

## E. Zusammenfassung

Morbillivirusisolate phociner Herkunft, vorläufig als "phocine distemper virus" (PDV) benannt (COSBY et al. 1988), wurden hinsichtlich einiger biologischer und biochemischer Parameter untersucht und mit anderen Morbillivirusarten verglichen.

Sechzehn ausgewählte Isolate, die 1988 aus verschiedenen Materialien von Seehunden (*Phoca vitulina*) gewonnen wurden (LIESS et al. 1989a), vermehrten sich unter Ausbildung eines synzytialen zytopathogenen Effektes in primären Seehundnierenzellen sowie in Vero- und MDCK-Zellen, in denen neben synzytialen Veränderungen auch Rund- und Spindelzellbildung induziert wurden. Die *in vitro*-Vermehrungseigenschaften waren qualitativ nicht von denen anderer Morbilliviren wie Hundestaupe- ("canine distemper virus", CDV) und Masernvirus (MV) zu unterscheiden. Dagegen konnten ein PDV- und ein CDV-Isolat eindeutig anhand der Wanderungsgeschwindigkeit ihres NP-Proteins in der SDS-PAGE differenziert werden.

Die antigenetischen Beziehungen zwischen PDV-Isolaten und anderen Morbilliviren wurden mittels polyklonaler Seren und monoklonaler Antikörper untersucht. Eine reziproke Kreuzreaktivität bestand zwischen allen PDV-Isolaten, CDV und MV. Durch das relativ einfache serologische Verfahren der differentiellen Neutralisation waren PDV-Isolate jedoch eindeutig von CDV und auch MV abgrenzbar. Bei Verwendung einer Technik, die nicht auf Neutralisation abzielte (Antikörperbindungstest, PLA), ergab sich ein höherer Grad der Kreuzreaktivität zwischen PDV und CDV.

Gegen das PDV-Isolat 2558/Han 88 wurden auch monoklonale Antikörper induziert. Etwa 50% der getesteten spezifisch positiven Klone reagierte ausschließlich mit dem homotypischen Virus (PDV), während die andere Hälfte Kreuzreaktivität gegenüber CDV aufwies. Letztendlich konnten neun stabile Klone, die mAk gegen insgesamt vier Virusproteine bildeten, etabliert werden: darunter reagierten im Bindungstest vier genusspezifisch mit PDV, CDV, MV, RPV und PPRV; vier besaßen typenkreuzreagierende Eigenschaften und erkannten gemeinsame Epitope auf PDV und CDV. Ein Antikörper reagierte PDV-typspezifisch; dieser vermutlich gegen das H-Protein gerichtete Antikörper reagierte ausschließlich mit allen sechzehn PDV-Isolaten.

Ergänzend wurden in der vorliegenden Arbeit die *in vivo*-Eigenschaften eines PDV-Isolates in natürlichen Wirten (Pinnipeda) untersucht: Dazu wurden geringe Dosen ( $10^{3,3}$  KID<sub>50</sub>/Tier) des in Seehundnierenzellen passagierten PDV-Isolates 2558/Han 88 zwei PDV-seronegativen und sechs PDV-seropositiven Seehunden sowie einer PDV-seronegativen Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) intranasal appliziert. Die bei Inokulation seronegativen Seehunde, entwickelten Krankheitssymptome, die denen während des "Seehundsterbens" 1988 beobachteten glichen (WILLHAUS 1989, pers. Mitteilung). Weiterhin konnte bei diesen Tieren Virämie, die z.T. mehrere Tage andauerte, sowie Serokonversion nachgewiesen werden. Einer dieser Seehunde erlag der Infektion. Von sechs inokulierten PDV-seropositiven Seehunden zeigte lediglich ein Tier milde, transiente klinische Erscheinungen und Virämie. Die seronegative Kegelrobbe serokonvertierte ohne Krankheitssymptome zu zeigen.

In den vorgelegten Untersuchungen zur antigenetischen Verwandtschaft reagierten PDV-Isolate von sechzehn Seehunden sowohl auf polyklonaler wie auf monoklonaler Ebene homogen und waren eindeutig von anderen Morbillivirusarten (CDV, MV) zu differenzieren. Erhebliche antigene

Unterschiede zwischen PDV und CDV müssen daher vorliegen. Diese Daten unterstützen Ergebnisse auf molekularer Basis (MAHY et al. 1988), die nahelegen, PDV als mögliche weitere Art getrennt von CDV ins Genus Morbillivirus einzugliedern.

Die Inokulation eines in Zellkulturen passagierten PDV-Isolates provozierte in empfänglichen, natürlichen Wirten klinische Erscheinungen verschiedenen Grades, Virämie und Serokonversion. Die Bedeutung von PDV im Rahmen des "Seehundsterbens" 1988 wird diskutiert.

Timm C. Harder

## Characterization of Morbillivirus Isolates of Phocine Origin

### Summary

Some biological and biochemical properties of morbillivirus isolates of phocine origin, tentatively named "phocine distemper virus" (PDV) (COSBY et al. 1988), were examined and compared to other morbilliviruses such as canine distemper virus (CDV) and measles virus (MV).

Sixteen selected isolates, derived from different harbour seals (*Phoca vitulina*) (LIESS et al. 1989a, 1989b), replicated in seal kidney cells, inducing a syncytial cytopathogenic effect. In Vero- and MDCK-cells the majority of these isolates was capable to induce also round and stellate cells. *In vitro*-growth characteristics in Vero cells were qualitatively indistinguishable from those of CDV and MV. In comparison a PDV- and a CDV-isolate could be clearly separated by the migration pattern of their NP-proteins.

The antigenic relationships of PDV to CDV and MV were evaluated using polyclonal sera as well as monoclonal antibodies (mAbs). A reciprocal relationship was evident. However, PDV could be easily discriminated from CDV and MV by differential neutralization. Serological techniques not depending on neutralization, e.g. indirect peroxidase-linked antibody binding assay (PLA), revealed a higher degree of cross reactivity.

Monoclonal antibodies (mAbs) were induced in Robertsonian mice against PDV 2558/Han 88. Approximately 50% of the specifically positive clones tested, reacted exclusively with the homotypic virus whereas the other half showed cross reaction with CDV. Nine clones secreting

antibodies directed against altogether four structural virus proteins could be stabilized: Four of them were found to react genus-specifically with PDV, CDV, MV, RPV and PPRV. Four mAbs possessed type-crossreacting properties recognizing epitopes shared between PDV and CDV. One antibody, presumably directed against the H-protein, was PDV-typespecific and reacted exclusively with the PDV-isolates tested.

Furthermore some *in vivo*-properties of one isolate in natural hosts (pinnipeds) were taken under study. Eight harbour seals (*Phoca vitulina*), two of them seronegative against PDV, and one PDV-seronegative grey seal (*Halichoerus grypus*) were exposed to a low dose ( $10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub> per animal) of the PDV-isolate 2558/Han 88 (sixth passage in seal kidney cells) selecting an intranasal route of application. Seronegative harbour seals developed clinical signs resembling those of 1988's seal disease (WILLHAUS 1989, pers. comm.). One of these seals succumbed to the infection. Also viremia, lasting a few days in one animal, and seroconversion was detectable. Of six seropositive harbour seals only one showed mild, transient signs of disease and viremia. The susceptible PDV-seronegative grey seal seroconverted without exhibiting any signs of clinical affection.

PDV-isolates obtained from sixteen harbour seals were shown to react antigenically homogeneous when examined with polyclonal sera as well as with mAbs. By their antigenic configuration these isolates were plainly distinguishable from other morbillivirus types such as CDV and MV. The data presented here support and extend results of previous studies on molecular (Mahy et al. 1988) and antigenic properties (Cosby et al. 1988; Rima et al. 1990) of phocine morbilliviruses, regarding PDV as a new morbillivirus type rather than a strain of CDV.

Inoculation of a cell culture-propagated PDV-isolate into susceptible natural hosts (pinnipeds) provoked clinical signs of variable severeness, viremia and seroconversion. The significance of PDV concerning the mass mortality among seals in northern European waters in 1988 is discussed.