtung und der Blockierung, noch durch Optimierung der Inkubation der Seren, des Detektions- sowie des Zweit-Antikörpers konnte dieses Problem gelöst werden. Durch mehrere Veränderungen wurde versucht, die geringe Sensitivität zu steigern. Zum einen wurde die Menge an Serum erhöht. Eine Verbesserung der prozentualen Inhibition konnte dadurch allerdings nicht erreicht werden. Die verlängerte Inkubationszeit der Seren von 2 Stunden in Kombination mit der verkürzten Inkubationszeit des Detektionsantikörpers von 30 Minuten lieferte hingegen gute Ergebnisse. Dies lässt sich durch den geringen Antikörpergehalt erklären. Die vorhandenen Antikörper brauchen längere Zeit, um an das Core-Protein zu binden und dadurch mit dem Detektionsantikörper zu konkurrieren. Mögliche Fehler wie z.B. ein verschobenes Verhältnis von Serum- und Detektionsantikörper zugunsten des Detektionsantikörpers, etwa durch eine unzureichende Blockierung oder eine zu hohe Konzentration des Detektionsantikörpers, konnten ausgeschlossen werden. Dasselbe gilt für eine zu geringe Konzentration des Core-Proteins. Der Gehalt an Antikörpern, die gegen das vom Detektionsantikörper erkannten Epitop gerichtet sind, ist nach Infektion mit dem KSPV folglich nur gering.

Nach einer Infektion mit KSPV  $\Delta$ Core können keine spezifischen Anti-Core-Antikörper vorhanden sein. Erst nach Challenge mit KSPV Koslov ist eine Antikörperbildung gegen das Core-Protein möglich. Die Endtagssereen der KSPV  $\Delta$ Core-Gruppe zeigten jedoch ein negatives Signal. Es sind folglich keine Antikörper gegen das vom Detektionsantikörper erkannten Epitop nachweisbar. KSPV  $\Delta$ Core induziert die Bildung einer protektiven Immunität und kann dadurch die Antikörperbildung nach Challenge beeinflussen. Mit Hilfe des entwickelten ELISAs ist eine Erkennung von Tieren, die mit der Markervakzine geimpft und anschließend mit dem Feldvirus infiziert worden sind, nicht möglich.

Für den geringen Antikörpergehalt der Testseren kommen mehrere Ursachen in Frage. Entscheidend ist die Verfügbarkeit des Core-Proteins für das Immunsystem des infizierten Tieres. Diese wiederum ist einerseits abhängig von der Lage des Proteins im Viruspartikel und andererseits von seiner Stabilität im Organismus. Nur die Erkennung des Proteins durch T- und B-Zellen kann eine spezifische Immunantwort und damit die Produktion spezifischer

Antikörper auslösen. Das KSPV-Core-Protein liegt innerhalb der Lipidhülle des Viruspartikels (Horzinek et al., 1971; Rümenapf et al., 1991; Lindenbach et al., 2007) und hat somit keinen direkten Kontakt zu Immunzellen. Erst nach Phagozytose von Viruspartikeln durch Antigen-präsentierende Zellen erfolgt die Präsentation von Core-Peptiden in Verbindung mit dem MHC-II-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex) an der Zelloberfläche. In infizierten Zellen ist das Protein jedoch sehr instabil (Rümenapf, persönliche Mitteilung). Die Präsentation von Peptiden und deren Erkennung durch T-Zellen, sowie die anschließende Aktivierung der Antikörper-produzierenden B-Zellen können dementsprechend auch geringer ausfallen. Eine direkte Stimulation der B-Zellen findet auch nur in geringem Maße statt, da sich vermutlich kaum freies Core-Protein in der Blutbahn befindet (Rümenapf, persönliche Mitteilung). Bestätigt werden diese Überlegungen durch die Tatsache, dass eine Infektion mit bakteriell erzeugtem Core-Protein zu einer stärkeren Immunreaktion und somit auch zu einem höheren Gehalt an Anti-Core-Antikörpern führt. Da keine Adjuvantien zur Verstärkung der Immunantwort verwendet wurden, beruht die stärkere Immunreaktion darauf, dass das Protein dem Immunsystem direkt zur Verfügung steht.

### **4.3 Systeme zum Nachweis spezifischer Wildtyp-Antikörper sind essentielle Bestandteile der Markerimpfstoff-Entwicklung**

Die Entwicklung des kompetitiven ELISAs ist durch seine Zahl an Variablen komplex und erfordert für ein optimales Ergebnis eine genaue Abstimmung der Komponenten aufeinander. Zu jedem einzelnen Schritt wurden viele Varianten untersucht und je nach Reaktion für die weiteren Versuche ausgewählt, bzw. ausgeschlossen. Das Ergebnis ist ein ELISA mit den jeweils am besten reagierenden Komponenten, die aufeinander abgestimmt sind. Er ist ein wichtiges Kriterium beim Entwicklungsprozess der KSPV-Markervakzine. Mit seiner Hilfe gelang der Nachweis spezifischer Anti-Core-Antikörper. Es konnte gezeigt werden, dass nach Infektion mit dem C-Stamm gegen ein Epitop des Core-Proteins, das vom Detektionsantikörper C2 erkannt wird, Antikörper gebildet werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, zwischen Markervakzine und Wildtyp zu unterscheiden. Es ist davon auszugehen, dass noch Potential zur Weiterentwicklung des ELISAs vorhanden ist.

Eine KSPV-Infektion führt durch Apoptose der Lymphozyten zu einer Lymphopenie (Sánchez-Cordón et al., 2005b; Summerfield et al., 2006). Die damit einhergehende Immunsuppression kann ein grundsätzliches Problem darstellen. Es ist zu vermuten, dass sie Einfluss auf die Antikörperbildung im Tier hat. Während lediglich niedrigvirulente Stämme

zur Bildung von Antikörpern und zu chronischen Infektionen führen, werden bei Infektionen mit hochvirulentem KSPV keine Antikörper gebildet, da 90% der Tiere innerhalb kurzer Zeit versterben. Durch weitere Untersuchungen, z.B. persistent infizierter Tiere, könnte eine Aussage zum Antikörper-Titer nach Infektion mit dem Wildtyp getroffen werden. Der Titer selbst ist nicht beeinflussbar. Allerdings wäre einer Aufbereitung der Seren mit dem Ziel einer Konzentration der Antikörper denkbar. Außerdem sollte durch weitere Experimente versucht werden, die Sensitivität des entwickelten ELISAs zu steigern, so dass eine eindeutige Unterscheidung zwischen positiven und negativen Seren möglich wird, ohne auf Präimmunsereen angewiesen zu sein. Zum Beispiel kann der Einsatz eines bereits Enzym-konjugierten Detektionsantikörpers die Sensitivität steigern (OIE, 2009).

Der durch unspezifische Bindungen hervorgerufene Hintergrund wurde bereits im Rahmen der durchgeführten Versuche durch mehrfache Optimierung der Blockierung reduziert. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Weiterentwicklung des Antigens. Da das Core-Protein stark positiv geladen ist, kann es in der Nähe des Epitops, an das der Detektionsantikörper bindet, zur Bindung von unspezifischen Antikörpern kommen. Da das Epitop dann nicht mehr als Bindungsstelle für den Detektionsantikörper zur Verfügung steht, kann dies bereits zu einer Hemmung führen. Eine Lösung dieses Problems könnte die Verwendung von Peptiden, die das entsprechende Epitop enthalten, als Antigen sein.

Optimierungsbedarf besteht sicherlich bei der Wahl des Detektionsantikörpers. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde der in Vorversuchen am stärksten reagierende Anti-Core-Antikörper ausgewählt. Diese Eigenschaft allein reicht aber nicht aus, denn es muss sichergestellt werden, dass das vom Detektionsantikörper erkannte Epitop auch im infizierten Tier regelmäßig zur Bildung spezifischer Antikörper führt. Dies kann nur empirisch mit einer großen Zahl an Seren bestimmt werden. Daher kann die für den monoklonalen Antikörper C2 gemessene, unzureichende Trennschärfe durchaus auf ein „ungeeignetes“ Epitop zurückgeführt werden. Zudem ist bei der Wahl des Detektionsantikörpers dessen Avidität zu beachten. Sie bezeichnet die Bindungsstärke des Antikörpers an das entsprechende Epitop des Antigens. Ist die Bindungsstärke des Detektionsantikörpers höher als die der Serum-Antikörper, können diese aus der Bindung verdrängt werden.

Anstelle des kompetitiven ELISAs besteht die Möglichkeit einer sogenannten genetischen DIVA. In Regionen mit oraler Vakzination von Wildschweinen gegen das KSPV kommt sie seit kurzem zum Einsatz. Sie stellt eine Kombination von multiplex RT-PCR und partieller

Sequenzierung dar und ermöglicht die Unterscheidung von infizierten und C-Stammgeimpften Tieren (Blome et al., 2011). Allerdings muss der Nachweis im frühen Stadium der Infektion stattfinden, da nach Eliminierung des Virus ein Nachweis nicht mehr möglich ist.

#### 4.4 Vergleich der $\Delta$ Core-Vakzine mit anderen DIVA-Konzepten

Voraussetzungen, die von einer „idealen“ Markervakzine gegen die KSP erfüllt werden müssen, sind die Induktion einer schnellen Immunität, der vollständige Schutz vor Erkrankung und Infektion, sowie die Unterscheidbarkeit geimpfter und infizierter Tiere (DIVA) (Penrith et al., 2011). Im diagnostischen Test erfolgt diese Unterscheidung durch den Nachweis spezifischer Antikörper gegen Proteine, die in der Impfung nicht enthalten sind (van Oirschot, 1999b). Ein angepasster diagnostischer Test ist also nur als solcher geeignet, wenn seine Anwendung diese Unterscheidung ermöglicht. Die theoretische Unterscheidbarkeit ist bei allen erwähnten DIVA-Vakzinen gegeben.

Bei dem C-Stamm mit einer Mutation in der Domäne A des Glycoproteins E2 reicht eine Einzelimpfung zur Induktion einer protektiven Immunität zwar aus, ein kommerziell erhältlicher ELISA zum Nachweis von E2 (PrioCHECK CSFV Ab 2.0 E2 ELISA, Prionics, Lelystad, The Netherlands) ist als diagnostischer Test jedoch nicht geeignet. Er muss entweder modifiziert, bzw. neu validiert werden. Eine Alternative wäre die Entwicklung eines neuen geeigneten ELISAs (Kortekaas et al., 2010; Kortekaas et al., 2011). Auch Vektor-Vakzinen auf Basis von Vaccinia- oder porcinem Herpesvirus führen nach Einzelimpfung zur Ausbildung einer protektiven Immunität (Rümenapf et al., 1991; van Zijl et al., 1991; Beer et al., 2007). Detaillierte Untersuchungen zu Impf- und Feldstudien fehlen jedoch. Vektor-Vakzinen, die auf dem Virus der Aujeszky'schen Krankheit (AK) beruhen, können in AK-freien Regionen serologische Überwachungsprogramme behindern (Beer et al., 2007).

E2-Subunit-Vakzinen sind die einzigen kommerziell erhältlichen Markervakzinen mit passendem diagnostischem Test. Der Chekit-CSF-Marker® ELISA ist der Bayovac CSF E2® Vakzine zugehörig, während der Ceditest CSFV E<sup>ms</sup>® ELISA mit der Porcilis Pesti® Vakzine gekoppelt ist. E2-Subunit-Vakzinen erfordern Mehrfachapplikationen. Sie weisen eine wesentlich geringere Wirksamkeit auf als die attenuierte Lebendvakzine (van Oirschot, 2003b; Greiser-Wilke & Moennig, 2004) und gewährleisten keinen beständigen und vollständigen Schutz vor Erkrankung, horizontaler und vertikaler Übertragung (Ahrens et al.,

2000; Moormann et al., 2000; Depner et al., 2001; Dewulf et al., 2001; Uttenthal et al., 2001; van Oirschot, 2003a; Beer et al., 2007; Penrith et al., 2011). Untersuchungen sowohl des Chekit-CSF-Marker® ELISAs als auch des Ceditest CSFV E<sup>ms</sup>® ELISAs ergaben eine geringere Sensitivität im Vergleich zu konventionellen Antikörper-ELISAs (de Smit, 2000; Floegel-Niesmann, 2001; Greiser-Wilke & Moennig, 2004). Für den Einsatz als Notfallimpfung sind beide E2-Subunit-Vakzinen daher nicht geeignet. In gleicher Weise sind auch bei DNA-Vakzinen zusätzlich zu den benötigten hohen DNA-Mengen Mehrfachapplikationen erforderlich (Beer et al., 2007). Nicht autonom infektiöse KSPV-Mutanten (Replicons) induzieren nach intradermaler Anwendung eine protektive Immunität (Widjoatmodjo et al., 2000; Frey et al., 2006; Beer et al., 2007). Das an sich elegante Konzept wird dadurch eingeschränkt, dass die zur Vermehrung der Vakzine benötigten E<sup>ms</sup>-exprimierenden Zelllinien nicht stabil sind. Zudem tragen die zur Infektion verwendeten Viren E<sup>ms</sup> in der Virushülle, was die Bildung von Anti-E<sup>ms</sup>-Antikörpern nicht ausschließt. Dies kann im diagnostischen Test zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Zur Herstellung der  $\Delta$ Core-Vakzine sind hingegen keine komplementierenden Zelllinien notwendig. Auch deren Anwendung induziert eine protektive Immunantwort und schützt die Tiere vor Erkrankung. Eine Abhängigkeit von der applizierten Dosis ist jedoch erkennbar. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ELISA ist in der Lage, spezifische Anti-Core-Antikörper nachzuweisen. Wie bei dem Chekit-CSF-Marker® ELISA und dem Ceditest CSFV E<sup>ms</sup>® ELISAs werden die Anforderungen bezüglich der Sensitivität nicht erfüllt. Auch die modifizierte Lebendvakzine CP7\_E2alf, die zu den Pestivirus-Chimären gehört, führt nach kurzer Zeit zum Schutz der Tiere vor Erkrankung und Virämie; bei intramuskulärer Applikation nach einer Woche, bei oraler Immunisierung nach zwei Wochen (Leifer et al., 2009a). Es handelt sich um ein cytopathogenes BVDV, dessen E2 durch das E2 des KSPV ersetzt ist. Das KSPV-E2 erlaubt die effiziente Infektion von Schweinezellen, während das cytopathogene BVDV sich eher schlecht im Schwein vermehrt. Die Eigenschaft der Zytopathogenität verhindert die Ausbildung einer Persistenz und sorgt für die Produktion großer Antigenmengen. Durch Nachweis von KSPV-spezifischen E<sup>ms</sup>-Antikörpern ist im Gegensatz zu der erhältlichen attenuierten Lebend-Vakzine eine Unterscheidung zwischen infizierten und geimpften Tieren möglich (Reimann et al., 2004; Koenig et al., 2007). Damit könnte CP7\_E2alf die erste effiziente und sichere Markervakzine zur oralen Immunisierung von Haus- und Wildschweinen darstellen (Koenig et al., 2007; Tignon et al., 2010), und zur Kontrolle und Eradikation der KSP beitragen. Außerdem besteht hier die Perspektive einer genetischen DIVA mittels RT-PCR zur Unterscheidung zwischen geimpften und Feldvirus-

infizierten Tieren (Leifer et al., 2009b, Liu et al., 2009). Die Anforderungen an die „ideale“ Markervakzine wären damit erfüllt, allerdings befindet sich diese Vakzine noch in der Entwicklung. Auch Fragen der biologischen Sicherheit im Feld sind bisher ungeklärt.

Das  $\Delta$ Core-Konzept könnte dennoch einen vielversprechenden Impfkandidaten darstellen. Im Gegensatz zur attenuierten Lebendvakzine besteht aufgrund der Deletion keine Gefahr der Restvirulenz oder der Reversion zum pathogenen Wildtyp. Zur Herstellung sind außerdem keine komplementierenden Zelllinien notwendig. Die Induktion einer protektiven Immunität sowie der Schutz der Tiere vor Erkrankung sind nach Einzelimpfung gegeben. Die Voraussetzung für eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren, ist eine Steigerung der Sensitivität durch Weiterentwicklung des ELISAs.

## 5 Zusammenfassung

Markervakzinen in der Tiermedizin beruhen auf der Änderung oder Deletion antigenetisch dominanter Bereiche eines Virus, um zwischen der Antikörperbildung nach Impfung und Infektion unterscheiden zu können. Für die klassische Schweinepest (KSP) ist es gelungen, einen potentiellen Markerimpfstoff durch Deletion des Core-Gens zu entwickeln (Riedel et al., 2012). Das Core-Protein ist Teil des viralen Nukleokapsids, das die innere Struktur des behüllten Viruspartikels bildet. Die Charakterisierung von KSPV $\Delta$ Core ergab einen vollständigen Verlust der Virulenz mit der Induktion einer protektiven Immunreaktion. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Immunisierung mit KSPV $\Delta$ Core eine nachweisbare serologische Differenzierung von einer Infektion mit Wildtyp KSPV erlaubt. Auf der Grundlage von früheren Arbeiten war bekannt, dass nur geringe Titer anti-Core spezifischer Antikörper zu erwarten waren. Deshalb wurde als sensitives Nachweissystem ein kompetitiver ELISA entwickelt, der Aussagen über die grundsätzliche Eignung des Core-Proteins als Marker zulässt. Als Testantigen wurde bakteriell erzeugtes, hochgereinigtes Core-Protein zur Beschichtung der ELISA-Platte verwendet. In systematischen Untersuchungen wurde aus 8 monoklonalen anti-KSPV-Core-Antikörpern (Dissertation Gleyder Roman-Sosa) der Antikörper C2 als bestreagierender Detektionsantikörper ausgewählt. Als Positivkontrolle diente das Serum eines Schweines, das mit 50 $\mu$ g nicht adjuviertem Core-Protein immunisiert wurde. Als Negativkontrollen dienten Seren ungeimpfter, nicht infizierter Schweine. 5 KSPV C-Stamm-geimpfte und 8 KSPV $\Delta$ Core-geimpfte Tiere wurden untersucht. Bei Verwendung der jeweiligen Präimmunsereen war ein Anstieg der anti-Core Aktivität nach Immunisierung mit KSPV C-Stamm messbar. Diese nachweisbare, aber schwache spezifische Reaktion gegen das Core-Protein wurde durch die starke Hintergrundreaktivität fremder Negativseren überlagert. Eine Reihe methodischer Veränderungen führte zwar zu einer Steigerung der prozentualen Inhibition, erbrachte jedoch keine ausreichende Trennschärfe zwischen ungeimpften oder KSPV $\Delta$ Core-geimpften Tieren im Vergleich zu Schweinen, die mit KSPV C-Stamm immunisiert und/oder virulentem KSPV Koslov infiziert worden sind. Auch wenn diese Arbeit noch keinen brauchbaren diagnostischen ELISA als Ergebnis vorweisen kann, ist sie ein wichtiger Wegweiser für zukünftige Entwicklungen, die zum Ziel haben, die Hintergrundreaktivität der Negativseren zu reduzieren und die Sensitivität des ELISAs zu steigern.

## 6 Summary

Marker-vaccines are based on the change or deletion of domains of a virus, that are antigenetically dominant, with the intention to differentiate between the generation of antibodies after immunization and infection. A potential marker-vaccine for Classical Swine Fever (CSF) was proposed that is based on the deletion of the Core-gene (Riedel et al., 2012). The Core-protein is part of the viral nucleocapsid, which forms the inner structure of the enveloped virus particle. The characterization of the CSFV $\Delta$ Core showed a complete absence of virulence with the induction of a protective immunoreaction. Subject of this thesis is to analyze if the immunization of pigs with CSFV $\Delta$ Core enables a detectable serological differentiation to an infection with wildtype CSFV. Preliminary experiments had indicated that only low titres of specific anti-Core antibodies can be expected. Thus, a sensitive competitive ELISA was developed, that allows a statement about the general suitability of the Core-protein as a serological marker. A bacterial expressed, highly purified Core-Protein was used as an antigen to coat the ELISA-plate. Systematic analysis led to the choice of the antibody C2 as the best reacting antibody out of 8 monoclonal anti-CSFV-Core-antibodies (dissertation Gleyder Roman-Sosa). The serum of a swine that was immunized with 50 $\mu$ g not-adjuvanted Core-protein served as a positive control. As negative controls sera of unvaccinated and not infected swine were used. Sera of 5 CSFV C-strain-vaccinated and 8 CSFV $\Delta$ Core-vaccinated animals were analyzed. By the use of the respective preimmunsera an increase of the anti-Core activity after immunization with the CSFV C-strain was measurable. This detectable, but low reaction against the Core-protein was overruled by a strong background reactivity of the negative sera. Systematic variations of the method resulted in an increase of the percental inhibition but didn't provide a sufficient separation effect between unvaccinated or CSFV $\Delta$ Core-vaccinated animals compared to swine that were immunized with CSFV C-strain and/or infected with CSFV Koslov.

This thesis does not provide a suitable diagnostic ELISA for differentiation of Core containing and Core lacking CSF, it can act as an important guide for prospective developments which are primarily aimed at reducing the background reactivity of the negative sera and increasing the sensitivity of the ELISA.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahrens, U., Kaden, V., Drexler, C. & Visser, N. (2000) Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine Porcilis Pesti in pregnant sows. *Veterinary microbiology*, 77(1-2), pp.83-97.
- Anderson, J. (1984) Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *Journal of immunological methods*, 74(1), pp.139-149.
- Baker, J. C. (1987) Bovine viral diarrhea virus: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190(11), pp.1449-1458.
- Bautista, M. J., Ruiz-Villamor, E., Salguero, F. J., Sánchez-Cordón, P. J., Carrasco, L. & Gómez-Villamandos, J. C. (2002) Early platelet aggregation as a cause of thrombocytopenia in classical swine fever. *Veterinary pathology*, 39(1), pp.84-91.
- Bazan, J. F. & Fletterick, R. J. (1989) Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology*, 171(2), pp.637-639.
- Becher, P., Ramirez, R. A., Orlich, M., Rosales, S. C., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirmer, H. & Thiel, H. J. (2003) Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 311(1), pp.96-104.
- Beer, M., Reimann, I., Hoffmann, B. & Depner, K. (2007) Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine*, 25(30), pp.5665-5670.
- Blome, S. (2006) Zur Pathogenese der Klassischen Schweinepest: Analysen der Blutgerinnungsstörungen. *Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule, Hannover*.  
Erhältlich bei: [http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/blomes\\_ss06.html](http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/blomes_ss06.html)
- Blome, S., Meindl-Böhmer, A., Loeffen, W., Thuer, B. & Moennig, V. (2006) Assessment of classical swine fever diagnostics and vaccine performance. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 25(3), pp.1025-1038.
- Blome, S., Gabriel, C., Staubach, C., Leifer, I., Strebelow, G. & Beer, M. (2011) Genetic differentiation of infected from vaccinated animals after implementation of an emergency vaccination strategy against classical swine fever in wild boar. *Veterinary microbiology*, 153(3-4), pp. 373-376.
- Boulant, S., Vanbelle, C., Ebel, C., Penin, F. & Lavergne, J.-P. (2005) Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *Journal of virology*, 79(17), pp.11353-11365.
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F. & McLauchlan, J. (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The Journal of biological chemistry*, 281(31), pp.22236-22247.

- Braun, U., Thür, B., Weiss, M. & Giger, T. (1996) [Bovine virus diarrhea/mucosal disease in cattle--clinical findings in 103 calves and cattle]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 138(10), pp.465-475.
- Colijn, E. O., Bloemraad, M. & Wensvoort, G. (1997) An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus. *Veterinary microbiology*, 59(1), pp.15-25.
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. & Purchio, A. F. (1988a) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*, 165(1), pp.191-199.
- Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K. & Retzel, E. (1988b) Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology*, 165(1), pp.200-208.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. & Dubovi, E. J. (1988) Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections. *Journal of virology*, 62(8), pp.2823-2827.
- Dahle, J. & Liess, B. (1992) A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 15(3), pp.203-211.
- Depner, K., Bauer, T. & Liess, B. (1992) Thermal and pH stability of pestiviruses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 11(3), pp.885-893.
- Depner, K., Gruber, A. & Liess, B. (1994) Experimental infection of weaner pigs with a Field Isolate of Hog-Cholera Classical-Swine-Fever Virus derived from a recent Outbreak in lower Saxony. 1. Clinical, virological and serological Findings. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 81, pp.370-373.
- Depner, K., Paton D. J., Crucière, C., De Mia, G. M., Müller, A., Koenen, F., Stark, R. & Liess, B. (1995) Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening and detection of classical swine fever virus antigens in the blood of pigs. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 14(3), pp.677-689.
- Depner, K. R., Moennig, V. & Liess, B., (1996a) Epidemiologische Betrachtungen zur "typischen" und "atypischen" Schweinepest. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle IV/96*. pp.335-342.
- Depner, K. R., Rodriguez, A., Pohlenz, J. & Liess, B. (1996b) Persistent classical swine fever virus infection in pigs infected after weaning with a virus isolated during the 1995 epidemic in Germany: Clinical, virological, serological and pathological findings. *European Journal of Veterinary Pathology* 2, pp.61-66.
- Depner, K. R., Bouma, A., Koenen, F., Klinkenberg, D., Lange, E., de Smit, H. & Vanderhallen, H. (2001) Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows. *Veterinary microbiology*, 83(2), pp.107-120.

- de Smit, A. J., Bouma, A., Terpstra, C. & van Oirschot, J. T. (1999) Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. *Veterinary microbiology*, 67(4), pp.239-249.
- de Smit, A. J. (2000) Laboratory diagnosis, epizootiology, and efficacy of marker vaccines in classical swine fever: a review. *The Veterinary quarterly*, 22(4), pp.182-188.
- Dewulf, J., Laevens, H., Koenen, F., Mintiens, K & de Kruif, A. (2001) An E2 sub-unit marker vaccine does not prevent horizontal or vertical transmission of classical swine fever virus. *Vaccine*, 20(1-2), pp.86-91.
- Dunne, H. W., Hokanson, J. F. & Luedke, A. J. (1959) The Pathogenesis of Hog Cholera, 1. Route of Entrance of the Virus into the Animal Body. *American Journal of Veterinary Research*, 20, pp.615-618.
- Dunne, H. W. (1970) Hog Cholera. In *Dunne, H. W. (Hrsg.): Diseases of Swine, The Iowa State University Press, Ames, Iowa*, pp.177-239.
- Edwards, S., Moennig, V. & Wensvoort, G. (1991) The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Veterinary microbiology*, 29(2), pp.101-108.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rügenapf, T. & Thiel, H. J. (1996) Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *Journal of virology*, 70(6), pp.4131-4135.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), pp.871-874.
- Enzmann, P. J. & Weiland, F. (1978) Structural similarities of hog cholera virus with togaviruses. *Archives of virology*, 57(4), pp.339-348.
- Fan, Z., Yang, Q. R., Twu, J.-S. & Sherker, A. (1999) Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. *Journal of medical virology*, 59(2), pp.131-134.
- Fauquet, C.M., M.A. Mayo, j. Maniloff, U.D.a.L.A. Ball (2005) *Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Finlaison, D. S., Cook, R. W., Srivastava, M., Frost, M. J., King, K. R. & Kirkland, P. D. (2010) Experimental infections of the porcine foetus with Bungowannah virus, a novel pestivirus. *Veterinary microbiology*, 144(1-2), pp.32-40.
- Floegel, G., Wehrend, A., Depner, K. R., Fritzemeyer, J., Waberski, D. & Moennig, V. (2000) Detection of classical swine fever virus in semen of infected boars. *Veterinary microbiology*, 77(1-2), pp.109-116.
- Floegel-Niesmann, G. (2001) Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Veterinary microbiology*, 83(2), pp.121-136.

- Frey, H.-R., Liess, B., Richter-Reichhelm, H. B., von Benten, K. & Trautwein, G. (1980) Experimental Transplacental Transmission of Hog Cholera Virus in Pigs. I. Virological and serological studies. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 27(2), pp.154-164.
- Frey, C. F., Bauhofer, O., Ruggli, N., Summerfield, A., Hofmann, M. A. & Tratschin, J. D. (2006) Classical swine fever virus replicon particles lacking the Erns gene: a potential marker vaccine for intradermal application. *Veterinary research*, 37(5), pp.655-670.
- Fritzemeier, J., Teuffert, J., Greiser-Wilke, I., Schlüter, H. & Moennig, V. (2000) Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Veterinary microbiology*, 77(1-2), pp.29-41.
- Gómez-Sebastián, S., Pérez-Filgueira, D. M., Gómez-Casado, E., Nuñez, M. C., Sánchez-Ramos, I., Tabarés, E. & Escribano, J. M. (2008) DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. *Journal of virological methods*, 153(1), pp.29-35.
- Gómez-Villamandos, J. C., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., Sánchez-Cordón, P. J., Salguero, F. J. & Jover, A. (2001) Morphological and immunohistochemical changes in splenic macrophages of pigs infected with classical swine fever. *Journal of comparative pathology*, 125(2-3), pp.98-109.
- Gómez -Villamandos, J. C., Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Sánchez-Cordón, P. J., Bautista, M. J. & Sierra, M. A. (2003) Classical Swine Fever: pathology of bone marrow. *Veterinary pathology*, 40(2), pp.157-163.
- Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Koonin, E. V. & Blinov, V. M. (1989) N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic acids research*, 17(10), pp.3889-3897.
- Greiser-Wilke, I. & Moennig, V. (2004) Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies. *Animal health research reviews*, 5(2), pp.223-226.
- Greiser-Wilke, I., Blome, S. & Moennig, V. (2007) Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus--status quo and new developments. *Vaccine*, 25(30), pp.5524-5530.
- Hansen, J. C., Lu, X., Ross, E. D. & Woody, R. W. (2006) Intrinsic protein disorder, amino acid composition, and histone terminal domains. *The Journal of biological chemistry*, 281(4), pp.1853-1856.
- Harada, T., Tautz, N. & Thiel, H. J. (2000) E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *Journal of virology*, 74(20), pp.9498-9506.
- Heimann, M., Roman-Sosa, G., Martoglio, B., Thiel, H. J. & Rumenapf, T. (2006) Core protein of pestiviruses is processed at the C terminus by signal peptide peptidase. *Journal of virology*, 80(4), p.1915-1921.
- Horzinek, M., Reczko, E. & Petzoldt, K. (1967) On the morphology of hog cholera virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 21(3), pp.475-478.

- Horzinek, M., Maess, J. & Laufs, R. (1971) Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 33(3), pp.306-318.
- Horzinek, M. (1991) Pestiviruses--taxonomic perspectives. *Archives of virology. Supplementum*, 3, pp.1-5.
- Hulst, M. M., Himes, G., Newbiggin, E. & Moormann, R. J. (1994) Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, 200(2), pp.558-565.
- Ivanyi-Nagy, R., Lavergne, J.-P., Gabus, C., Ficheux, D., Darlix, J.-L. (2008) RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. *Nucleic acids research*, 36(3), pp.712-725.
- Jamin, A., Gorin, S., Cariolet, R., Le Potier, M. F. & Kuntz-Simon, G. (2008) Classical swine fever virus induces activation of plasmacytoid and conventional dendritic cells in tonsil, blood, and spleen of infected pigs. *Veterinary research*, 39(1), p.7.
- Jones, C. T., Ma, L., Burgner, J. W., Groesch, T. D., Post, C. B. & Kuhn, R. J. (2003) Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *Journal of virology*, 77(12), p.7143-7149.
- Kaden, V. (1998) [The situation of classical swine fever in wild boars in the European community and selected aspects of disease transmission]. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 111(6), pp.201-207.
- Kaden, V., Lange, E., Fischer, U. & Strebelow, G. (2000) Oral immunisation of wild boar against classical swine fever: evaluation of the first study in Germany. *Veterinary microbiology*, 73(2-3), pp.239-252.
- Kaden, V. & Lange, B. (2001) Oral immunisation against classical swine fever (CSF): onset and duration of immunity. *Veterinary microbiology*, 82(4), pp.301-310.
- Kern, B., Depner, K., Letz, W., Rott, M., Thalheim, S., Nitschke, B., Plagemann, R. & Liess, B. (1999) Incidence of classical swine fever (CSF) in wild boar in a densely populated area indicating CSF virus persistence as a mechanism for virus perpetuation. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B*, 46(1), pp.63-67.
- Kirkland, P. D., Frost, M. J., Finlaison, D. S., King, K. R., Ridpath, J. F. & Gu, X. (2007) Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus research*, 129(1), pp.26-34.
- Koenig, P., Lange, E., Reimann, I. & Beer, M. (2007) CP7\_E2alf: a safe and efficient marker vaccine strain for oral immunisation of wild boar against Classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine*, 25(17), pp.3391-3399.
- Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V. & Hellen, C. U. (2000) Ribosomal binding to the internal ribosomal entry site of classical swine fever virus. *RNA (New York, N.Y.)*, 6(12), pp.1791-1807.

- Komáromi, M. & Szabó, I. (2005) Eradication of Aujeszky's disease from a large-scale pig farm. *Acta veterinaria Hungarica*, 53(4), pp.515-524.
- Kortekaas, J., Vloet, R. P., Weerdmeester, K., Ketelaar, J., van Eijk, M. & Loeffen, W. L. (2010) Rational design of a classical swine fever C-strain vaccine virus that enables the differentiation between infected and vaccinated animals. *Journal of virological methods*, 163(2), pp.175-185.
- Kortekaas, J., Ketelaar, J., Vloet, R. P. & Loeffen, W. L. (2011) Protective efficacy of a Classical swine fever virus C-strain deletion mutant and ability to differentiate infected from vaccinated animals. *Veterinary microbiology*, 147(1-2), pp.11-18.
- Krey, T., Thiel, H. J. & Rümenapf, T. (2005) Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *Journal of virology*, 79(7), pp.4191-4200.
- Krey, T., Moussay, E., Thiel, H. J. & Rümenapf, T. (2006) Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of virology*, 80(21), pp.10862-10867.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S. & Strauss, J. H. (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), pp.717-725.
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H. J., Gorbalenya, A. E. & Tautz, N. (2004) Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *Journal of virology*, 78(19), pp.10765-10775.
- Lackner, T., Müller, A., König, M., Thiel, H. J. & Tautz, N. (2005) Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *Journal of virology*, 79(15), pp.9746-9755.
- Laddomada, A. (2000) Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Veterinary microbiology*, 73(2-3), pp.121-130.
- Laevens, H., Koenen, F., Deluyker, H., Berkvens, D. & de Kruif, A. (1998) An experimental infection with classical swine fever virus in weaner pigs. I. Transmission of the virus, course of the disease, and antibody response. *The Veterinary quarterly*, 20(2), pp.41-45.
- Laevens, H., Koenen, F., Deluyker, H. & de Kruif, A. (1999) Experimental infection of slaughter pigs with classical swine fever virus: transmission of the virus, course of the disease and antibody response. *The Veterinary record*, 145(9), pp.243-248.
- Langedijk, J. P. M., Middel, W. G. J., Meloen, R. H., Kramps, J. A. & de Smit, J. A. (2001) Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein E(rns) for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine. *Journal of clinical microbiology*, 39(3), pp.906-912.

- Lee, Y.-M., Tscherne, D. M., Yun, S.-I., Frolov, I. & Rice, C. M. (2005) Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. *Journal of virology*, 79(6), pp.3231-3242.
- Leforban, Y., Edwards, S., Ibata, G. & Vannier, P. (1990) A blocking ELISA to differentiate hog cholera virus antibodies in pig sera from those due to other pestiviruses. *Annales de recherches vétérinaires*. 21(2), pp.119-129.
- Leifer, I., Lange, E., Reimann, I., Blome, S., Juanola, S., Duran, J. P. & Beer, M. (2009a) Modified live marker vaccine candidate CP7\_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization. *Vaccine*, 27(47), pp.6522-6529.
- Leifer, I., Depner, K., Blome, S., Le Potier, M. F., Le Dimna, M., Beer, M. & Hoffmann, B. (2009b) Differentiation of C-strain "Riems" or CP7\_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*, 158(1-2), pp.114-122.
- Leunen, J. & Strobbe, R. (1977) Capacity of attenuated swine fever vaccines to prevent virus carriers in the vaccinated pigs, after contact with field virus. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin*, 31(4), pp.533-536.
- Liess, B., Frey, H. R., Kittsteiner, H., Baumann, F., Neumann, W. (1974) [Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a "slow virus infection"]. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 81(20), pp.481-487.
- Liess, B. (1987) Pathogenesis and epidemiology of Hog Cholera. *Annales de recherches vétérinaires*, 18(2), pp.139-145.
- Liess, B. & Moennig, V. (1990) Ruminant pestivirus infection in pigs. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9(1), pp.151-161.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Prágai, B. M., McCourt, D. W. & Rice, C. M. (1994) Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of virology*, 68(8), pp.5063-5073.
- Lin, M., Trottier, E. & Mallory, M. (2005) Enzyme-linked immunosorbent assay based on a chimeric antigen bearing antigenic regions of structural proteins Erns and E2 for serodiagnosis of classical swine fever virus infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 12(7), pp.877-881.
- Lindenbach, B. D., Thiel, H. J. & Rice, C. M. (2007) *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Liu, L., Hoffmann, B., Baule, C., Beer, M., Belák, S. & Widén, F. (2009) Two real-time RT-PCR assays of classical swine fever virus, developed for the genetic differentiation of naturally infected from vaccinated wild boars. *Journal of virological methods*, 159(1), pp.131-133.

- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H. J. & Rümenapf, T. (2004) CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *Journal of virology*, 78(4), pp.1792-1799.
- McClurkin, A. W., Bolin, S. R. & Coria, M. F. (1985) Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhoea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186(6), pp.568-569.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The EMBO journal*, 21(15), pp.3980-3988.
- Meeusen, E. N. T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.-P. & Jungersen, G. (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), pp.489-510.
- Mengeling, W. L. & Packer, R. A. (1969) Pathogenesis of chronic hog cholera: host response. *American journal of veterinary research*, 30(3), pp.409-417.
- Meyer, H., Liess, B., Frey, H.-R., Hermanns, W. & Trautwein, G. (1981) Experimental transplacental transmission of Hog Cholera Virus in Pigs. IV. Virological and serological studies in newborn piglets. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 28(8), pp.659-668.
- Meyers, G. & Thiel, H. J., 1996. *Advances in Virus Research, Band 47*, pp. 53-118.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. J. & Kümmerer, B. M. (1997) Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *Journal of virology*, 71(2), p.1735.
- Moennig, V. (1992) The hog cholera virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 15(3), pp.189-201.
- Moennig, V. & Plagemann, P. G. (1992) The pestiviruses. *Advances in virus research*, 41, pp.53-98.
- Moennig, V. (2000) Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Veterinary microbiology*, 73(2-3), pp.93-102.
- Moennig, V., Floegel-Niesmann, G. & Greiser-Wilke, I. (2003) Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: A review of new knowledge. *Veterinary journal*, 165(1), pp.11-20.
- Moennig, V. (2005) Eradication versus vaccination strategies to control infectious diseases--some lessons to be learned from terrestrial animals. *Developments in biologicals*, 121, pp.13-19.
- Moormann, R. J., Bouma, A., Kramps, J. A., Terpstra, C. & de Smit, H. J. (2000) Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test. *Veterinary microbiology*, 73(2-3), pp.209-219.

- Moser, C., Ruggli, N., Tratschin, J. D. & Hofmann, M. A. (1996) Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. *Veterinary microbiology*, 51(1-2), pp.41-53.
- Murray, C. L., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2008) Bovine viral diarrhea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *Journal of virology*, 82(3), pp.1294-1304.
- Nettleton, P. F. & Entrican, G. (1995) Ruminant pestiviruses. *The British veterinary journal*, 151(6), pp.615-642.
- Nettleton, P. F., Gilray, J. A., Russo, P. & Dlissi, E. (1998) Border disease of sheep and goats. *Veterinary research*, 29(3-4), pp.327-340.
- Núñez, A., Gómez-Villamandos, J. C., Sánchez-Cordón, P. J., Fernández de Marco, M., Pedrera, M., Salguero, F. J. & Carrasco, L. (2005) Expression of proinflammatory cytokines by hepatic macrophages in acute classical swine fever. *Journal of comparative pathology*, 133(1), pp.23-32.
- OIE (2008) Classical Swine Fever (Hog Cholera). *OIE Terrestrial Manual*, pp.1092-1106.
- OIE (2009) Biotechnology on the diagnosis of infectious diseases and vaccine development. *OIE Terrestrial Manual*, pp.1-25.
- Pastoret, P. P. (2005) The place of marker vaccines in control and eradication of animal diseases--aspects of comparative interest. *Developments in biologicals*, 121, pp.181-188.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J. & Tussen, P. (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203(2), pp.260-268.
- Penrith, M.-L., Vosloo, W. & Mather, C. (2011) Classical swine fever (hog cholera): review of aspects relevant to control. *Transboundary and emerging diseases*, 58(3), pp.187-196.
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A. & Collett, M. S. (1995) Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, 206(1), pp.750-754.
- Potgieter, L. N., McCracken, M. D., Hopkins, F. M. & Guy, J. S. (1985) Comparison of the pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhea virus. *American journal of veterinary research*, 46(1), pp.151-153.
- Reimann, I., Depner, K., Trapp, S. & Beer, M. (2004) An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, 322(1), pp.143-157.
- Reimann, I., Semmler, I. & Beer, M. (2007) Packaged replicons of bovine viral diarrhea virus are capable of inducing a protective immune response. *Virology*, 366(2), pp.377-386.

- Ressang, A. A. (1973a) Studies on the pathogenesis of hog cholera. I. Demonstration of hog cholera virus subsequent to oral exposure. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B*, 20(4), pp.256-271.
- Ressang, A. A. (1973b) Studies on the pathogenesis of hog cholera. II. Virus distribution in tissue and the morphology of the immune response. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B*, 20(4), pp.272-288.
- Ribbens, S., Dewulf, J., Koenen, F., Laevens, H. & de Kruif, A. (2004) Transmission of classical swine fever. A review. *The Veterinary quarterly*, 26(4), pp.146-155.
- Ridpath, J. F. & Bolin, S. R. (1995) The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology*, 212(1), pp.39-46.
- Riedel, C., Lamp, B., Heimann, M. & Rümenapf, T. (2010) Characterization of essential domains and plasticity of the classical swine fever virus core protein. *Journal of virology*, 84(21), pp.11523-11531.
- Riedel, C., Lamp, B., Heimann, M., König, M., Blome, S., Moennig, V., Schüttler, C., Thiel, H.-J. & Rümenapf, T. (2012) The Core protein of Classical Swine Fever virus is dispensable for virus propagation in vitro. *PLoS Pathogens*, 8(3).
- Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J. & Bredenbeek, P. J. (1997) Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *Journal of virology*, 71(1), pp.451-457.
- Roman-Sosa, G. (2007) Charakterisierung des Core-Proteins von Pestiviren. *Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen*. Erhältlich bei: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4629/>.
- Ronecker, S., Zimmer, G., Herrier, G., Greiser-Wilke, I. & Grummer, B. (2008) Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *The Journal of general virology*, 89, pp.2114-2121.
- Rümenapf, T., Meyers, G., Stark, R. & Thiel H. J. (1991a) Molecular characterization of hog cholera virus. *Archives of virology. Supplementum*, 3, pp.7-18.
- Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G. & Thiel, H. J. (1991b) Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *Journal of virology*, 65(2), pp.589-597.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H. & Thiel, H. J. (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *Journal of virology*, 67(6), pp.3288-3294.
- Rümenapf, T. & Thiel, H. J. (2008) *Molecular Biology of Pestiviruses*, Caister Academic Press.

- Sánchez-Cordón, P. J., Romanini, S., Salguero, F. J., Núñez, A., Bautista, M. J., Jover, A. & Gómez-Villamandos, J. C. (2002) Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever. *Journal of comparative pathology*, 127(4), pp.239-248.
- Sánchez-Cordón, P. J., Romanini, S., Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Carrasco, L. & Gómez-Villamandos, J. C. (2003) A histopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of the intestine in pigs inoculated with classical swine fever virus. *Veterinary pathology*, 40(3), pp.254-262.
- Sánchez-Cordón, P. J., Núñez, A., Salguero, F. J., Carrasco, L. & Gómez-Villamandos, J. C. (2005a) Evolution of T lymphocytes and cytokine expression in classical swine fever (CSF) virus infection. *Journal of comparative pathology*, 132(4), pp.249-260.
- Sánchez-Cordón, P. J., Núñez, A., Salguero, F. J., Pedrera, M., Fernández de Marco, M. & Gómez-Villamandos, J. C. (2005b) Lymphocyte apoptosis and thrombocytopenia in spleen during classical swine fever: role of macrophages and cytokines. *Veterinary pathology*, 42(4), pp.477-488.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. & Thiel, H. J. (1993) Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5125), pp.1169-1171.
- Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, T. & Thiel, H. J. (1993) Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *Journal of virology*, 67(12), pp.7088-7095.
- Stegeman, J. A., Tielen, M. J., Kimman, T. G., van Oirschot, J. T., Hunneman, W. A. & Berndsen, F. W. (1994) Intensive regional vaccination with a gI-deleted vaccine markedly reduces pseudorabies virus infections. *Vaccine*, 12(6), pp.527-531.
- Stegeman, J. A., Elbers, A. R. W., Bouma, A. & de Jong, M. C. M. (2002) Rate of inter-herd transmission of classical swine fever virus by different types of contact during the 1997-8 epidemic in The Netherlands. *Epidemiology and infection*, 128(2), pp.285-291.
- Summerfield, A., Knoetig, S. M., Tschudin, R. & McCullough, K. C. (2000) Pathogenesis of granulocytopenia and bone marrow atrophy during classical swine fever involves apoptosis and necrosis of uninfected cells. *Virology*, 272(1), pp.50-60.
- Summerfield, A., Alves, M., Ruggli, N., de Bruin, M. G. & McCullough, K. C. (2006) High IFN-alpha responses associated with depletion of lymphocytes and natural IFN-producing cells during classical swine fever. *Journal of interferon & cytokine research*, 26(4), pp.248-255.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. & Thiel, H. J. (1997) Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *Journal of virology*, 71(7), pp.5415-5422.
- Temin, H. M. (1990) Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *Journal of medical virology*, 31(1), pp.13-17.

- Terpstra, C. (1978) [Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever (author's transl)]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 103(13), pp.678-684.
- Terpstra, C. (1987) Epizootiology of swine fever. *The Veterinary quarterly*, 9 Suppl 1, pp.50S-60S.
- Terpstra, C. & Wensvoort, G. (1988) Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Research in veterinary science*, 45(2), pp.137-42.
- Terpstra, C. & de Smit, A. J. (2000) The 1997/1998 epizootic of swine fever in the Netherlands: control strategies under a non-vaccination regimen. *Veterinary microbiology*, 77 (1-2), pp.3-15.
- Thiel, H. J., Plagemann, P. G. & Moennig, V. (1996) Pestiviruses. *Fields Virology*, pp.1059-1069.
- Tignon, M., Kulcsár, G., Haegeman, A., Barna, T., Fábíán, K., Lévai, R., Van der Stede, Y., Farsang, A., Vrancken, R., Belák, K. & Koenen, F. (2010) Classical swine fever: comparison of oronasal immunisation with CP7E2alf marker and C-strain vaccines in domestic pigs. *Veterinary microbiology*, 142(1-2), pp.59-68.
- Tscherne, D. M., Evans, M. J., MacDonald, M. R. & Rice, C. M. (2008) Transdominant inhibition of bovine viral diarrhoea virus entry. *Journal of virology*, 82(5), pp.2427-2436.
- Utenthal, A., Le Potier, M. F., Romero, L., De Mia, G. M. & Floegel-Niesmann, G. (2001) Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Veterinary microbiology*, 83(2), pp.85-106.
- Vandeputte, J. & Chappuis, G. (1999) Classical swine fever: the European experience and a guide for infected areas. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 18(3), pp.638-647.
- van Oirschot, J. T. & Terpstra, C. (1977) A congenital persistent swine fever infection. I. Clinical and virological observations. *Veterinary Microbiology*, 2(2), pp.121-132.
- van Oirschot, J. T., Rziha, H. J., Moonen, P. J., Pol, J. M. & van Zaane, D. (1986) Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. *The Journal of general virology*, 67 ( Pt 6), pp.1179-1182.
- van Oirschot, J. T. & Terpstra, C. (1989) Hog Cholera Virus, Elsevier, Amsterdam
- van Oirschot, J. T., Gielkens, A. L., Moormann, R. J., Berns, A. J. (1990) Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Veterinary microbiology*, 23(1-4), pp.85-101.
- van Oirschot, J. T., Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A. & Stegeman, J. A. (1996) The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *Journal of biotechnology*, 44(1-3), pp.75-81.

- van Oirschot, J. T. (1999a) Hog cholera. In *Straw, B. E., S. D'allaire, W. L. Mengeling, U. D. J. Taylor (Hrsg.): Diseases of swine, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA*, pp.159-172.
- van Oirschot, J. T. (1999b) Diva vaccines that reduce virus transmission. *Journal of biotechnology*, 73(2-3), pp.195-205.
- van Oirschot, J. T. (2003a) Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Veterinary microbiology*, 96(4), pp.367-384.
- van Oirschot, J. T. (2003b) Emergency vaccination against classical swine fever. *Developments in biologicals*, 114, pp.259-267.
- Vantsis, J. T., Linklater, K. A., Renni, J. C. & Barlow, R. M. (1979) Experimental challenge infection of ewes following a field outbreak of Border disease. *Journal of comparative pathology*, 89(3), pp.331-339.
- van Zijl, M., Wensvoort, G., de Kluyver, E., Hulst, M., van der Gulden, H., Gielkens, A., Berns, A. & Moormann, R. (1991) Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *Journal of virology*, 65(5), pp.2761-2765.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. & Van Zaane, D. (1986) Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Veterinary microbiology*, 12(2), pp.101-108.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., de Kluijver, E. P., Kragten, C. & Warnaar, J. C. (1989) Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Veterinary microbiology*, 21(1), pp.9-20.
- Widjojoatmodjo, M. N., van Gennip, H. G. P., Bouma, A., van Rijn, P. A., Moormann, R. J. M. (2000) Classical swine fever virus E(rns) deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. *Journal of virology*, 74(7), pp.2973-2980.
- Wiskerchen, M. & Collett, M. S. (1991) Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*, 184(1), pp.341-350.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S. & Rice, C. M. (1997) Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *Journal of virology*, 71(7), pp.5312-5322.
- Yu, X., Qiao, M., Atanasov, I., Hu, Z., Kato, T., Liang, T. J. & Zhou, Z. H. (2007) Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology*, 367(1), pp.126-134.

Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G. & Kuhn, R. J. (2003) Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature structural biology*, 10(11), pp.907-912.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5928-6



9 783835 959286

Cover photo: © zolastro - Fotolia.com