

E. Zusammenfassung

Zum Nachweis einer Interferenz zwischen nichtzytopathogenem (nzp) und zytopathogenem (zp)-Biotyp des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) wurden die nzp- und zp-Klone dreier BVDV-Mischisolate verwendet. So konnten Versuche zur Interferenz zwischen nzp- und zp-Biotypen mit Paaren von Klonen sowohl homologen als auch heterologen Epitopmusters durchgeführt werden.

Die Interferenzversuche wurden mit dem Immunoplaquetest durchgeführt, wobei Interferenz als Beeinflussung der Immunoplaques in ihrer Anzahl oder ihrer Morphologie dargestellt werden sollte.

Nach Infektion von fötalen Kälbernieren (FKN)-Zellkulturen mit einem Gemisch aus zp- und nzp-BVDV in einer Dosis, welche die Plaquezählung erlaubte, konnte keine Interferenz dargestellt werden.

In einem zweiten Versuch wurden Zellkulturen mit nzp-BVDV in abnehmender Einsaatmultiplizität von MOI 1 bis MOI 0 infiziert. Die Zellkulturen wurden sukzessiv in Zeitintervallen von 0h, 12h, 24h und 36h mit zp-BVDV in konstanter, zählbarer Menge plaquebildender Einheiten überinfiziert. Mit dieser Versuchsanordnung konnte Interferenz, meßbar als Reduktion der Zahl zytopathogener Plaques, dargestellt werden. Es bestand ein enger Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Interferenz und dem Anteil mit nzp-BVDV infizierter Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe von zp-BVDV. Waren mindestens 1-10% des Zellrasens mit nzp-BVDV infiziert, kam es nach Superinfektion mit zp-BVDV nicht zur Ausprägung zytopathischer Veränderungen. Betrug das Mengenverhältnis von nzp- zu zp-BVDV über $10^4:1$, so konnte auch bei simultaner Inokulation beider Biotypen keine Ausprägung von Plaques des zytopathogenen Biotyps festgestellt werden. Eine

Abhängigkeit der Interferenz von der Homologie des Epitopmusters der nzp- und zp-Klone bestand nicht.

Die Versuche zur Darstellung von heterotypischer Interferenz zwischen Pestiviren bovinen (BVDV) bzw. porcinen (Virus der europäischen Schweinepest, ESPV) Ursprungs wurden in PK(15)-Zellkulturen durchgeführt. Hierfür wurde das BVDV-Isolat 'R56/74' ausgewählt, sowie als ESPV die Stämme 'Alfort/187', '331' und 'CAP'. Eine differenzierende Färbung beider Pestiviren im Immunoplaquetest wurde durch die Verwendung ESPV-spezifischer mAk erzielt.

PK(15)-Zellen wurden in abnehmender Einsaatmultiplizität von MOI 1 bis MOI 0 mit BVDV-R56/74 infiziert und in Zeitintervallen von 0h bis 36h mit ESPV überinfiziert. Betrug der Anteil mit BVDV infizierter Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe von ESPV über 90%, so ließen sich bei Färbung des Immunoplaquetests keine Zellen mit ESPV-spezifischen mAk anfärben.

Eine vergleichenden Titration mehrerer Stämme des ESPV zum einen auf BVDV-freien PK(15)-Zellen und zum anderen auf Zellen, welche persistent mit BVDV infiziert waren, hatte auf persistent mit BVDV-infizierten Zellen eine Reduktion der ESPV-Titer auf 0 zur Folge.

Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von Interferenz und dem Anteil vorinfizierter Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe des superinfizierenden Virus wird vermutet, daß die beobachteten Interferenzerscheinungen auf eine Konkurrenzsituation an der einzelnen Zelle zurückzuführen sind.

Aus den Versuchsergebnissen wird gefolgert, daß homologe Interferenz zwischen nzp- und zp-Biotyp des BVDV keine wesentliche Einschränkung für die Verwendbarkeit des Immunoplaquetests zur Differenzierung beider Biotypen darstellt, da es bei simultaner Inokulation erst bei Mengenverhältnissen des nzp- zum zp-Biotyp von über 10^4 zu 1 zu

einer vollständigen Unterdrückung zytopathischer Veränderungen kommt. Bei der Arbeit mit ESPV hingegen kann die Kontamination von Zellkulturen mit BVDV erhebliche Veränderungen von Untersuchungsergebnissen zur Folge haben.

F. Summary

Hansjörg Lehn

Investigations on interference in cell culture between pestiviruses of bovine and porcine origin.

For the investigation on interference between the cytopathic (cp)- and the noncytopathic (ncp)-biotype of the BVDV cp and ncp clones derived from three bovine virus diarrhoea virus(BVDV)-isolates were used. Interference was analysed between cp- and ncp-biotype with pairs of clones that show identical epitopic reaction patterns and with pairs of clones that are different.

The investigations were performed using an immunoplaque assay. Interference was monitored as a reduction of the number of immunoplaques or as changes in their morphology.

No interference could be demonstrated when a mixture of cp- and ncp-BVDV was inoculated in a dosage that allowed plaque-counting of both biotypes.

Ncp-BVDV was serially 10-fold diluted and inoculated in cell cultures in multiplicity of infection (MOI), ranging from MOI 1 to MOI 0. The cell cultures were successively superinfected in intervals of 0h, 12h, 24h and 36h with a constant dosage of cp-BVDV

producing a fixed number of plaques. With this test interference could be demonstrated as a reduction of the number of plaques of the cp-biotype. There was a close relation between the occurrence of interference and the fraction of ncp-BVDV-infected cells in the cell culture at the moment of superinfection. If at this time there were more than 1-10% ncp-BVDV-infected cells, no cytopathic changes due to the action of cp-BVDV could be detected. If the proportion of ncp- to cp-BVDV was about 10^4 :1 there were no cytopathic changes after simultaneous inoculation of both biotypes. There was no visible correlation of interference to the epitopic reaction patterns of cp- and ncp-BVDV-clones.

Analysis of heterotypic interference between pestiviruses of bovine (BVDV) and porcine (hog cholera virus, HCV) origin were performed in PK(15) cell cultures. The viruses chosen for these tests were BVDV-R56/74 and the HCV-strains CAP, 331 and Alfort /187. BVDV and HCV were discriminated by staining with monoclonal antibody (mAb) HC34, which is specific for HCV.

PK(15) cell cultures were infected with BVDV-R56/74 in minute moi ranging from moi 1 to moi 0. The cell cultures were superinfected with HCV in intervals between 0h and 36h. With more than 90% of cells infected with BVDV at the time of superinfection, no HCV antigen was detectable in the immunoplaque assay after staining with mAb HC34.

The last test consisted in a comparative titration of various HCV-strains on cell cultures that were free of BVDV and on cell cultures that were persistently infected with BVDV. Growth of all investigated HCV-strains was completely suppressed on BVDV-infected cell cultures.

Due to the close relation between interference and the degree of infection of cells at the time of superinfection it seems that interference is not caused by a soluble factor produced by infected cells.

Interference between ncp- and cp-BVDV does not seem to influence discrimination of both biotypes in the immunoplaque assay, as growth of cp-BVDV is only suppressed if the ncp-BVDV is present in great excess over the cp-biotype.

Furtheron possible consequences of contamination of cell cultures with BVDV on investigations concerning HCV are discussed.