

**Aus dem Institut für Virologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover**

**Replikation des Virus der Klassischen Schweinepest
in verschiedenen permanenten porzinen Zelllinien**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Vorgelegt von
Sebastian Fischer
aus Berlin**

Hannover 2001

Wissenschaftliche Betreuung: Priv.-Doz. Dr. Irene Greiser-Wilke

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Irene Greiser-Wilke
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juni 2001

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG **13**

2. LITERATURÜBERSICHT **15**

2.1 VIRUS DER KLASSISCHEN SCHWEINEPEST **15**

2.1.1 TAXONOMIE 15

2.1.2 CHARAKTERISIERUNG DES VIRUS 16

2.1.2.1 Morphologie 16

2.1.2.2 Genom 16

2.1.2.3 Proteine 17

2.1.2.4 Antigenität 17

2.1.2.5 Physikalische und chemische Eigenschaften 18

2.2 KSPV-INFEKTION BEIM SCHWEIN **20**

2.2.1 EINFLUSS DES VIRUS 20

2.2.2 EINFLUSS DES WIRTES 22

2.2.3 VERLAUFSFORMEN DER KLASSISCHEN SCHWEINEPEST 22

2.2.3.1 Akute Verlaufsformen 23

2.2.3.2 Chronische Verlaufsform 24

2.2.3.3 Persistierende Infektionen 25

2.3 KSPV-VERMEHRUNG UND NACHWEIS IN VITRO **27**

2.3.1 REPLIKATIONS-EIGENSCHAFTEN DES KSPV IN ZELLKULTUREN 27

2.3.1.1 KSPV-Vermehrung in Kulturen verschiedenen Ursprunges 28

2.3.1.2 Einfluß der Virulenz des KSPV auf die Vermehrung in der Zellkultur 29

2.3.1.3 KSPV-Replikation mit zytopathischem Effekt 31

2.3.1.4 Bedeutung der Zellkulturen für den direkten Infektionsnachweis
in der KSPV-Diagnostik 32

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN **34**

3.1 MATERIAL **34**

3.1.1 ZELLINIEN 34

3.1.1.1	Referenzzelllinie PORCINE KIDNEY (15) AMSTERDAM (PK(15)A)	34
3.1.1.2	Referenzzelllinie SWINE TESTIS EPITHELOID (STE)	35
3.1.1.3	Referenzzelllinie PK(15) (Katalognummer RIE 5-1)	35
3.1.1.4	Zelllinien vom Haus- und Wildschwein	36
3.1.2	KSP-VIREN	38
3.1.2.1	KSP-Virusstämme	38
3.1.2.2	KSP-Feldisolate	38
3.1.3	ANTIKÖRPER UND KONJUGATE	41
3.1.3.1	KSPV-Nachweis mit dem BVD/C16	41
3.1.3.2	Zytokeratinnachweis	41
3.1.4	SONSTIGE MATERIALIEN	42
3.2	METHODEN	43
3.2.1	ZELLKULTURTECHNIK	43
3.2.1.1	Zellkultivierung und Subkultivierung	43
3.2.1.2	Zellkonservierung und spätere Anzucht	44
3.2.1.3	Charakterisierung der Zellkulturen mittels Zytokeratinfärbung	44
3.2.2	VIRUSISOLIERUNG, VIRUSVERMEHRUNG UND VIRUSNACHWEIS	45
3.2.2.1	Virusvermehrung und -ernte	45
3.2.2.2	Viruspassage	47
3.2.2.3	Virusisolierung aus Organmaterial	47
3.2.2.4	Weiterführende Untersuchungen	48
3.2.2.5	Virustitration	50
3.2.2.6	Direkte Immunfärbung	50
3.2.3	DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	52
3.2.3.1	Korrektur der titrierten Werte	52
3.2.3.2	Berechnung des Virusgehaltes der Gesamtkultur	52
3.2.3.3	Ermittlung der Verteilungsverhältnisse von ZF und ZG in der Zellkultur	53
3.2.3.4	Berechnung der mittleren Standardabweichung	53
4.	ERGEBNISSE	54
4.1	CHARAKTERISIERUNG DES ZELLTYPUS DER VERWENDETEN ZELLINIEN	54
4.2	WACHSTUMSCHARAKTERISTIKA DER ZELLINIEN	56
4.2.1	WACHSTUMSKURVEN DER UNINFIZIERTEN REFERENZZELLINIEN	56

4.3	UNTERSUCHUNG DER VIRUSREPLIKATION	57
4.3.1	VIRUSVERMEHRUNGSKURVEN IN DEN REFERENZZELLINIEN	57
4.3.2	UNTERSUCHUNG DER VIRUSREPLIKATION IN ANDEREN ZELLINIEN	59
4.4	EIGENSCHAFTEN DER ZELLINIEN IN VERSCHIEDENEN ZELLKULTURSYSTEMEN	67
4.5	EINFLUSS DER VIRUSINFEKTION AUF DIE ZELLPROLIFERATION	68
4.6	UMSTELLUNG DES ZELLKULTURSYSTEMS UND DER INOKULATIONSMETHODE	69
4.6.1	EINFLUSS DER SIMULTANEN UND SUKZESSIVEN INFEKTION AUF DIE VIRUSREPLIKATION	69
4.7	WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN	73
4.7.1	UNTERSUCHUNGEN MIT AUSGEWÄHLTEN ISOLATEN	73
4.7.2	UNTERSUCHUNGEN MIT ORGANHOMOGENATEN	75
4.8	ANTEIL VON ZELLGEBUNDENEM UND FREIEM VIRUS IN VERSCHIEDENEN ZELLKULTUREN	76
<hr/>		
5.	DISKUSSION	79
<hr/>		
6.	ZUSAMMENFASSUNG	87
<hr/>		
7.	LITERATURVERZEICHNIS	91
<hr/>		
8.	ANHANG	114
<hr/>		
8.1	LINIENPÄSSE DER ZELLINIEN DER BFAV-INSEL RIEMS	114
8.2	ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN MEDIEN UND REAGENZIEN	128
8.2.1	ZELLKULTURMEDIEN	128
8.2.2	REAGENZIEN	131
8.2.2.1	Puffer	131
8.2.2.2	Lösungen	133
8.3	SONSTIGE CHEMIKALIEN	134
8.4	GERÄTE UND GEBRAUCHSGEGENSTÄNDE	135
8.5	VERBRAUCHSMITTEL	136
8.6	TABELLENVERZEICHNIS	138
8.7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	140

Verzeichnis der Abkürzungen

al.	<i>alii</i> , andere
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ak	Antikörper
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATV	<i>adjusted trypsin-versen</i>
BDV	Border Disease Virus
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BHV	Bovines Herpesvirus
BLV	Bovines Leukosevirus
BPIV-3	Bovines Parainfluenzavirus-3
BRSV	Bovines Respiratorisches Syncytialvirus
BSV	Bovines Syncytialvirus
BVD	Bovine Virusdiarrhoe
C-STAMM	engl. <i>chinese strain</i>
d	Tag
DIs	<i>defective interfering particles</i>
DIF	direkte Immunfärbung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDulb	EMEM modifiziert nach Dulbecco und Freeman
EDTA	Ethylendiamintetrazetat-Dinatriumsalz
ELA	Earle's Salzlösung mit Lactalbuminhydrolysat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELMI	Elektronenmikroskop
EM	Erhaltungsmedium
EMEM	<i>Eagle's minimum essential medium</i>
END	<i>exaltation of newcastle disease</i>
Fa.	Firma

FAT	<i>fluorescent antibody test</i>
FKN	fetale Kälbernieren
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdanziehungs-Konstante
GAM	<i>goat-anti-mouse</i> , Ziege-anti-Maus
HEV	Hämagglutinierendes Encephalomyelitisvirus
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
KID ₅₀	kulturinfektiöse Dosis 50 %
KSP	Klassische Schweinepest
KSPV	Virus der Klassischen Schweinepest
log ₁₀	Zehnerlogarithmus
μ	mikro (x10 ⁻⁶)
m	milli (x10 ⁻³)
mAk	monoklonale Antikörper
MDBK	<i>Madin Darby bovine kidney</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
n	nano (x10 ⁻⁹)
nAk	neutralisierende Antikörper
nm	Nanometer
NS-Protein	Nichtstrukturprotein
nzp	nichtzytopathogen
OIE	Office International des Epizooties
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBSM	PBS ohne Calcium- und Magnesiumionen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
PI-3-V.	Parainfluenza-3-Virus
p. i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion

PK	<i>porcine kidney</i>
PLA	<i>peroxidase-linked antibody</i>
PO	Peroxidase
PPV	Porzines Parvovirus
PRCV	Porzines Respiratorisches Coronavirus
PrV	Pseudorabiesvirus
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
ST	<i>swine testis</i>
STE	<i>swine testis epitheloid</i>
TGEV	Transmissibles Gastroenteritisvirus
TPB	<i>tryptose phosphate broth</i>
VG	Virusgehalt der Gesamtkultur
VSV	Vesiculäres Stomatitisvirus
vorw.	vorwiegend
ZF	zellfreies Virus
ZG	zellgebundenes Virus
zp	zytopathogen
ZPE	zytopathischer Effekt

1. Einleitung

Die Klassische Schweinepest (KSP) wird durch ein Pestivirus der Familie Flaviviridae verursacht, das bei Haus- und Wildschweinen die verlustreichste Tierseuche hervorruft. Die Erkrankung wurde vom Office International des Epizooties (OIE) auf die Liste A gesetzt. Die weltweit verbreitete Seuche wird in den Ländern der Europäischen Union (EU) auf staatlicher Ebene bekämpft; eine prophylaktische Impfung ist hier nicht vorgesehen. Mit der Tötung aller Tiere eines betroffenen Bestandes wird neben der Absicht, das aktuelle Geschehen unter Kontrolle zu bringen, auch das Ziel verfolgt, den Erreger vollständig zu eradizieren. Die Eradikation des KSP-Virus (KSPV) ist mit Schwierigkeiten verbunden. Einerseits ist das Virus in der Wildschweinpopulation in einigen Gebieten Europas endemisch und stellt somit ein Virusreservoir dar. Andererseits kommt es durch die Verfütterung von infizierten Speiseabfällen in unregelmäßigen Abständen zu KSP-Primärausbrüchen in Hausschweinbeständen. Dort findet es, begünstigt sowohl durch Mißachtung von Hygienevorschriften wie auch aufgrund von hoher Schweinedichte, Handel und Tiertransporten, eine schnelle Verbreitung. Um so wesentlicher ist es, im Verdachtsfall den Erreger schnell und sicher zu isolieren, zu vermehren und durch Typisierung epidemiologische Daten zu ergänzen.

Ein zentraler Bestandteil in der KSP-Diagnostik ist die Virusisolierung aus Untersuchungsmaterial erkrankter oder verdächtiger Schweine durch Anzucht auf empfänglichen Zellkulturen. Derzeit wird der Nachweis und die Vermehrung des KSPV vorwiegend in zwei permanenten porcinen Zelllinien durchgeführt. Inzwischen sind in der Zellbank der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten (BFAV) auf der Insel Riems neue permanente Zelllinien von Haus- und Wildschweinen zugänglich geworden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die verschiedenen Zelllinien auf ihre diagnostische Eignung im Vergleich zu den bisher eingesetzten Zelllinien zu untersuchen und damit einen Beitrag zur Erhöhung der Sensitivität bei der Diagnostik zu leisten. Dazu wurden als Referenzvirusstämme ein virulenter und ein avirulenter KSPV-Vertreter gewählt.

Darüber hinaus sollte durch die Wahl von KSPV-Vertretern unterschiedlicher Virulenz der Einfluß dieser Eigenschaft auf die Replikation in der Zellkultur untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Virus der Klassischen Schweinepest

2.1.1 Taxonomie

Das Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) gehört zum Genus Pestivirus (HORZINEK, 1973; WESTAWAY et al., 1985) innerhalb der Familie Flaviviridae (HORZINEK, 1991; WENGLER, 1991). Es ist antigenisch eng verwandt mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) und dem Virus der Border Disease (BDV) der Schafe (DARBYSHIRE, 1960; HORZINEK et al., 1967; ENZMANN u. HÄRTNER, 1977; ZEEGERS u. HORZINEK, 1977).

Neben dem Genus Pestivirus findet sich das Genus Flavivirus und das Genus Hepacivirus, dem das humane Hepatitis-C-Virus angehört. Dem Genus Flavivirus sind u. a. das Gelbfieberevirus und das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus des Menschen, das Louping-III-Virus, das Wesselbron-Disease-Virus der Schafe sowie das Meningoenzephalitis-Virus der Pute zugeordnet (WENGLER et al., 1995).

2.1.2 Charakterisierung des Virus

2.1.2.1 Morphologie

Pestiviren sind behüllt, ca. 40 bis 60 nm groß (WENGLER, 1991) und von kubischer Symmetrie (HORZINEK et al., 1967; KUBIN, 1967; HAFEZ et al., 1968). Die ca. 8 nm dicke lipidhaltige bilaminare Hülle schließt ein 30 nm großes, ikosaedrisches Nukleokapsid ein (HORZINEK et al., 1967; FROST et al., 1977; BIELEFELD-OHMANN et al., 1990). Auf der Oberfläche der Hülle finden sich unregelmäßig gestaltete Projektionen (HORZINEK et al., 1967, 1971; ENZMANN u. WEILAND, 1978).

2.1.2.2 Genom

Das Genom der Pestiviren besteht aus einer Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) mit positiver Polarität (DINTER, 1963; KUBIN, 1967; COLLETT et al., 1988a). Die einsträngige RNA hat eine Länge von 12,5 Kilobasen (kB) und kodiert für ca. 4000 Aminosäuren in einem einzigen offenen Leseraster (RENARD et al., 1985; WENGLER, 1991). Am 5'- und 3'-Ende des offenen Leserasters sind neben den Bereichen, die für Strukturproteine und für Nichtstrukturproteine kodieren, nichttranslatierte Regionen zu finden (MOORMANN u. HULST, 1988; RÜMENAPF et al., 1989; MOORMANN et al., 1990; DENG u. BROCK, 1992).

Das KSPV läßt sich durch Sequenzvergleiche bestimmter Genomabschnitte unter Einbeziehung geographischer und epidemiologischer Daten in genetische Gruppen einteilen (LOWINGS et al., 1996; GREISER-WILKE et al., 1998). Für diese phylogenetischen Analysen eigneten sich u. a. die Sequenzen von 150 Nukleotiden der 5'-nichttranslatierten Region, von 190 Nukleotiden des Bereiches, der für das Strukturprotein E2 kodiert, und von 409 Nukleotiden der Region, die für das Nichtstrukturprotein NS5B kodiert. Basierend auf

der Einteilung von LOWINGS et al. (1996), wurden drei Gruppen mit jeweils drei bzw. vier Untergruppen gebildet (PATON et al., 2000a).

2.1.2.3 Proteine

Aus dem Translationsprodukt der viralen RNA, einem Polyprotein, entstehen durch Prozessierung die einzelnen viralen Proteine (COLLETT et al., 1988b; MEYERS et al., 1989; RÜMENAPF et al., 1993). Dies sind die vier Strukturproteine, zu denen das *core*-Protein (c) und die drei Glykoproteine E^{ms}, E1 und E2 zählen sowie die sieben Nicht-Strukturproteine, N^{pro}, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (COLLETT et al., 1991). Am N-terminalen Ende des Polyproteins befindet sich die Protease N^{pro} (WISKERCHEN u. COLLETT, 1991), der sich in 3'-Richtung das *core*-Protein (c) und die Strukturproteine E^{ms}, E1 und E2 anschließen (STARK et al., 1990). Zwischen den vier Strukturproteinen und den sich in 3'-Richtung anschließenden restlichen Nichtstrukturproteinen ist das stark hydrophobe Protein p7 lokalisiert, über dessen Funktion bisher nichts bekannt ist (ELBERS et al., 1996).

2.1.2.4 Antigenität

Die enge serologische Verwandtschaft der Pestiviren untereinander (DARBYSHIRE, 1960) wurde mittels Immunfluoreszenz (MENGELING et al., 1963) und durch Kreuzneutralisations-Tests (KUMAGAI et al., 1961; DARBYSHIRE, 1962; GUTEKUNST u. MALMQUIST, 1963) gezeigt.

Die ersten monoklonalen Antikörper (mAk), die eine sichere Differenzierung porziner und boviner Pestiviren erlaubten, waren gegen Proteine des KSPV-Stammes BRESCIA (WENSVOORT et al., 1986 u. 1989) und gegen Proteine des KSPV-Stammes ALFORT/187 (HESS et al., 1988; CAY et al., 1989; GREISER-WILKE et al., 1990) gerichtet. In gleicher Weise wurde eine serologische Abgrenzung oviner Pestiviren durch BDV-spezifische Antikörper möglich (PATON et al., 1994). Darüber hinaus ermöglichen mAk das Erkennen

von Unterschieden zwischen Isolaten einer homologen Pestiviruspezies (PETERS et al., 1986; BOLIN et al., 1988; CORAPI et al., 1988; CAY et al., 1989; GREISER-WILKE et al., 1990). Im Gegensatz zu den glykoproteinspezifischen mAK kreuzreagieren gegen das NS-Protein NS2-3 gerichtete mAK mit heterologen Pestiviren (PETERS et al., 1986; PATON et al., 1991; GREISER-WILKE et al., 1992).

Gegen die Strukturproteine E^{ms} und E2 gerichtete mAk besitzen neutralisierende Eigenschaften (GREISER-WILKE et al., 1990; PATON et al., 1991; RÜMENAPF et al., 1991). Die antigenen Determinanten, die neutralisierende Antikörper (nAk) induzieren, liegen hauptsächlich auf dem E2-Hüllglykoprotein (WENSVOORT et al., 1990). Das E^{ms}-Protein führt dagegen lediglich zur Bildung schwach neutralisierender Antikörper (BOULANGER et al., 1991; WEILAND et al., 1992).

2.1.2.5 Physikalische und chemische Eigenschaften

Die Beurteilung der Tenazität des KSPV stellt die Grundlage für ein erfolgreiches Kontrollprogramm der Schweinepest dar und ist eine Voraussetzung bei der Arbeit mit dem Erreger im Labor. Das KSPV besitzt wie andere behüllte Viren nur eine kurze, jedoch variable Überlebenszeit in der Umwelt, die von physikalischen und chemischen Bedingungen abhängig ist. Dazu zählen die Temperatur, die Feuchtigkeit, der pH-Wert, die Anwesenheit von organischem Material und der Einfluß verschiedener Chemikalien (EDWARDS, 2000).

Lipidlösliche Substanzen wie Äther, Chloroform oder Detergenzien führen zur Inaktivierung des Virus, da sie die Lipidhülle des KSPV zerstören (McKISSICK u. GUSTAVSON, 1967; HAFEZ u. LIESS, 1972; MOENNIG, 1988a). Enzyme mit proteolytischer Aktivität bewirken nur eine schwache Inaktivierung (DINTER, 1963; KUBIN, 1967). Durch Hitzeeinwirkung von 60 °C über 10 min, UV-Bestrahlung oder bei einem Abfall des pH-Wertes unter 4,0 werden Pestiviren ebenfalls vollständig inaktiviert (KUBIN, 1967). Die Halbwertszeit des KSPV ist deutlich stärker von der Temperatur als vom pH-Wert abhängig. Bei einem pH-Wert von 7, wie er beispielsweise im Nährmedium für Zellkulturen zu finden ist, beträgt die Halbwertszeit bei einer Temperatur von 21 °C durchschnittlich 50 Stunden. Erhöht sich die Temperatur z.B. im Brutschrank auf 37 °C, reduziert sich die Halbwertszeit auf

durchschnittlich 7 Stunden (DEPNER et al., 1992). Temperaturschwankungen, wie sie z.B. bei Gefrier-Tau-Zyklen zur Freisetzung von zellgebundenem Virus auftreten, beeinflussen den Virustiter nur geringfügig (TAYLOR et al., 1963; TANAKA et al. 1968). Das KSPV kann über Jahre bei -70 °C tiefgefroren oder gefriergetrocknet gelagert werden, ohne daß ein größerer Virustiterverlust eintritt (HORZINEK, 1981). Die Vermehrung des Virus wird durch eine Behandlung mit Trypsin, einer Protease, die in der Zellkulturtechnik Verwendung findet, wenig (DINTER, 1963) oder gar nicht beeinträchtigt (KUBIN, 1967). Durch das als Gefrierschutz in der Zellkulturtechnik eingesetzte *Dimethylsulfoxyd* (DMSO), wird das KSPV in seiner Replikation nicht beeinflusst (WALLIS u. MELNICK, 1968).

2.2 KSPV-Infektion beim Schwein

2.2.1 *Einfluß des Virus*

Das KSPV läßt sich in zwei große Gruppen hinsichtlich seiner Virulenz einteilen. Die Gruppe der virulenten Vertreter wird durch die Virusisolate und -stämme gebildet. Demgegenüber stehen die avirulenten Impfstämme, welche durch Attenuierung die Fähigkeit, eine Krankheit hervorzurufen, verloren haben.

Ein genetischer Marker für die Attenuierung konnte bisher nicht gefunden werden. Insertionen in der 3'-nichttranslatierten Region, die zwei Varianten des C-STAMMES aufwiesen, waren bei drei anderen untersuchten Impfstämmen nicht vorhanden (BJORKLUND et al., 1998). Dieser Bereich gilt neben der 5'-nichttranslatierten Region als hochkonserviert innerhalb der Pestiviren.

Die Virulenz eines Virusstammes oder -isolates (PITTLER et al., 1968; CARBREY et al., 1980; VAN OIRSCHOT, 1988; DAHLE u. LIESS, 1995), die Virusdosis (LIESS, 1987; DAHLE u. LIESS, 1995) der Infektionsmodus (LIESS et al., 1977; VAN OIRSCHOT, 1977a) sowie der Ursprung und die Reinheit des Virusisolates (DAHLE u. LIESS, 1995) zählen zu den vom Virus abhängigen Faktoren für den Krankheitsverlauf. Eine Einteilung in hoch, moderat, schwach virulente und avirulente Virusstämme hinsichtlich des Krankheitsverlaufes (VAN OIRSCHOT, 1988) ist ohne definierte Bedingungen nicht möglich, da für den Verlauf einer KSPV-Infektion neben o. g. Virusfaktoren auch zahlreiche Wirtsfaktoren maßgebend sind (DAHLE u. LIESS, 1995). VAN OIRSCHOT (1988) charakterisierte Virusstämme als hoch virulent, wenn eine durch sie hervorgerufene Infektion einen tödlichen Verlauf für nahezu alle Schweine unabhängig von deren Alter zur Folge hatte. Moderat virulente KSPV-Stämme riefen stets einen subakuten oder chronischen Krankheitsverlauf hervor, wobei die Altersklasse der Schweine nicht definiert wurde. Von schwach virulenten KSPV-Stämmen wurde gesprochen, wenn Ferkel, die postnatal infiziert wurden, wenige oder keine Krankheitssymptome zeigten. Avirulente KSPV-Stämme sind

nach VAN OIRSCHOTS Definition attenuierte Stämme, die im Gegensatz zu den schwach virulenten KSPV-Stämmen auch für Feten nahezu apathogen sind.

Diese getroffene Einteilung kann jedoch nicht ohne weiteres als allgemeingültiges Schema übernommen werden, da Faktoren, die den Verlauf einer Erkrankung beeinflussen, nicht definiert wurden bzw. nicht gleich waren und auch die klinischen Symptome sowie deren Ausprägungsgrad mit einbezogen werden müssen. Um Standardbedingungen für die Einteilung von KSPV in die verschiedenen Kategorien der Virulenz zu definieren, wurde ein entsprechender Versuch durchgeführt (MITTELHOLZER et al., 2000). Hierzu wurden sieben KSPV-Stämme verglichen, indem 30 kg schwere *spezifisch pathogenfreie* (SPF) Schweine mit einer intranasalen Inokulationsdosis von 10^6 KID₅₀/ml infiziert wurden. Der Krankheitsverlauf wurde über einen klinischen Schlüssel, der auf 10 KSP-relevanten Symptomen beruhte und deren Ausprägungsgrad beinhaltete (0 = keine Symptome bis 3 = schwere Symptome), festgehalten. Danach galten KSPV-Stämme als hoch virulent, die einen numerischen Wert > 15 (BRESCIA, EYSTRUP und KOSLOV) erreichten. Moderat virulente Stämme besaßen Werte von 5 bis 15. Dazu zählten ein gentechnisch hergestellter Klon von ALFORT/187, vA187-1 (RUGGLI et al., 1996) und der zytopathische Vertreter desselben Klons, cp vA187-1 (MITTELHOLZER et al., 1997). Als gering virulent werden KSPV-Vertreter mit Werten < 5 eingestuft. Avirulent waren die KSPV-Stämme vA187-ubi, bei dem das Npro-Gen durch ein murines Ubiquitingen ersetzt wurde (TRATSCHIN et al., 1998) und der Stamm CAP, der aus einer persistent infizierten porzinen Zelllinie stammt. Deren klinische Schlüssel betragen immer 0.

Am Beispiel des sogenannten hoch virulenten KSPV-Stammes ALFORT (AYNAUD, 1968), des Referenzstammes des Europäischen Referenzlabors für Schweinepest, wird die Problematik der Beurteilung der Virulenz deutlich. Es konnte gezeigt werden, daß die Morbiditäts- und Mortalitätsrate von der Inokulationsdosis abhängig war und auch bei gleicher Dosis eine Variabilität in der Ausprägung des Krankheitsverlaufes auftrat (DAHLE u. LIESS, 1995). Unter den neuen standardisierten Bedingungen wurde der Klon von ALFORT/187 als moderat virulent eingestuft (MITTELHOLZER et al., 2000).

2.2.2 *Einfluß des Wirtes*

Neben der Virulenz des entsprechenden KSPV-Stammes wird den Wirtsfaktoren ein bedeutender Anteil am Krankheitsverlauf zugeschrieben (MENGELING u. CHEVILLE, 1968; PITTLER et al., 1968; LIESS et al., 1976b; DEPNER et al., 1997). Hierzu gehört das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion. So ist bei Saug- und Absatzferkeln die Morbidität und Mortalität höher als bei Mast- oder Zuchttieren (BAKER u. SHEFFY, 1960; CARBREY et al., 1966; PITTLER et al., 1968; PLATEAU et al., 1980; DEPNER et al., 1996b). Der Zeitpunkt einer diaplazentaren Infektion korreliert mit den Folgen der Infektion für den Fetus. In Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium der Muttersau und dem damit verbundenen Entwicklungsstadium des Fetus kommt es zu Mumifizierungen, Totgeburten oder zur Geburt persistent virämischer Ferkel (VAN OIRSCHOT, 1977b; MEYER et al., 1981).

Ernährungszustand, Immunkompetenz und genetische Faktoren (MOENNIG u. PLAGEMANN, 1992; DAHLE u. LIESS, 1995; DEPNER et al., 1997) des Wirtstieres sind ebenso von Bedeutung wie Wirtsfaktoren, die für die individuell stark variierende, vor allem immunologische Reaktion auf den Erreger verantwortlich sind (MENGELING u. CHEVILLE, 1968; LIESS et al., 1976; PLATEAU et al., 1980).

2.2.3 *Verlaufsformen der Klassischen Schweinepest*

Die Erscheinungsbilder der Klassischen Schweinepest beim Schwein reichen von klinischer Inapparenz, chronischen Verläufen mit Sekundärinfektionen, unterschiedlich stark ausgeprägten hämorrhagischen und zentralnervösen Symptomen bis hin zu perakutem Verenden.

2.2.3.1 Akute Verlaufsformen

In Abhängigkeit von der Dauer der Krankheit bis zum Eintritt des Todes werden perakute (plötzlicher Tod innerhalb von 5 Tagen), akute (Tod zwischen 10 und 20 Tagen) und subakute (Tod zwischen 20 und 29 Tagen) Verläufe unterschieden (DUNNE, 1970; VAN OIRSCHOT, 1988).

Der akute Verlauf mit letalem Ausgang ist in der Regel durch Fieber ($\geq 41^\circ\text{C}$), Apathie und Anorexie, Dyspnoe, petechiale Blutungen in der Haut, Konjunktivitis, Verstopfung oder Durchfall, Zittern, Krämpfe, Nachhandschwäche und Bewegungsstörungen gekennzeichnet.

Der Ausprägungsgrad dieser Symptome bildet die Basis bei der Klassifizierung der KSPV-Stämme hinsichtlich ihrer Virulenz (MITTELHOLZER et al., 2000).

Verläuft die KSP akut, jedoch nicht mit letalem Ausgang, können oben genannte Symptome unterschiedlich stark ausprägt sein oder gänzlich fehlen. Nach zwei bis vier Wochen bilden diese Tiere eine effektive Immunantwort aus und genesen (BÖHM et al., 1966; LIESS et al., 1977; DEPNER et al., 1994; DAHLE u. LIESS, 1995).

Bei letal verlaufender akuter KSP sind meist nur geringe Mengen neutralisierender Antikörper (nAk) kurz vor Eintritt des Todes nachweisbar. Bei Rekonvaleszenten sind nAk ab der zweiten bis dritten Woche, mit maximalen Titern nach drei bis vier Monaten, vorhanden (KORN et al., 1973; RESSANG, 1973; LIESS et al., 1976b, 1977; DEPNER et al., 1994).

Pathogenetisch stehen bei der akuten Form der Schweinepest die Gerinnungsstörungen und die Leukopenie im Vordergrund. Erstere werden durch die Schädigung von Endothel-, Epithel- und lymphoretikulären Zellen sowie von Makrophagen durch das Virus verursacht (RESSANG, 1973). Die damit verbundene Aktivierung der Gerinnungskaskade hat eine Verbrauchskoagulopathie zur Folge, die mit *disseminierter intravaskulärer Koagulation* (DIK) und mit der Bildung von Mikrothromben einhergeht. Die Leukopenie und die qualitativen Veränderungen der Leukozytenpopulationen werden durch den direkten zytotoxischen Effekt des sich in den Leukozyten vermehrenden Virus hervorgerufen (HEENE et al., 1971; HOFFMANN et al., 1971).

2.2.3.2 Chronische Verlaufsform

Der Begriff der chronischen KSP wurde von MENGELING und CHEVILLE (1968) geprägt und bezeichnet einen mehr als 30 Tage dauernden Krankheitsverlauf mit letalem Ausgang (NUSSHAG, 1927; REPPIN, 1963; CARBREY et al., 1966; LIESS et al., 1976b).

Die chronische Verlaufsform wird in Zusammenhang mit moderat virulentem Virus gebracht (MENGELING u. CHEVILLE, 1968; PITTLER et al., 1968; DAHLE u. LIESS, 1995) und auch als atypische Schweinepest bezeichnet, da das klinische Bild oftmals nicht charakteristisch für die KSP ist (REPPIN, 1963). Häufig findet man intermittierendes Fieber und zeitweise auftretende Diarrhoe, Kümern sowie Sekundärinfektionen, an denen die Tiere oft sterben (DEPNER et al., 1996a).

Neutralisierende Antikörper sind erst nachweisbar, wenn ihre Konzentration höher als die Viruskonzentration im Blut ist, was kurzfristig in der Phase der klinischen Besserung zwischen der dritten und sechsten Woche nach der Infektion geschehen kann (MENGELING u. CHEVILLE, 1968; MENGELING u. PACKER, 1969; DEPNER et al., 1996a). In der sich anschließenden terminalen klinischen Phase, die mit Wiederauftreten klinischer Symptome und generalisierter Virusausbreitung einhergeht, ist ein Nachweis von nAk nicht mehr zu erwarten.

Pathogenetisch fallen im Unterschied zum akuten Verlauf der KSP die oft beobachtete Thymusatrophie und die durch Immunkomplexe bedingten glomerulären Veränderungen in der Niere auf. Veränderungen des Blutgerinnungssystems werden seltener beobachtet. Gemeinsam ist beiden Verlaufsformen die Lymphozytendepletion und die damit verbundene Immunsuppression (MENGELING u. CHEVILLE, 1968; CHEVILLE u. MENGELING, 1969). Im Dickdarm treten oft knopfförmige Ulcerationen (engl. *button ulcer*) auf, die histologisch dem Bereich der großen Intestinallymphknoten-Komplexe zugeordnet werden konnten (DEPNER et al., 1996a).

2.2.3.3 *Persistierende Infektionen*

Ist der Virusnachweis und die Virusausscheidung ohne deutliche klinische Symptome des Wirtes über 30 Tage möglich, spricht man von einer persistierenden Infektion. Einer solchen Infektion können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Bei KSPV-Infektionen wird der Veränderung der körpereigenen Immunabwehr durch das Virus besondere Bedeutung zugemessen (KAADEN u. VAN DAWEN, 1983).

Infektionszeitpunkt und Virulenz des Virusstammes spielen bei der Etablierung einer persistierenden KSPV-Infektion eine entscheidende Rolle (LIESS et al., 1976b; VAN OIRSCHOT, 1979b; MEYER et al., 1981). Nach intrauteriner bzw. pränataler Infektion wird die Viruspersistenz durch die Induktion einer KSPV-spezifischen Immuntoleranz ermöglicht (VAN OIRSCHOT, 1977b; VAN DER MOLEN u. VAN OIRSCHOT, 1981). Nach postnataler Infektion liegt der Viruspersistenz eine virusbedingte Zerstörung der B-Zellpopulationen zugrunde (MENGELING u. PACKER, 1969).

Pränatale KSPV-Infektionen haben in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium unterschiedliche Folgen für die Feten. Erfolgt die Infektion der Sau und die damit verbundene transplazentare Übertragung des Virus auf die Feten im zweiten Drittel der Trächtigkeit, ist der Anteil persistent-virämischer Ferkel besonders hoch (VAN OIRSCHOT, 1979a; HERMANNNS et al., 1980; MEYER et al., 1981). Die Ferkel fallen oft nur durch ihr Kümmeren auf, selten treten vorübergehend KSP-typische Symptome auf (VAN OIRSCHOT, 1979b). Solche Tiere können bis zu elf Monate überleben (VAN OIRSCHOT, 1979a).

Kongenital infizierte virämische Ferkel können aktiv IgM synthetisieren, sind aber zeitlebens nicht in der Lage, spezifische, gegen das homologe KSPV gerichtete IgG zu bilden. Diese Unfähigkeit wird außerdem durch die Abwesenheit von Immunkomplexablagerungen bestätigt (VAN OIRSCHOT, 1979b; MEYER et al., 1981; VAN DER MOLEN u. VAN OIRSCHOT, 1981; TRAUTWEIN, 1988).

Postnatale KSPV-Infektionen von Ferkeln im neonatalen Zeitraum, d.h. bis zur sechsten Lebenswoche, können entweder akut verlaufen oder chronisch persistieren (LIESS et al., 1976b; EHRENSPERGER, 1988). Ferkel, in denen das Virus chronisch persistiert, kümmern, sind aber sonst klinisch unauffällig. Drei bis vier Tage vor Eintritt des Todes können Fieber, Apathie, Durchfall und Hautveränderungen auftreten (VAN OIRSCHOT, 1988).

Bei neonatal infizierten Ferkeln bleibt die humorale Antwort aus, es sind serologisch keine gegen KSPV gerichtete Antikörper (Ak) festgestellt worden (LIESS et al., 1976b; EHRENSPERGER, 1988).

Die oben beschriebene chronische Schweinepest kann als klinischer Ausdruck der persistierenden Infektion bei Schweinen nach dem Absetzen angesehen werden. Auch wenn es, wie manchmal beobachtet, zur temporären Bildung von nAk kommt, kann diese letztendlich eine lebenslange Virämie mit letalem Ausgang der Infektion nicht verhindern (BAKER u. SHEFFY, 1960; MENGELING u. CHEVILLE, 1968; LIESS u. PRAGER, 1976a; CARBREY et al., 1977; LIESS, 1984).

2.3 KSPV-Vermehrung und Nachweis in vitro

2.3.1 Replikations-Eigenschaften des KSPV in Zellkulturen

Das KSPV vermehrt sich in der Zellkultur, von einigen Ausnahmen abgesehen, ohne zythopathischen Effekt (MOENNIG, 1988a; KOSMIDOU, 1995). Für die KSPV-Stämme ALFORT (AYNAUD, 1968; LAUDE, 1977) und MÜNCHEN-1 (DANNER u. BACHMANN, 1970) läßt sich nach einer Latenzzeit von 4 bis 5 Stunden das KSPV im Zytoplasma der Zelle, dem Ort der Virusreplikation, nachweisen. In der direkten Immunfluoreszenz zeigt sich bis 14 Stunden *post infectionem* (h p. i.) eine zunehmende Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma, die perinukleär am stärksten ausgeprägt ist.

Die Mechanismen der Virusadsorption und Penetration in die Zelle während der Latenzphase sind noch weitestgehend ungeklärt. Verschiedene Wege kommen in Frage. Neben einem rezeptorvermittelten Vorgang, wie für das BVDV beschrieben (MOENNIG et al., 1988b; BOULANDER et al., 1992; AGNELLO et al., 1999; SCHELP et al., 1995 u. 2000), sind auch weniger effiziente rezeptorunabhängige Alternativwege möglich (MARKWELL et al., 1985; LIESS u. MOENNIG, 1990).

Nach der Phase der Translation und Genomreplikation beginnt mit abgeschlossener Morphogenese 6 bis 8 h p. i. die Virusfreisetzung aus der Zelle in den Zellkulturüberstand (DANNER u. BACHMANN, 1970). Sind in einer Zellkultur alle Zellen gleichzeitig infiziert worden, was der Fall ist, wenn sich die Konzentration der Viruspartikel und die der Zellen entsprechen (engl. *multiplicity of infection*, MOI = 1), folgt der Infektionsverlauf einer Einschnittvermehrungskurve. Diese zeigt sich bei der KSPV-Vermehrung in PK(15)-Zellen (*porcine kidney*, PK) in einem exponentiellen Titeranstieg bis 24 h p. i. (DANNER u. BACHMANN, 1970) bzw. 15 h p. i. (LAUDE, 1977), der nach einer sich anschließenden Plateauphase ab der 60. h p. i. langsam wieder abfällt. In primären Einschnittzellkulturen, die ihren Ursprung in porzinen Nieren und Hoden hatten, wurde ein ähnlicher, aber deutlich verlangsamter Infektionsverlauf für den Virusstamm AMES beobachtet (MENGELING u. DRAKE, 1969).

Sind nicht alle Zellen gleichzeitig infiziert worden, breitet sich innerhalb der Zellkultur die Infektion schneller von Zelle zu Zelle aus als über das Kulturmedium, was zur Entstehung von Mikroplaques führte (DANNER u. BACHMANN, 1970).

2.3.1.1 KSPV-Vermehrung in Kulturen verschiedenen Ursprunges

Die ersten erfolgreichen KSPV-Vermehrungen, bei denen „infektiöses Plasma“ von an KSP erkrankten Schweinen als Ausgangsmaterial diente, wurden 1932 aus den damaligen Staatlichen Forschungsanstalten Insel Riems berichtet, bei denen die Virusreplikation in Tropfenkulturen von Plexus chorioideus-, Milz-, Knochenmark- und Lymphknotengewebe junger Ferkel nachgewiesen wurde (HECKE, 1932). Später folgten weitere Versuche, in denen sich ebenfalls Gewebe porzinen Ursprunges als geeignet für die KSPV-Vermehrung erwies (TENBROECK, 1942; TSUBAKI, 1942; MARKOVITS u. BIRO, 1955). So konnte in Hodenzellen (KUMAGAI et al., 1958; KUBIN, 1964;), Milzzellen (FRENKEL et al., 1955; GUSTAVSON u. POMERAT, 1956; DALE u. SONGER, 1959), Leberzellen (DALE u. SONGER, 1957), Knochenmarkszellen (BOYNTON, 1946) und in Leukozyten (DUNNE et al., 1957; LOAN, 1961, 1964; KORN u. ZOETH, 1971) porzinen Ursprunges das KSPV kultiviert werden.

Auch viele Zellkulturen, die ihren Ursprung in unterschiedlichsten Geweben verschiedenster Säugetierspezies hatten, erwiesen sich als empfänglich für das KSPV. Das zeigten Untersuchungen mit dem virulenten Virusstamm AMES und einem avirulenten kommerziellen Impfvirusstamm (MONOVET, Affiliated Laboratories, White Hall, Ill) an 24 primären Nierenzelllinien, die von Paarhufern, Raubtieren, Nagetieren, Herrentieren (Primaten), Hasentieren und Beuteltieren stammten. In allen Zelllinien, die von den Paarhufern stammten, wie denen vom Rind, Schaf, Ziege, Weißwedelhirsch, Hausschwein und Pecari, replizierten beide Testvirusstämme. Ebenso in denen, die ihren Ursprung in Hasenartigen hatten. Dagegen waren von vier getesteten Nagetier-Nierenzelllinien nur die Hälfte für die Testvirusstämme empfänglich. Ähnlich verhielt es sich mit den von den Raubtieren stammenden Zelllinien, in denen nur in zwei von fünf untersuchten Zelllinien die

KSP-Virusstämme replizierten. Die Zelllinien mit dem Ursprung in Primaten und Beuteltieren waren unempfindlich für die untersuchten Virusstämme.

In Zelllinien der 5. bis 40. Subkultur, die die Haut, die Milz, die Luftröhre, die Niere, den Ösophagus oder das Gehirn von Paarhufern als Ursprung hatten, sowie in Nieren- und Hodenzellen von Meeressäugern und in zwei Hautzelllinien der Hasenartigen, vermehrten sich größtenteils beide Virusstämme. Unter den permanenten Zelllinien (56. bis 420. Subkultur) erwiesen sich neben Hundenierenzellen sogar Zelllinien mit Primatenursprung als gering empfänglich. Bei allen diesen Untersuchungen replizierten beide Testvirusstämme am besten in den vom Schwein stammenden Nierenzellen (PIRTLE u. KNIAZEFF, 1968).

Die bis heute für die Schweinepestdiagnostik verwendete und für die Vermehrung von KSPV gut geeignete Zelllinie PK(15) (MENGELING et al., 1963; CARBREY et al., 1965; PIRTLE u. KNIAZEFF, 1968) ist aus der 1955 etablierten Schweinenieren-Zelllinie PK(2a) hervorgegangen (HARRIS, 1960).

2.3.1.2 Einfluß der Virulenz des KSPV auf die Vermehrung in der Zellkultur

Zwischen attenuierten und virulenten Stämmen bestehen Unterschiede bei der Virusreplikation in Zellkulturen. Untersucht wurden die in Kapitel 2.3.1.1 bereits erwähnten Virusstämme, der virulente Virusstamm AMES und der avirulente kommerzielle Impfvirusstamm (MONOVET, Affiliated Laboratories, White Hall, Ill). Von 25 der 38 untersuchten primären Zelllinien bzw. Zelllinien der 5. bis 42. Subkultur, die für das KSPV empfänglich waren, zeigte sich in 23 eine bessere Vermehrung des avirulenten Vertreters, wobei drei von diesen ausschließlich für den avirulenten Virusstamm empfänglich waren. Bei diesen Untersuchungen war die für den avirulenten Virusstamm in den meisten Fällen beobachtete höhere Empfänglichkeit zum Teil auf die bessere Adaptation des Virus an die *in-vitro*-Bedingungen zurückgeführt worden. Nur bei den permanenten Zelllinien (56. bis 420. Subkultur) konnte dieser Unterschied in der Virusreplikation nicht festgestellt werden. In 8 von 13 untersuchten empfänglichen Zelllinien vermehrten sich beide Testvirusstämme gleichermaßen (PIRTLE u. KNIAZEFF, 1968).

Unterschiede in der Virusreplikation zwischen Stämmen unterschiedlicher Virulenz zeigten sich auch, als sich in Alveolarmakrophagen fünf virulente Virusstämme (ALD, NIIGATA/1966, HOKKAIDO/1966, YAMANASHI/1969 und FUKUODA/1972) gut replizierten und von drei attenuierten Virusstämmen (331, GPE+ und GPE-) sich einer nicht und zwei nur schlecht vermehren ließen (NAKAMURA et al., 1983).

Die Verschiedenheit virulenter und lapinisierte KSPV- Stämme zeigte sich auch bei der mehrmaligen Subkultivierung von Zellen, die mit diesen Viren infiziert waren. Während bei den virulenten Stämmen kein Virulenzverlust eintrat, schritt die Attenuierung der lapinisierten Stämme fort (SAMEJIMA et al., 1977).

Zwischen verschiedenen KSPV-Stämmen waren auch Unterschiede im Verteilungsverhältnis der zellgebundenen und der zellfreien Virusfraktion in Einschnittvermehrungskurven, zu finden. Für den virulenten KSPV-Stamm MÜNCHEN-1, der auch in hohen Verdünnungsstufen die Probanden (Veredeltes Deutsches Landschwein, 15 bis 20 kg Körpergewicht) mit deutlichen KSP-Symptomen erkranken ließ (MAHNEL et al., 1966), ergab sich eine Verteilung zugunsten der zellgebundenen Fraktion, die ein bis zwei Titerstufen über dem Virusgehalt des Mediums lag und in dieser Weise von der 10. bis 100. h p. i. dokumentiert werden konnte (DANNER u. BACHMANN, 1970). Untersuchungen mit dem virulenten KSPV-Stamm ALFORT und der Nierenzelllinie PK(15) führten zu gleichartigen Ergebnissen (LAUDE, 1977). Dagegen konnten mit der Nierenzelllinie PK(15) unter Verwendung des virulenten Virusstammes AMES entgegengesetzte Resultate in der Zellkultur gefunden werden (MENGELING u. DRAKE, 1969). Jüngste Versuche wurden mit der Nierenzelllinie SK 6 durchgeführt, wobei in diesen Untersuchungen zuvor die Virulenz der eingesetzten KSPV-Stämme unter standardisierten Bedingungen im Tierversuch definiert worden war. In dem Vergleich hoch, moderat virulenter und avirulenter Stämme wurde 12 bis 30 h p. i. für die hoch virulenten Stämme ein größerer Anteil in das Medium freigesetztes Virus nachgewiesen, der bis zu einer Titerstufe log 10 über der in den Zellen bestimmten Konzentration lag. Bei den moderat virulenten Virusstämmen, zu denen auch der Klon des ALFORT/187 gehörte, lagen umgekehrte Verhältnisse vor. Auch bei den avirulenten Vertretern wurde ein größerer Anteil zellgebundenes Virus gefunden. Diese Ergebnisse und die Feststellung, daß hoch virulente KSPV-Stämme neben flacherer Wachstumskurve auch niedrigere Maximaltiter aufwiesen,

gaben Anlaß zu der Vermutung, daß die Virulenz verschiedener KSPV-Stämme aufgrund ihrer Eigenschaften in der Zellkultur charakterisierbar sein könnte (MITTELHOLZER et al., 2000). VAN OIRSCHOT (1988) machte basierend auf seiner Klassifikation der Virulenz entgegengesetzte Beobachtungen in bezug auf die erreichten Maximaltiter. Virulenteres Virus zeigte eine schnellere Virusreplikation und höhere Virustiter in PK(15)-Zellen gegenüber weniger virulenten Stämmen.

2.3.1.3 KSPV-Replikation mit zytopathischem Effekt

Von einem zytopathischen Effekt wird gesprochen, wenn in einer virusinfizierten Zellkultur morphologische und funktionelle Veränderungen an Zellen auftreten. Diese können sich entweder in Form von einfacher Degeneration äußern, die durch Formveränderungen der Zellmorphologie, granuliertes Zytoplasma, Größenzunahme von Kern und/oder Zelle, Kernpyknose, Chromatinfragmentierung und letztlich Zelltod sowie Desintegration aus dem Zellverband gekennzeichnet ist. Zusätzlich ist das Auftreten von Einschlußkörperchen möglich, das mit der Bildung von Riesenzellen bzw. Syncytien verbunden sein kann (ENDERS, 1954).

Zytopathische Veränderungen in einer Zellkultur aufgrund einer KSPV-Infektion stellen eher die Ausnahme dar. Es sind jedoch für alle Pestiviren neben nicht-zytopathogenen Biotypen auch zytopathogene Biotypen beschrieben worden (MOENNIG u. PLAGEMANN, 1992; MEYERS u. THIEL, 1995).

Die Interaktion verschiedener Viren untereinander oder von Teilen von Viruspartikeln mit einem „Helfervirus“ kann in der Zellkultur zu einem *zytopathischen Effekt* (ZPE) führen. Dieser als Interferenz bezeichnete Vorgang wurde diagnostisch in der END (*exaltation of newcastle disease*)-Methode ausgenutzt, bei der der durch Newcastle Disease-Virus verursachte ZPE in Anwesenheit von KSPV beschleunigt wird (KUMAGAI, 1961). Diese Effekte ließen sich auch für die Interaktion von KSPV und Teschen-Virus darstellen (KUBIN, 1965).

Eine ähnliche Funktion als „Helfervirus“ erfüllt der KSPV-Stamm, wenn es in Anwesenheit unvollständiger Viruspartikel (engl. *defective interfering particles*, DIs) zur Ausprägung

eines ZPE in der Zellkultur kommt (TAUTZ et al., 1994; KOSMIDOU, 1995). Dieser wird, basierend auf Untersuchungen rekombinanter DIs des KSPV-Isolates ALFORT/M, ausschließlich auf die DIs in zytopathogenen KSPV-Stämmen zurückgeführt (MEYERS et al., 1996). Bei den DIs handelt es sich um Deletionsmutanten des KSPV, denen neben den Bereichen, die für die Strukturproteine kodieren, auch die Bereiche für die Nichtstrukturproteine N^{pro} und NS2 fehlen (KOSMIDOU, 1995; MEYERS u. THIEL, 1995). Das Nichtstrukturprotein NS3 ist aufgrund dieser Genomstruktur das erste Protein, das exprimiert wird, wobei dessen gesteigerte Expression mit dem zytopathischen Effekt in Verbindung gebracht wird (MEYERS et al., 1996). Der klinische Bezug zu diesen Beobachtungen wurde durch Infektionsversuche hergestellt. Hier reagierte ein mit zytopathogenem Virus infiziertes Schwein im Vergleich zu einem mit nichtzytopathogenem Virus infiziertem Tier mit einer früher einsetzenden Virämie und mit stärker ausgeprägten klinischen KSP-Zeichen (KOSMIDOU et al., 1998).

2.3.1.4 Bedeutung der Zellkulturen für den direkten Infektionsnachweis in der KSPV-Diagnostik

Die hohe Variabilität der klinischen Bilder der KSP erschwert eine Diagnose, die sich nur auf klinische und pathologische Befunde stützt. Daher sind Labormethoden notwendig, um eine eindeutige Diagnose stellen zu können. Die Virusisolierung in der Zellkultur ist der Goldstandard für den direkten Infektionsnachweis. Sie wird zur Bestätigung und Absicherung von Laborergebnissen, die mit anderen Methoden erzielt wurden, eingesetzt. Derzeit wird für die Virusisolierung die Nierenzelllinie PK(15) verwendet. Sowohl das Nährmedium als auch die Zelllinie müssen frei von Pestiviren und gegen sie gerichtete Antikörper sein (ANONYMUS, 1996; FLOEGEL et al., 1998). Der direkte FAT (*fluorescent antibody test*) an Gefrierschnitten von Organen verdächtiger Tiere wird zum Nachweis von KSP-Antigen in den Zellen infizierter Organe benutzt. Voraussetzung für die Auswertbarkeit des Testes sind frisches Untersuchungsmaterial, eine eindeutige Färbung und Erfahrung bei der Beurteilung der Ergebnisse (ANONYMUS, 2001). Daneben kann der KSPV-Nachweis auch über den ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) oder die RT-PCR (*reverse transcriptase-*

polymerase chain reaction) geführt werden. Die Virusanzüchtung und die RT-PCR erwiesen sich als die sensitivsten Methoden zur Feststellung einer Frühinfektion bei akutem und subakutem Krankheitsverlauf vor dem Auftreten klinischer Symptome. Dagegen waren die Antigen-ELISAs erst zum Zeitpunkt einer klinischen Erkrankung positiv (KADEN et al., 1999). Der Vergleich von RT-*nested* PCR (RT-nPCR), bei der alle Reaktionsschritte in einem Gefäß erfolgten, RT-PCR, Virusisolierung und ELISA zeigte eine abnehmende Sensitivität in dieser Reihenfolge. In den sechs Laboren, die die RT-PCR bzw. RT-nPCR nach ihren Protokollen durchführten, traten bei einigen falsch positive Ergebnisse aufgrund von Kontaminationen auf (PATON et al., 2000b). In einem zweiten Ringtest, basierend auf standardisierten Protokollen, vermieden nur drei Labore signifikant falsch positive Ergebnisse (PATON et al., 2000c). Da die Virusisolierung in der Zellkultur eine hohe Spezifität und Sensitivität besitzt und die Kontaminationsgefahr deutlich geringer ist, stellt sie nach wie vor die Methode der Wahl dar.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Es wurden permanente porcine Zelllinien untersucht.

3.1.1.1 Referenzzelllinie PORCINE KIDNEY (15) AMSTERDAM (PK(15)A)

Die im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover verwendete Zelllinie PK(15)A (*porcine kidney (15) amsterdam*) wurde 1974 durch Einzelzellklonierung erhalten (LIESS, pers. Mitteilung). Die Klone werden vom Europäischen Referenzlabor für KSP in Hannover als Referenzzelllinie für die KSP-Diagnostik und KSPV-Vermehrung eingesetzt. Es ist eine permanente epitheloide Zelllinie, die frei von Kontaminationen wie BVDV und Mykoplasmen ist. Die Kultivierung erfolgte mit MEM (*minimum essential medium*) auf der Basis von Earle´s-Salzen unter Zusatz von 5 % *fetalem Kälberserum* (FKS), welches auf seine Freiheit von BVDV und Antikörper (AK) gegen BVDV überprüft wurde (genaue Zusammensetzung unter 8.2.1). Nach 48 bis 72 h ließ sich die Kultur im Verhältnis 1:5 bis 1:7 umsetzen. Es wurde die 57. bis 65. Subkultur eingesetzt.

3.1.1.2 Referenzzelllinie SWINE TESTIS EPITHELOID (STE)

Die STE (*swine-testis-epitheloid*)-Zelllinie stammt von einer von McCLURKIN und NORMAN (1966) geschaffenen Zelllinie ab. Die im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover vorhandene Linie wurde Mitte 1997 aus dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Detmold bezogen und stammt aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten (BFAV) der Tiere Tübingen, wo eine Einzelzellklonierung der ursprünglichen ST-Zelllinie durchgeführt worden ist (KOSMIDOU, 1995). Dem STE-Medium, das zu gleichen Teilen aus MEM auf der Basis von Earle's-Salzen und Leibovitz-15-Medium (L15) bestand, wurden 10 % TPB (*tryptose phosphate broth*) und 10 % Pferdeserum zugesetzt (genaue Zusammensetzung unter 8.2.1). Die Zellkultur ließ sich nach 48 bis 72 h im Verhältnis 1:3 bis 1:4 umsetzen. Es wurde die 73. bis 77. Subkultur eingesetzt.

3.1.1.3 Referenzzelllinie PK(15) (Katalognummer RIE 5-1)

Diese Nierenzelllinie unbekanntes Ursprunges wird seit 1975 in der Zellbank der BFAV der Tiere auf der Insel Riems kultiviert. Sie ist die Referenzzelllinie für das Nationale Referenzlabor für KSP, Insel Riems, in Deutschland. Das Kulturmedium bestand aus MEM auf der Basis von Earle's- und Hanks-Salzen, Natriumpyruvat, nichtessentiellen Aminosäuren sowie 10 % FKS (genaue Zusammensetzung unter 8.2.1).

Nach 48 bis 72 h konnte die Zellkultur im Verhältnis 1:6 bis 1:10 umgesetzt werden. Es wurde die 105. bis 109. Subkultur verwendet.

3.1.1.4 Zelllinien vom Haus- und Wildschwein

Weitere permanente Zelllinien wurden von der Zellbank der BFAV Insel Riems zur Verfügung gestellt (Tabelle 1). Als Kulturmedium fand das unter Punkt 3.1.1.3 und im Anhang aufgeführte Medium Verwendung. Die Zelllinien sind auf ihre Freiheit von Bakterien und Pilzen geprüft. Mykoplasmen waren mit der Kulturmethode, der DNA-Färbung, dem Adenosinphosphorylase-Test und in der PCR nicht nachweisbar. Im FAT konnte kein BVDV nachgewiesen werden.

Die Linienpässe mit Herkunft, Umsatzverhältnis, Wachstumscharakteristika, Chromosomensatz, Empfänglichkeit für andere Viren als das KSPV und Nachweis von latenten Viren sind unter 8.1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Permanente Zelllinien vom Haus- und Wildschwein

Ursprungsgewebe	Herkunft	Kurz- bezeichnung	Katalog-Nr.	Verwendete Subkultur
Hausschwein:				
Niere, embryonal	Rußland	SPEV	RIE 8	263-264
Lunge, embryonal	Zellbank	SLU-R	RIE 113	135-139
Vollembrryo	Zellbank	SE-R	RIE 139	211-215
Thymus, embryonal	Zellbank	EFTH-R	RIE 169	115-118
Hoden, embryonal	Zellbank	EFH-R	RIE 170	155-157
Nabelvenenendothel	Zellbank	SEN-R	RIE 245	86-89
Eileiter	Zellbank	OVI-S	RIE 270	53-55
Hoden	ATCC	ST	RIE 278	132-140
Nasenschleimhaut, adult	Zellbank	NSW-R	RIE 541	32-46
Gehirn, adult	Zellbank	SGW-R	RIE 565	87-91
Wildschwein:				
Gehirn, fetal	Zellbank	WSG-R	RIE 378	150-158
Lunge, fetal	Zellbank	WSL-R	RIE 379	113-117
Haut, fetal	Zellbank	WSH-R	RIE 388	110-113

3.1.2 KSP-Viren

3.1.2.1 KSP-Virusstämme

Zwei gut charakterisierte, sich in ihrer Virulenz unterscheidende KSPV-Stämme wurden in allen Zelllinien vermehrt, um eine Vorselektion der Zelllinien hinsichtlich ihrer KSPV-Empfänglichkeit und Replikationsrate vorzunehmen.

Der avirulente KSPV-Stamm C-STAMM-RIEMS/SP253/2 stammt aus der laufenden Impfstoffproduktion und wurde vom Riemser Arzneimittelwerk bezogen. Der C-STAMM (engl. *chinese strain*) ist aus einem in der VR China isolierten KSPV-Stamm hervorgegangen, der durch mehrmalige Passagen im Kaninchen (lapinisierte Impfstamm) attenuiert wurde (KOPROWSKI et al., 1946; BEER et al., 1972).

Der virulente KSPV-Stamm EYSTRUP/CSF Nr. 0910 (GREISER-WILKE et al., 2000), der seinen Ursprung in einem KSP-Ausbruch in Niedersachsen (DRÄGER et al., 1964) hat, stammt aus der Virusbank des Europäischen Referenzlabors für KSP in Hannover. Er wurde für die Untersuchungen ausgewählt, da er als hoch virulent charakterisiert worden war (MITTELHOLZER et al., 2000).

3.1.2.2 KSP-Feldisolate

Für weiterführende Untersuchungen wurden KSPV-Isolate ausgewählt, die sich in den Referenzzelllinien PK(15)A bzw. STE schlecht (Virustiter $\leq 10^3$ KID₅₀/ml) oder nicht vermehrt hatten (Tabelle 2 bis 3). Es wurden Zellkulturüberstände der PK(15)A eingesetzt, da auf dieser Zelllinien die Erstanzucht versucht worden war und Originalmaterial nicht mehr vorhanden war (FLOEGEL-NIESMANN, pers. Mitteilung).

Tabelle 2: Isolate, deren maximaler Virustiter in der Referenzzelle PK(15)A bzw. STE $\leq 10^3$ KID₅₀/ml betrug.

CSF Nr. des Isolates	Spezies	Herkunft	Genetischer Typ*
0365	Hausschwein	Deutschland	2.1 Paderborn
0638	Wildschwein	Deutschland (MVP)	2.3 Spante
0644	Hausschwein	Honduras	1

Tabelle 3: Isolate, bei denen der Virusnachweis in den Referenzzelllinien nur sporadisch oder nicht geführt werden konnte.

CSF Nr. des Isolates	Species	Herkunft	Genetischer Typ*
0301	Hausschwein	Deutschland	2.1 Paderborn
0332	Hausschwein	Deutschland	2.2
0348	Hausschwein	Deutschland	2.1 Paderborn
0396	Hausschwein	Spanien	2.1 Paderborn
0426	Hausschwein	Costa Rica	-
0450	Wildschwein	Deutschland (MVP)	-
0461	Wildschwein	Deutschland (MVP)	-
0571	Hausschwein	Spanien (Aragon)	2.1 Paderborn

* GREISER-WILKE et al., 2000

Um die Eigenschaften der Zelllinien unter Diagnostikbedingungen und ihre Resistenz gegenüber toxischen Einflüssen zu prüfen, wurde Organmaterial eingesetzt (Tabelle 4), mit dem unter Standardkulturbedingungen das Virus isoliert werden konnte (FLOEGEL-NIESMANN, pers. Mitteilung).

Tabelle 4: Organmaterialien, aus denen das KSPV mit der Referenzzelllinie PK(15)A isoliert werden konnte.

CSF Nr. des Isolates	Species	Herkunft	Genetischer Typ*
0411	Wildschwein	Deutschland (NS)	2.3 Uelzen
0570	Wildschwein	Deutschland (NS)	2.3 Uelzen
0574	Wildschwein	Deutschland (NS)	2.3 Uelzen
0579	Hausschwein	Deutschland (NRW)	2.3 Uelzen

* GREISER-WILKE et al., 2000

3.1.3 Antikörper und Konjugate

3.1.3.1 KSPV-Nachweis mit dem BVD/C16

Der zum KSPV-Antigennachweis verwendete anti-BVD *monoklonale Antikörper* (mAk), trägt die Bezeichnung BVD/C16 und ist gegen das bei allen Pestiviren stark konservierte Nichtstrukturprotein NS2-3 gerichtet (GREISER-WILKE et al., 1992). Er wurde im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover hergestellt (PETERS et al., 1986), ist mit Peroxidase (PO) gekoppelt und wird in der Schweinepestdiagnostik routinemäßig eingesetzt (FLOEGEL-NIESMANN, pers. Mitteilung).

3.1.3.2 Zytokeratinnachweis

Zur Differenzierung zwischen Epithelzellen und Fibroblasten wurden die Zytokeratine, die als Markerproteine der Epithelzellen anzusehen sind, angefärbt.

Der anti-Keratin-Antikörper MNF 116 reagiert mit den Zytokeratinen 5, 6, 8, 17 und wahrscheinlich auch 19 (DAKO Hamburg, Best.-Nr.: M 0821). Da es sich um einen ungekoppelten polyklonalen Antikörper handelt, wurde das Konjugat Ziege-anti-Maus-Peroxidase (engl. *goat-anti-mouse-peroxidase*, GAM-PO) zur Darstellung der gebundenen polyklonalen AK verwendet (Bio-Rad/München, Best.-Nr. 170-6516).

3.1.4 Sonstige Materialien

Rezepturen für Zellkultur-Medien und Reagenzien werden im Anhang unter 8.2 aufgeführt. Zusätzlich verwendete Chemikalien sind in 8.3 aufgeführt. In 8.4 sind sämtliche technischen Hilfsmittel unter Angabe des Herstellers zusammengefaßt. Die verwendeten Verbrauchsmittel sind unter 8.5 zu finden.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturtechnik

3.2.1.1 Zellkultivierung und Subkultivierung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Plastikzellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² oder 75 cm². In Abhängigkeit von den Wachstumseigenschaften der verschiedenen Linien variierte die Einsaatkonzentration der Zellen. Die mit dem Medium in die Zellkulturflasche gebrachten Zellen befanden sich in einem geschlossenen System, d. h. ohne daß ein Gasaustausch zwischen Zellkulturflascheninnenraum und Umgebung stattfinden konnte, und wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Täglich wurde die sich entwickelnde Zellkultur makroskopisch und mikroskopisch kontrolliert, wobei die Mediumfarbe (pH-Wert), eventuelle Trübungen des Mediums (Kontaminationen), der Anteil abgestorbener oder nicht angehefteter Zellen im Medium und der Zellrasen selbst beurteilt und protokolliert wurden. Sobald sich ein konfluenter einschichtiger Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen nach Trypsinierung in einem von den Wachstumseigenschaften der Zelllinie abhängigen Verhältnis geteilt und in neue Kulturgefäße umgesetzt. Dazu wurde das Medium abpipettiert und der Zellrasen mit ATV (*adjusted trypsin-versen*)-Lösung ca. 30 Sekunden gründlich gewaschen. Nach dem Entfernen der Waschlösung wurde 0,5 ml bzw. 1,5 ml ATV auf den Zellrasen gegeben und bei 37 °C ca. 15 min inkubiert, bis sich der Zellrasen von der Unterlage abgelöst hatte. Unter Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurden die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und so eine homogene Zellsuspension hergestellt.

Die Zellzahl wurde durch Zählung mit der Zählkammer bestimmt, die entsprechende Menge Zellsuspension in die neuen Zellkulturflaschen pipettiert und mit 6 ml bzw. 20 ml frischem Kulturmedium aufgefüllt. Bei Zellkulturröhrchen, Makro- und Mikrotiterplatten wurde die ermittelte Menge Zellsuspension zunächst auf das benötigte Gesamtvolumen mit Kulturmedium aufgefüllt. Von dieser Suspension wurde anschließend 1 ml für ein

Zellkulturröhrchen oder eine Kavität einer Makrotiterplatte bzw. 100 µl pro Kavität einer Mikrotiterplatte verwendet.

3.2.1.2 Zellkonservierung und spätere Anzucht

Zur Vorratsbildung wurde der Zellrasen abtrypsiniert und in Einfriermedium (Medium mit 10 % FKS und 7,5 % DMSO) resuspendiert, so daß die Zellkonzentration 2 bis 4×10^6 /ml betrug. Der Zusatz von DMSO diente als Gefrierschutz. DMSO verhindert beim Frieren und Tauen eine Zerstörung der Zellstrukturen nach Kristallbildung in den Zellen. Anschließend wurden 1-ml-Portionen in Kryoröhrchen überführt und bei einer Abkühlrate von 1 °C/min im Isopropylalkoholbad unter Zugabe von Trockeneis eingefroren, bis eine Temperatur von -40° C erreicht war. Danach konnten sie bei -80 °C gelagert werden.

Zur Wiederverwendung wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen sofort im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, im Zehnfachen ihres Volumens in Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Wenn sich die Zellen nach 3 bis 5 h am Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt, um das beim Einfrieren zugesetzte toxische DMSO zu entfernen.

3.2.1.3 Charakterisierung der Zellkulturen mittels Zytokeratinfärbung

In den verschiedenen Zellkulturen waren sowohl epitheloid als auch fibroblastoid wachsende Zellen zu erkennen. Eine Differenzierung, die über die morphologische Begutachtung hinausging, wurde durch eine Zytokeratinfärbung vorgenommen. Zytokeratine sind als Tonofilamente (Bausteine: Präkeratinpolypeptide) in Epithelzellen ausgebildet, wo sie als Filamentbündel in die Haftkomplexe des Plasmalems einstrahlen, und werden daher als Markerproteine für Epithelzellen angesehen.

Um den Anteil an Epithelzellen in der Kultur bestimmen zu können, wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) in einer Dichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen in 6 ml

Zellkulturmedium ausgesät. Die Anzucht der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (engl. *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Kochsalzlösung) gewaschen. Die Reste der Waschlösung wurden vollständig mit einer Pasteurpipette entfernt und die Zellen 3 h bei 80 °C hitzefixiert. Nach der Fixation wurden die Zellen mit dem polyklonalen anti-Keratin-Antikörper (MNF 116) gefärbt. Der Ak wurde in einer Verdünnung von 1:10 mit PBS (mit 1 % Tween 20) auf die fixierte Zellkultur gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Ak durch dreimaliges Waschen mit PBS (mit 1 % Tween 20) und einmaliges Waschen mit PBS entfernt. Danach erfolgte ein Inkubationsschritt mit dem Konjugat Ziege-anti-Maus-Peroxidase, das in einer Verdünnung mit PBS (mit 1 % Tween 20) von 1:100 eingesetzt wurde. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und gründlicher Entfernung der ungebundenen Ak (s.o.), wurde die Färbung mit der Zugabe des Substrates (siehe Punkt 3.2.2.6) abgeschlossen.

3.2.2 Virusisolierung, Virusvermehrung und Virusnachweis

3.2.2.1 Virusvermehrung und -ernte

Virus wurde zum einen vermehrt, um einen Vorrat von Virusisolaten und -stämmen anzulegen, und zum anderen war die Virusvermehrung und -ernte in modifizierter Weise Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Zum Zweck der Vorratsbildung wurde die Referenzzelllinie PK(15)A mit einer Zelldichte von $1,7 \times 10^6$ Zellen pro 20 ml Kulturmedium 24 h vor der Virusinokulation in Zellkulturflaschen (75 cm²) eingesät und bei 37 °C inkubiert. Zur Infektion wurde das Medium entfernt und der nahezu konfluente Zellrasen mit 500 µl Virussuspension inokuliert. Um eine gleichmäßige Virusadsorption zu ermöglichen, wurden die Kulturen bei 37 °C alle 15 min geschwenkt und erst nach 1 bis 2 Stunden frisches Medium aufgefüllt. Die Zellkulturen wurden täglich

mikroskopisch kontrolliert und nach 72 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren, um das zellgebundene Virus durch Zerstörung der Zellmembranen freizusetzen.

Zur Virusernte wurde das gefrorene Zell-Virus-Gemisch durch leichtes Schwenken der Flasche im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad zügig aufgetaut und, bevor eine Erwärmung auftreten konnte, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 min mit 800 xg zentrifugiert, um die Zellbestandteile vom virushaltigen Zellkulturüberstand abzutrennen. Der Überstand wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Portionen von 1 ml bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Untersuchung der Virusreplikation in verschiedenen Zelllinien wurde, um auch geringe Unterschiede in der Virusreplikation erfassen zu können, eine niedrige MOI von ca. 10^{-4} gewählt. Die Inokulationsdosis war konstant $100\text{ KID}_{50}/100\text{ }\mu\text{l}$. Die Ausgangszellzahlen variierten bei den verschiedenen Zelllinien von 0,5 bis 1×10^6 . Die näherungsweise kalkulierte MOI ergab sich aus dem Verhältnis von Inokulationsdosis und Zellzahl.

Der Inokulationsmodus war simultan, d. h. die 10 ml Zellsuspension und die $100\text{ }\mu\text{l}$ Virussuspension wurden zur selben Zeit in die Zellkulturflasche (25 cm^2) verbracht. Für jedes Virus (EYSTRUP und C-STAMM) mit jeder Zelllinie wurde ein Doppelansatz durchgeführt. Nach 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt, um nicht adsorbiertes Virus aus dem Inokulum zu entfernen.

Nach 48 h und 120 h wurden beide Virusfraktionen einer infizierten Zellkultur, das freie Virus im Zellkulturüberstand und das zellgebundene Virus, getrennt von einander geerntet. Dabei wurde ein früherer und ein späterer Zeitpunkt als die sonst in der Diagnostik üblichen 72 h Kultivierungsdauer gewählt, damit auch der zeitliche Einfluß auf die Entwicklung der Virustiter untersucht werden konnte. Um das freie Virus zu gewinnen, wurde das Medium vom Zellrasen abgenommen, bei 194 xg zentrifugiert und in Aliquots von 1 ml bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Titration eingefroren. Zur Freisetzung des zellgebundenen Virus wurde auf den Zellrasen eine definierte Menge frisches Medium (2 ml) gegeben und die Kulturflasche komplett bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nachdem die Kulturflasche bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ zügig aufgetaut worden war, wurde dieser Gefrier-Tau-Zyklus noch einmal wiederholt. Vor dem Konservieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das in 2 ml aufgenommene Virus bei 800 xg zentrifugiert.

3.2.2.2 *Viruspassage*

Zur Empfänglichkeitsuntersuchung verschiedener Zelllinien wurden die Virusstämme C-STAMM und EYSTRUP über drei Passagen kultiviert. Die 1. Viruspassage wurde wie oben beschrieben mit einer niedrigen MOI begonnen. In der 2. und 3. Viruspassage wurde zur Infektion der Zellen jeweils 100 µl Zellkulturüberstand 120 h p. i. der vorhergehenden Viruspassage genommen.

3.2.2.3 *Virusisolierung aus Organmaterial*

Zum KSPV-Nachweis im toten Tier wird das Virus aus Organmaterial isoliert. Dazu werden in erster Linie die Nieren, die Milz, die Tonsille, das Ileum oder die Lymphknoten verwendet, wobei grundsätzlich auch andere Organe in gleicher Weise untersucht werden können. Durch mechanische Zerkleinerung des Gewebes wird das sich in den Zellen befindliche Virus in das während des Vorganges verwendete Medium freigesetzt.

In der vorliegenden Arbeit diente Nierengewebe als Ausgangsmaterial. Die zu untersuchende Organprobe besaß eine Größe von ca. 1 cm³. Daraus wurde eine 10 %ige Organsuspension hergestellt, indem die Probe mit *Earle's Salzlösung mit Lactalbumin* (ELA)-Kulturmedium unter Zusatz von 1 % Antibiotikasuspension (Penicillin/Streptomycin) im Mörser zerrieben wurde. Anschließend wurde die Suspension in ein Zentrifugenglas gegeben, 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen und dann bei 1215 xg für 15 min zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Auswahl von Zelllinien (Tabelle 7) vergleichend untersucht.

3.2.2.4 Weiterführende Untersuchungen

Für die Untersuchungen unter Diagnostikbedingungen (undefinierte MOI, toxisches Untersuchungsmaterial, verschiedene Zellkultursysteme) wurden vier Zelllinien, in denen beide Referenzvirusstämme hohe Titer erreicht hatten, sowie die Referenzzelllinien ausgewählt (Tabelle 5). Von den hier verwendeten Feldisolaten (Tabellen 2 und 3) waren nur noch geringe Volumina vorhanden. Deshalb wurde das Zellkultursystem von Zellkulturflaschen (Inokulationsvolumen 500 µl) auf Zellkulturröhrchen (Inokulationsvolumen 200 µl) umgestellt. Eine weitere Änderung betraf die Inokulationsmethode, da die Virusisolierung aus Organhomogenaten nur erfolgen kann, wenn das Material nach der Inkubationszeit vom Zellrasen entfernt wird, um toxische Einflüsse so gering wie möglich zu halten. Aus diesem Grunde wurde die Infektion hier sukzessiv durchgeführt. Vor der Umstellung der Methode mußte der Einfluß von simultaner und sukzessiver Infektion auf die Virusreplikation untersucht werden. Dazu wurde ein 24 h alter, halb konfluenten Zellrasen mit 200 µl des KSPV-Stamm C-STAMM beimpft und 1,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit PBSM (mit 1 %Antibiotika; Penicillin/Streptomycin) zwei Mal gewaschen und 1 ml Kulturmedium dazugegeben. Zum Vergleich wurden Kulturröhrchen mit der selben Inokulationsdosis und Ausgangszellzahl simultan infiziert. Nach einer Inkubation von 72 h bzw. 120 h bei 37 °C im Brutschrank wurde das zellgebundene Virus durch zwei Gefrier-Tau-Zyklen freigesetzt und anschließend bei 800 xg zentrifugiert. Die Titration des Virus erfolgte auf der Referenzzelllinie Niere/PK(15)A.

Unter Anwendung dieser Methode wurden 200 µl Virusisolat (siehe Tabellen 2 und 3) oder 200 µl Organhomogenat (siehe Tabelle 4) auf einen 24 h alten, halb konfluenten Zellrasen gebracht und nach der o. g. Verfahrensweise behandelt.

Tabelle 5: Zelllinien, die unter Diagnostikbedingungen untersucht wurden.

Zelllinien	Umsatzverhältnis	Zellzahl (x10⁴) im Kulturröhrchen
Niere/5-1*	1:7	7,5
Niere/8*	1:7	7,5
HODEN/278*	1:3	10
STE***	1:3	10
Niere/PK(15)A**	1:7	7,5
Niere/PK(15)A/ad*	1:7	7,5
Haut/388*	1:3	10

* Nährmedium mit 10 % FKS

** Nährmedium mit 5 % FKS

*** Nährmedium mit 10 % Pferdeserum

3.2.2.5 Virustitration

Um den Titer einer Virussuspension zu bestimmen, wurde eine End-Punkt-Verdünnungsmethode durchgeführt. Dazu wurde die zu titrierende Virussuspension in Edulb-Medium in \log_{10} -Stufen von 10^{-1} bis 10^{-8} verdünnt und aus jeder dieser Verdünnungsstufen wurden 4 Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit je 100 μ l Virussuspension gefüllt. Anschließend wurde jede Kavität mit 50 μ l einer auf 354.000 Zellen pro ml Edulb-Medium (unter Zusatz von 5 % FKS) eingestellten Zellsuspension beschickt. Die Kulturen wurden bei 37 °C für 72 h inkubiert und das Virusantigen danach mit Hilfe der Direkten Immunfärbung (DIF) nachgewiesen (s. u.).

Die Berechnung des Titers (50 % kulturinfektiöse Dosis, KID_{50}) erfolgte nach der Formel von KAERBER (1931):

$$\log KID_{50} = L_{1,0} - L_{int} (S-0,5)$$

Dabei sind

$L_{1,0}$ = Logarithmus der höchsten Verdünnung mit der Reaktionsrate (R) 1,0

L_{int} = Logarithmus des Intervalles (int)

S = Summe der Reaktionsraten, begonnen bei der letzten Reaktionsrate, die 1,0 beträgt.

3.2.2.6 Direkte Immunfärbung

Die direkte Immunfärbung ermöglichte den Nachweis von Virusantigen in hitzefixierten Zellen mit Hilfe des Peroxidase-konjugierten mAK, BVD/C16, der pestiviruspezifisch ist.

Von dem sich in der Mikrotiterplatte befindenden Zellrasen wurde der Zellkulturüberstand mit der Vakuumpumpe abgesaugt. Danach wurde der Zellrasen einmal mit 1/3 PBS gewaschen und die Waschlösung anschließend gründlich durch Absaugen entfernt. Nach der Hitzefixation über 3 h bei 80 °C wurde der Zellrasen einmal zum Anfeuchten mit PBS mit 1 % Tween 20 gewaschen. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden mit dem

Peroxidasekonjugat des mAk BVD/C16 beschichtet. Dabei wurden 50 µl pro Kavität verwendet und auf eine vollständige Benetzung des Zellrasens geachtet. Das BVD/C16-PO-Konjugat wurde in Verdünnungen von 1:500 bis 1:900 mit PBS mit 1 % Tween 20 eingesetzt.

Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde der Zellrasen dreimal mit PBS (1 % Tween20) und einmal mit 1/3 PBS gewaschen.

Als Substrat der Peroxidase diente Wasserstoffperoxid, mit dem chromogenen Substrat 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC). Es wurde aus einer AEC-Dimethylformamid-Stammlösung und Natriumazetatpuffer frisch angesetzt. 50 µl dieser Substrat-Lösung wurden in jede Kavität auf den Zellrasen pipettiert. Die Umsetzung des Substrates führte zu einem roten Niederschlag im Bereich des Zytoplasmas der fixierten Zellen. Die Färbung wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach ca. 15 min war das Zytoplasma der infizierten Zellen deutlich gefärbt. Die Substrat-Lösung wurde abpipettiert und durch Waschen mit Aqua bidest. vollständig vom Zellrasen entfernt.

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Mikrotiterplatten galten die Kavitäten als KSPV positiv, bei denen das Zytoplasma mindestens einer Zelle rot gefärbt war, wobei der Zellkern jedoch ungefärbt sein mußte.

3.2.3 *Darstellung der Ergebnisse*

3.2.3.1 *Korrektur der titrierten Werte*

Sowohl für das *zellfreie Virus im Zellkulturüberstand (ZF)* als auch für das *zellgebundene Virus in der Zellfraktion (ZG)* wurden die Virustiter für ein Volumen von 100 µl nach KAERBER (1931) kalkuliert und anschließend auf ein Volumen von 1 ml umgerechnet. Dabei mußte das Volumenverhältnis von 1:5 zwischen den beiden Fraktionen berücksichtigt werden:

$$\text{ZF} [\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}] = \text{ZF} [\log_{10} \text{KID}_{50}/100 \mu\text{l}] + 1$$

$$\text{ZG} [\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}] = \text{ZG} [\log_{10} \text{KID}_{50}/100 \mu\text{l}] + 0,3$$

3.2.3.2 *Berechnung des Virusgehaltes der Gesamtkultur*

Aus der Summe von ZF und ZG ergibt sich der *Virusgehalt der Gesamtkultur (VG)* in einem Volumen von 2 ml:

$$\text{VG} [\text{KID}_{50}/2\text{ml}] = \text{ZF} [\text{KID}_{50}/\text{ml}] + \text{ZG} [\text{KID}_{50}/\text{ml}]$$

Die Berechnung des VG, bezogen auf 1 ml, bildete die Grundlage für die Beurteilung der unterschiedlichen Virusreplikation in den verschiedenen Zelllinien:

$$\text{VG} [\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}] = \text{VG} [\log_{10} \text{KID}_{50}/2\text{ml}] - 0,3$$

3.2.3.3 Ermittlung der Verteilungsverhältnisse von ZF und ZG in der Zellkultur

$$\text{Verhältnis von ZF und ZG} = \log_{10}(\text{Durchschnitt ZF}) - \log_{10}(\text{Durchschnitt ZG})$$

Ein positiver Wert bedeutete, daß in der Zellkultur mehr Virus im Zellkulturüberstand vorhanden war. Wenn der Anteil des zellgebundenen Virus größer war, war der Wert negativ (MITTELHOLZER et al., 2000).

3.2.3.4 Berechnung der mittleren Standardabweichung

Die mittlere Standardabweichung wurde aus dem arithmetischen Mittel der Standardabweichungen berechnet, da die einzelnen Streuungen sehr ungenau sind (BEYERBACH, pers. Mitteilung).

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Zelltyps der verwendeten Zelllinien

Die Differenzierung zwischen Epithelzellen und fibroblastoiden Zellen in den Zellkulturen wurde durch eine Färbung der Zytokeratine, die für Epithelzellen spezifisch sind, vorgenommen. Um festzustellen, ob die einzelnen Zelllinien aus einer einheitlichen Zellpopulation bestanden, wurde eine indirekte Färbung mit einem spezifischen polyklonalen Ak, der gegen die Zytokeratine 5, 6, 8, 17 und wahrscheinlich auch 19 gerichtet war (DAKO Hamburg, Best.-Nr.: M 0821), durchgeführt (Tabelle 6). Morphologisch inhomogen erscheinende Zellkulturen wie die Zelllinien HODEN/278, NABELVENENENDOTHEL/245, EILEITER/270 und HAUT/388 konnten als homogen charakterisiert werden, da alle Zellen positiv reagierten. Die Zelllinien GEHIRN/565 und VOLLEMBRYO/139 dagegen, die lichtmikroskopisch einheitlich fibroblastoid erschienen, stellten sich in der Zytokeratinfärbung als ein Zellgemisch, aus positiven und negativen Zellen, dar.

Tabelle 6: Morphologie der verwendeten Zelllinien und Charakterisierung nach Zytokeratinfärbung.

Zelllinie	Zelltyp Morphologisch	Zytokeratin- färbung	Zelltyp nach Zytokeratinfärbung
NIERE/PK(15)A	epitheloid	+++	Epithelzellen
NIERE/5-1	epitheloid	+++	Epithelzellen
NIERE/8	epitheloid	+++	Epithelzellen
HODEN/STE	epitheloid	+++	Epithelzellen
HODEN/170	epitheloid	+++	Epithelzellen
HODEN/278	vorw. epitheloid	+++	Epithelzellen
LUNGE/113	fibroblastoid	---	fibroblastoide Zellen
LUNGE/379	epitheloid	+++	Epithelzellen
GEHIRN/378	fibroblastoid	---	fibroblastoiden Zellen
GEHIRN/565	fibroblastoid	---+	vorw. fibroblastoide Z.
VOLLEMBRYO/139	fibroblastoid	-++	Zellgemisch
THYMUS/169	fibroblastoid	---	fibroblastoide Zellen
NABELVENEN- ENDOTHEL/245	epitheloid/ polymorph	---	fibroblastoide Zellen
EILEITER/270	epitheloid/ polymorph	---	fibroblastoide Zellen
HAUT/388	fibroblastoid/ polymorph	---	fibroblastoide Zellen
NASENSCHLEIM- HAUT/541	fibroblastoid/ polymorph	---+	vorw. fibroblastoide Z.

+++ Alle Zellen erscheinen zytokeratin-positiv.

--- Alle Zellen erscheinen zytokeratin-negativ.

-++ Es sind einzelne zytokeratin-positive Zellinseln in der Zellkultur vorhanden.

---+ Es sind vereinzelt zytokeratin-positive Zellen in der Zellkultur vorhanden.

4.2 Wachstumscharakteristika der Zelllinien

4.2.1 Wachstumskurven der uninfizierten Referenzzelllinien

In einem zweimal wiederholten Versuch wurden die Wachstumsraten für die Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A, HODEN/STE und NIERE/5-1 ermittelt, indem in Kulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm^2 $0,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät wurden. Nach jeweils 24 h wurde über einen Zeitraum von 120 h die Gesamtzahl der Zellen bestimmt. 96 h nach Beginn des Versuches nahm die Teilungsrate der Kulturen ab und der Übergang von der logarithmischen Wachstumsphase in die Plateauphase begann. Alle drei Referenzzelllinien zeigten vergleichbare Wachstumseigenschaften, unterschieden sich aber in den erreichten Zelldichten, die zwischen 5×10^6 und $6,5 \times 10^6$ Zellen/Zellkulturfläche (25 cm^2) lagen (Abbildung 1).

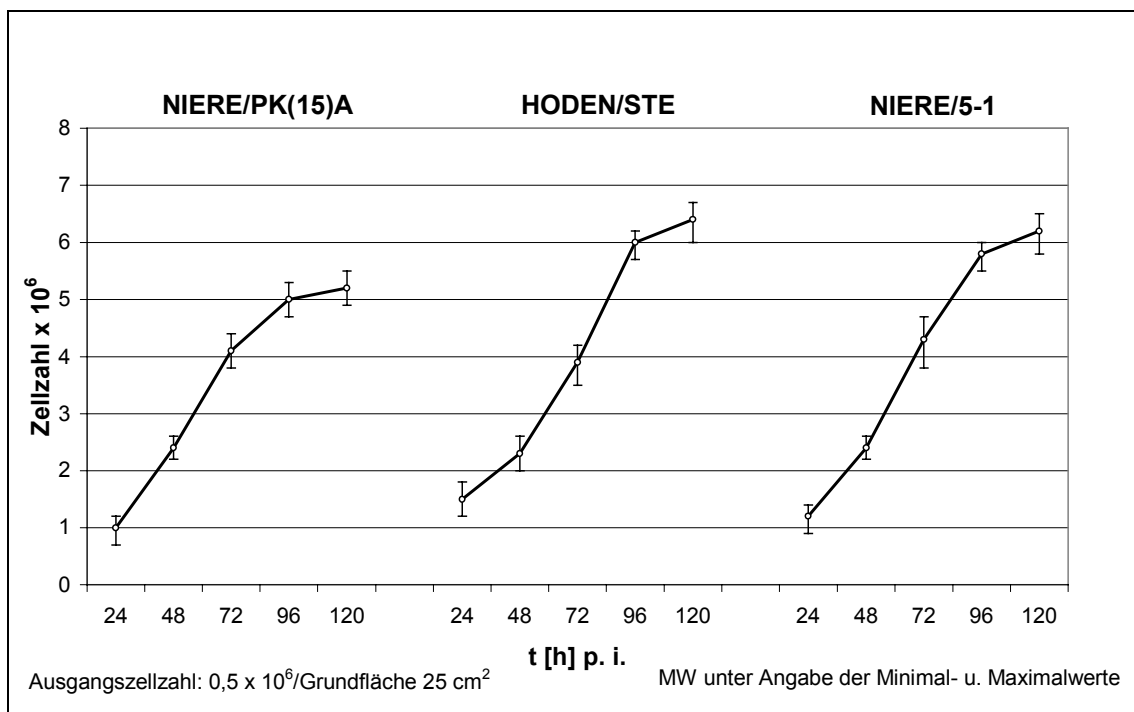


Abbildung 1: Wachstumskurven der Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A, HODEN/STE und NIERE/5-1.

4.3 Untersuchung der Virusreplikation

4.3.1 Virusvermehrungskurven in den Referenzzelllinien

Die Virusreplikation anhand der Zu- oder Abnahme der Virustiter der Referenzstämme C-STAMM und EYSTRUP wurde nach Inokulation der Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A, HODEN/STE und NIERE/5-1 über 120 h und drei Viruspassagen in 24-h-Intervallen ermittelt. Dazu wurde in einem Doppelansatz jede Zelllinie mit jedem Referenzstamm mit einer Inokulationsdosis von 10^2 KID₅₀/100µl simultan infiziert. Für die 2. und 3. Viruspassage wurden 100 µl Zellkulturüberstand der vorangegangenen Viruspassage verwendet.

In Abbildung 2 ist der Verlauf der Virustiter des Virusstammes EYSTRUP dargestellt. In der 1. Viruspassage wurde in den Nierenzelllinien 120 h p. i. der maximale Virustiter erreicht. Dagegen war dieser in der Hodenzelllinie bereits 96 h p. i. erlangt worden und nahm danach geringfügig ab. In der sich anschließenden 2. Viruspassage wurde, bedingt durch die erhöhte Inokulationsdosis, der maximale Virustiter mit allen drei Zelllinien 48 h p. i. erzielt. Anschließend blieben die Virustiter gleich bzw. fielen wieder ab. Ähnlich verlief die Replikationskinetik in der 3. Viruspassage (nicht gezeigt).

Während die Unterschiede in der Virusreplikation für den Virusstamm EYSTRUP in den drei Zelllinien gering ausfielen, waren diese mit dem C-STAMM deutlicher ausgeprägt (Abbildung 3). In der Referenzzelllinie NIERE/PK(15)A nahmen die Virustiter mit zunehmender Viruspassage ab und waren in der 3. Viruspassage unter der Nachweisgrenze. Eine entgegengesetzte Tendenz war in der Zelllinie HODEN/STE zu finden. Nach stetiger Virustiterzunahme über die drei Viruspassagen wurde erst in der 3. Viruspassage 96 h p. i. der maximale Virustiter erreicht. Dieser wurde mit der Zelllinie NIERE/5-1 schon in der 1. Viruspassage 120 h p. i. erzielt. In den darauffolgenden Viruspassagen war der Kurvenverlauf flacher und ging in der 3. Viruspassage 48 h p. i. nach Erreichen des maximalen Virustiters in ein Plateau über.

Aufgrund dieser Viruskinetiken wurden alle weiteren Untersuchungen sowohl über die Dauer der Inkubation von 120 h als auch über drei Viruspassagen durchgeführt.

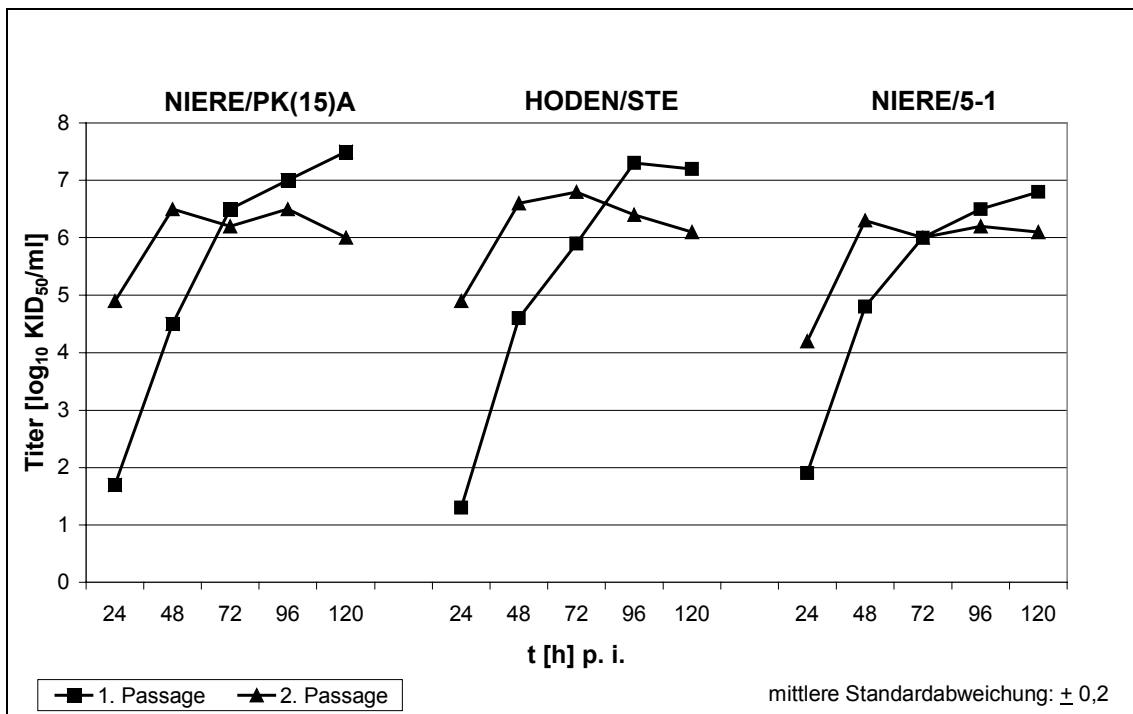


Abbildung 2: Virustiterverlauf über 120 h der mit dem Virusstamm EYSTRUP infizierten Referenzzelllinien.

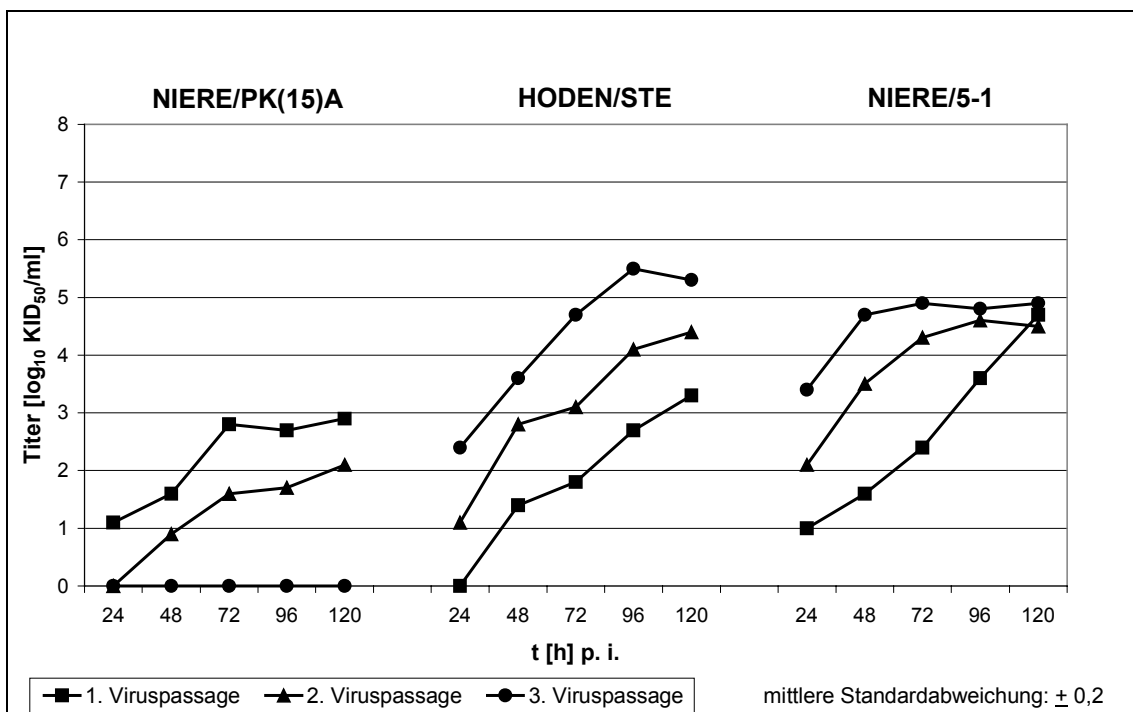


Abbildung 3: Virustiterverlauf über 120 h der mit dem Virusstamm C-STAMM infizierten Referenzzelllinien.

4.3.2 Untersuchung der Virusreplikation in anderen Zelllinien

Neben den Referenzzelllinien wurde die Replikation der beiden KSPV-Stämme in 13 anderen permanenten porzinen Zelllinien (Tabelle 7) untersucht.

Die Virustiter wurden als Summe der zellfreien und der zellgebundenen Virusfraktion ermittelt (Tabellen 7 bis 10). Dazu wurden alle Zelllinien mit dem virulenten Virusstamm EYSTRUP und dem avirulenten Virusstamm C-STAMM infiziert. Nach 48 h bzw. 120 h und über drei Viruspassagen wurden die Virustiter zunächst im Zellkulturüberstand und in der Zellfraktion bestimmt.

Tabelle 7: Virustiter [\log_{10} KID₅₀/ml], die 48 h nach Infektion der 13 permanenten porzinen Zelllinien und der Referenzzelllinien mit dem Virusstamm EYSTRUP erreicht wurden.

Lfd. Nr./ Gruppe	Zelllinie	Virustiter [\log_{10} KID ₅₀ /ml]		
		1. Passage EYSTRUP	2. Passage EYSTRUP	3. Passage EYSTRUP
1/1	NIERE/8	4,2	6,7	6,4
2/1	NIERE/5-1	4,8	6,3	6,4
3/1	HODEN/STE	4,6	6,6	6,8
4/1	HODEN/278	5,3	6,3	6,2
5/1	HAUT/388	2,5	5,6	5,4
6/2	NIERE/PK(15)A	4,5	6,5	6,6
7/2	NABELVENENEND./245	3,3	5,4	5,9
8/2	LUNGE/113	3,7	4,0	5,7
9/2	GEHIRN/565	3,6	4,7	5,4
10/2	GEHIRN/378	4,2	5,7	6,2
11/2	VOLLEMBRYO/139	1,8	5,4	5,8
12/2	THYMUS/169	3,4	4,7	5,1
13/2	EILEITER/270	4,4	6,0	6,4
14/2	NASENSCHLEIMHAUT/541	4,0	6,4	6,3
15/2	LUNGE/379	0	0	0
16/2	HODEN/170	0	0	0

Fett: maximal erreichte Virustiter 48 h p. i.

Mittlere Standardabweichung: $\pm 0,2$

Tabelle 8: Virustiter [\log_{10} KID₅₀/ml], die 120 h nach Infektion der 13 permanenten porzinen Zelllinien und der Referenzzelllinien mit dem Virusstamm EYSTRUP erreicht wurden.

Lfd. Nr./ Gruppe	Zelllinie	Virustiter [\log_{10} KID ₅₀ /ml]		
		1. Passage EYSTRUP	2. Passage EYSTRUP	3. Passage EYSTRUP
1/1	NIERE/8	7,2	6,8	6,7
2/1	NIERE/5-1	6,8	6,1	6,3
3/1	HODEN/STE	7,2	6,1	6,6
4/1	HODEN/278	6,9	6,1	6,5
5/1	HAUT/388	6,9	6,7	6,4
6/2	NIERE/PK(15)A	7,5	6,0	6,3
7/2	NABELVENENEND./245	6,2	6,7	5,9
8/2	LUNGE/113	6,4	6,5	5,9
9/2	GEHIRN/565	5,5	6,8	7,0
10/2	GEHIRN/378	6,6	6,1	6,4
11/2	VOLLEMBRYO/139	6,7	7,1	6,4
12/2	THYMUS/169	6,5	6,4	6,0
13/2	EILEITER/270	6,6	6,4	6,5
14/2	NASENSCHLEIMHAUT/541	6,4	6,3	6,1
15/2	LUNGE/379	0	0	0
16/2	HODEN/170	0	0	0

Fett: maximal erreichte Virustiter 120 h p. i.

Mittlere Standardabweichung: $\pm 0,2$

Tabelle 9: Virustiter [\log_{10} KID₅₀/ml], die 48 h nach Infektion der 13 permanenten porzinen Zelllinien und der Referenzzelllinien mit dem Virusstamm C-STAMM erreicht wurden.

Lfd. Nr./ Gruppe	Zelllinie	Virustiter [\log_{10} KID ₅₀ /ml]		
		1. Passage C-STAMM	2. Passage C-STAMM	3. Passage C-STAMM
1/1	NIERE/8	2,5	4,0	4,3
2/1	NIERE/5-1	1,6	3,5	4,7
3/1	HODEN/STE	1,4	2,8	3,6
4/1	HODEN/278	1,9	3,1	3,2
5/1	HAUT/388	0,4	1,9	2,8
6/2	NIERE/PK(15)A	1,6	0,9	0
7/2	NABELVENENEND./245	1,1	1,2	1,4
8/2	LUNGE/113	0	1,4	2,1
9/2	GEHIRN/565	1,4	0	0
10/2	GEHIRN/378	1,8	0,4	1,2
11/2	VOLLEMBRYO/139	0	0	0
12/2	THYMUS/169	0,4	0	0
13/2	EILEITER/270	0	0,4	0,4
14/2	NASENSCHLEIMHAUT/541	0	0	0
15/2	LUNGE/379	0,5	1,8	2,7
16/2	HODEN/170	0	0	0

Fett: maximal erreichte Virustiter 48 h p. i.

Mittlere Standardabweichung: $\pm 0,2$

Tabelle 10: Virustiter [\log_{10} KID₅₀/ml], die 120 h nach Infektion der 13 permanenten porzinen Zelllinien und der Referenzzelllinien mit dem Virusstamm C-STAMM erreicht wurden.

Lfd. Nr./ Gruppe	Zelllinie	Virustiter [\log_{10} KID ₅₀ /ml]		
		1. Passage C-STAMM	2. Passage C-STAMM	3. Passage C-STAMM
1/1	NIERE/8	4,8	4,6	4,7
2/1	NIERE/5-1	4,7	4,5	4,9
3/1	HODEN/STE	3,3	4,4	5,3
4/1	HODEN/278	5,2	5,0	4,7
5/1	HAUT/388	4,3	4,4	5,3
6/2	NIERE/PK(15)A	2,9	2,1	0
7/2	NABELVENENEND./245	1,8	1,1	1,6
8/2	LUNGE/113	2,7	3,1	3,8
9/2	GEHIRN/565	0	0	0
10/2	GEHIRN/378	2,9	0,9	1,5
11/2	VOLLEMBRYO/139	2,7	1,1	0
12/2	THYMUS/169	2,3	0	0
13/2	EILEITER/270	2,7	3,0	3,1
14/2	NASENSCHLEIMHAUT/541	0	0	0
15/2	LUNGE/379	4,2	3,7	0
16/2	HODEN/170	0	0	0

Fett: maximal erreichte Virustiter 120 h p. i.

Mittlere Standardabweichung: $\pm 0,2$

Hinsichtlich der erreichten Virustiter lassen sich die Zelllinien in zwei große Gruppen einteilen. Die erste Gruppe schließt die Zelllinien ein, in der beide Referenzstämme gut oder sehr gut replizierten. In der zweiten Gruppe war die Replikationsrate für mindestens einen Virusstamm deutlich geringer als in der ersten Gruppe.

Der Virusstamm EYSTRUP (Tabellen 7 und 8) vermehrte sich in den untersuchten Zelllinien vergleichbar gut und zeigte nur in zwei Zelllinien, der LUNGE/379 und dem HODEN/170, auch nach drei Viruspassagen und 120 h p. i. keine Virusreplikation. Bei der Wiederholung des Versuches konnte für die Zelllinie LUNGE/379 das Ergebnis bestätigt werden, während in der Zelllinie HODEN/170 niedrige Titer erreicht wurden. In der 1. Viruspassage 120 h p. i. betrug der Virustiter $10^{2,4}$ KID₅₀/ml. In der darauffolgenden Viruspassage war der Virustiter zum selben Zeitpunkt auf 10^1 KID₅₀/ml gesunken. In der 3. Viruspassage konnte erneut kein Virus mehr nachgewiesen werden.

Der Virusstamm EYSTRUP erreichte 48 h p. i. (Tabelle 7) die höchsten Virustiter zu diesem Zeitpunkt p. i. erst in der 2. Viruspassage. Diese wurden nur in vier Zelllinien, der NIERE/8, dem HODEN/278, der HAUT/388 und der NASENSCHLEIMHAUT/541 erlangt und lagen zwischen $10^{5,6}$ KID₅₀/ml und $10^{6,7}$ KID₅₀/ml. In allen anderen Zelllinien wurden drei Viruspassagen benötigt, um Virustiter von $10^{5,1}$ KID₅₀/ml bis $10^{6,8}$ KID₅₀/ml zu erreichen.

Die höchsten, maximal erreichten Virustiter konnten erst 120 h p. i. in der 1. Viruspassage von zehn Zelllinien bzw. in der 2. Viruspassage von drei Zelllinien erzielt werden (Tabelle 8). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie GEHIRN/565, wo der maximale Virustiter erst in der 3. Viruspassage erreicht wurde. Alle Zelllinien, in denen beide KSPV-Stämme gut replizierten (Tabellen 7 bis 10; Gruppe 1), zeigten mit dem Virusstamm EYSTRUP infiziert, maximale Virustiter von $10^{6,8}$ KID₅₀/ml bzw. $10^{7,2}$ KID₅₀/ml in der 1. Viruspassage. Die maximalen Virustiter der übrigen Zelllinien lagen zu diesem Zeitpunkt p. i. zwischen $10^{6,4}$ KID₅₀/ml und $10^{7,5}$ KID₅₀/ml.

Parallel zum Virusstamm EYSTRUP wurde der Virusstamm C-STAMM untersucht, (Tabellen 9 und 10). Einer großen Gruppe von Zelllinien, in denen das Virus schlecht oder gar nicht replizierte (Gruppe 2), steht die Gruppe der Zelllinien, in der sich das Virus gut vermehrte (Gruppe 1), gegenüber.

In den Zelllinien der Gruppe 2 wurden 48 h p. i. Virustiter zwischen $10^{0,4}$ ID₅₀/ml und $10^{2,7}$ KID₅₀/ml erreicht. Dagegen stehen die Zelllinien der Gruppe 1, in denen zu diesem

Infektionszeitpunkt bereits Virustiter zwischen $10^{2,8}$ KID₅₀/ml und $10^{4,7}$ KID₅₀/ml erreicht wurden. Es wurden mit allen Zelllinien drei Viruspassagen benötigt, um 48 h p. i. hohe Virustiter zu erreichen (Tabelle 9).

In den Zelllinien VOLLEMBRYO/139, NASENSCHLEIMHAUT/541 und HODEN/170 konnte zu diesem Zeitpunkt bei allen drei Passagen noch keine Virusreplikation des Virusstammes C-STAMM nachgewiesen werden. In der 1. Viruspassage 48 h p. i. war dieses auch für die Zelllinien LUNGE/113 und EILEITER/270 noch nicht möglich, jedoch in der darauffolgenden Viruspassage war Virus nachweisbar. Erst 120 h p. i. konnte für die Zelllinie VOLLEMBRYO/139 der Nachweis für die Virusreplikation des Virusstammes C-STAMM geführt werden (Tabelle 10). Für die Zelllinien THYMUS/169 und GEHIRN/565 war nur in der 1. Viruspassage der Nachweis der Virusreplikation möglich.

120 h p. i. wurden in allen Zelllinien, in denen der Virusstamm C-STAMM replizierte, die maximalen Virustiter erreicht. Der Gruppe 1, deren Virustiter 120 h p. i. von $10^{4,8}$ KID₅₀/ml bis $10^{5,3}$ KID₅₀/ml reichten, steht die Gruppe 2 mit maximalen Virustitern von $10^{1,8}$ KID₅₀/ml bis $10^{4,2}$ KID₅₀/ml nach.

Der Virusstamm C-STAMM erreichte in der 1. Viruspassage 120 h p. i. in den Zelllinien NIERE/8 und HODEN/278 den maximalen Virustiter. Die Zelllinien NIERE/5-1, HODEN/STE und HAUT/388 wichen von den Ergebnissen, die mit dem Virusstamm EYSTRUP erhalten worden waren, ab. Es waren drei Viruspassagen erforderlich, um maximale Virustiter zu erzielen. Dabei ist die Zelllinie NIERE/5-1 von den anderen beiden Zelllinien abzugrenzen, da sich der mit ihr in der 1. Viruspassage erreichte maximale Virustiter nur um $0,2 \log_{10}$ von dem in der 3. Viruspassage erzielten, unterscheidet. Bei allen Zelllinien war zu beobachten, daß sich nach Erreichen des maximalen Virustiters die Virustiter in den darauffolgenden Passagen 120 h p. i. geringfügig verringerten. Vergleicht man die durchschnittlichen Virustiter, die mit den beiden Referenzstämmen erhalten wurden, so sind die Virustiter für den Virusstamm EYSTRUP ca. $2 \log_{10}$ KID₅₀/ml höher als die, die mit dem Virusstamm C-STAMM erhalten wurden. Dieses Verhältnis konnte auch 48 h p. i. gesehen werden.

Für weiterführende Untersuchungen wurde eine Auswahl von Zelllinien anhand der Replikationsfähigkeit der beiden Virusstämme getroffen. Von den 16 untersuchten Zelllinien replizierte der Virusstamm EYSTRUP in 14 Zelllinien sehr gut, in der Zelllinie HODEN/170

sehr schlecht und in einer Zelllinie, der LUNGE/379, nicht (Tabelle 8). Dagegen replizierte der Virusstamm C-STAMM in mehr als 2/3 der infizierten Zelllinien schlecht oder gar nicht (Tabelle 10). Dabei sind die Übergänge fließend, was sich bei der Replikation des Virusstammes C-STAMM in der Zelllinie LUNGE/379 zeigte. In der 3. Viruspassage 120 h p. i. konnte keine Virusreplikation nachgewiesen werden. Bei der Wiederholung des Versuches schien die LUNGE/379 auch nach drei Viruspassagen nicht empfänglich für den Virusstamm C-STAMM zu sein.

In fünf Zelllinien, der NIERE/8, der NIERE/5-1, dem HODEN/STE, dem HODEN/278 und der HAUT/388, replizierte der Virusstamm C-STAMM gut und in Relation dazu der Virusstamm EYSTRUP sehr gut. Diese Zelllinien erfüllten die Kriterien der Gruppe 1 und wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt sowie einer näheren Betrachtung unterzogen (Tabellen 7 bis 10).

Unter den Nierenzellen wiesen die Zelllinien NIERE/8 und NIERE/5-1 die höchsten Virustiter für die beiden Virustämme auf. Während die Zelllinie NIERE/PK(15)A (Gruppe 2), mit dem Virusstamm EYSTRUP infiziert, noch vergleichbare Resultate zeigte, konnten für den Virusstamm C-STAMM nur geringe Virustiter nachgewiesen werden.

Die Hodenzelllinien HODEN/278 und HODEN/STE zeigten im Vergleich zu den beiden erstgenannten Nierenzelllinien ähnlich hohe Virustiter für den Virusstamm EYSTRUP. Die mit dem Virusstamm C-STAMM erreichten Virustiter waren nach 48 h p. i. niedriger als die der Nierenzelllinien aus der Gruppe 1. Die maximalen Virustiter 120 h p. i. waren vergleichbar hoch, wurden von der Zelllinie HODEN/STE aber erst in der 3. Passage erreicht. Im Gegensatz dazu wurde mit der Hodenzelllinie HODEN/278 der maximale Virustiter bereits in der 1. Viruspassage erzielt. Beachtlich ist, daß in der Hodenzelllinie HODEN/170 (Gruppe 2) erst in der Versuchswiederholung eine geringe Virusreplikation des Referenzstammes EYSTRUP nachweisbar war und der Virusstamm C-STAMM nicht replizierte.

In der HAUT/388 waren im Vergleich zu den Hoden- und Nierenzelllinien der Gruppe 1 die Virustiter 48 h p. i. geringfügig niedriger, was sich jedoch 120 h p. i. in bezug auf die maximalen Virustiter nicht bemerkbar machte.

Da die maximalen Virustiter erst 120 h p. i. erreicht wurden, wurden 120 h als Inkubationszeit für alle weiteren Untersuchungen beibehalten.

4.4 Eigenschaften der Zelllinien in verschiedenen Zellkultursystemen

Eine Auswahl geeigneter Zelllinien für weiterführende Untersuchungen wurde anhand von zwei Kriterien getroffen. Das Hauptkriterium waren die maximal erreichten Titer der beiden Referenzvirusstämme (siehe 4.3). Darüber hinaus wurde überprüft, ob sich die ausgewählten Zelllinien für den Einsatz im PLA eignen. Die Zelllinien der Gruppe 1 ließen sich in Zellkulturflaschen, Zellkulturröhrchen, Makro- und Mikrotiterplatten kultivieren und der Zellrasen blieb auch nach Hitze-fixierung und Färbung vollständig erhalten. Dagegen hafteten die Zellen der Zelllinie HAUT/388 nur locker auf der Unterlage der Zellkulturgefäße. Dies führte dazu, daß der Zellrasen nach der Fixation und Färbung durch die Waschschrirte nur unvollständig erhalten blieb und somit für Diagnostikzwecke ungeeignet ist.

4.5 Einfluß der Virusinfektion auf die Zellproliferation

Um den Einfluß der Virusreplikation auf die Proliferation der Zellen zu ermitteln, wurden Wachstumskurven der nicht infizierten und infizierten Zellkulturen erstellt. Dazu wurden in der 1. Viruspassage die Kulturen in Kulturflaschen (Grundfläche 25 cm²) simultan mit einer durchschnittlichen MOI von 10⁻⁴ infiziert. Die Zellzahlen wurden 48 h und 120 h p. i. bestimmt und der Versuch wurde zweimal wiederholt (Tabelle 11). Abweichungen der infizierten Kultur von der Kontrolle wurden dann als signifikant angesehen, wenn sie größer als die mittlere Standardabweichung ($\pm 0,4$) waren. Bei zwei von fünf Zelllinien war die Wachstumsrate 120 h p. i. verringert. Diese Zelllinien, die NIERE/5-1 und der HODEN/STE zeigten, mit dem Virusstamm EYSTRUP infiziert, zu diesem Infektionszeitpunkt deutlich niedrigere Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle.

Tabelle 11: Zellzahlen der nicht infizierten und infizierten Kulturen 48 h und 120 h p. i. auf einer Grundfläche von 25 cm².

Zelllinie	Ausgangs- zellzahl x 10 ⁶	Zellzahl x 10 ⁶ /25 cm ²					
		Nicht infiziert		EYSTRUP		C-STAMM	
		48 h	120 h	48 h	120 h	48 h	120 h
NIERE/8	1,0	6,9	9,8	6,7	9,8	7,2	9,5
NIERE/5-1	0,5	2,4	6,2	2,1	5,2	2,1	6,1
HODEN/STE	0,5	2,3	6,4	2,3	5,7	2,2	6,0
HODEN/278	1,0	3,1	5,6	3,2	5,5	3,3	5,3
NIERE/PK(15)A	0,5	2,4	5,2	2,2	4,9	2,1	4,9

Mittlere Standardabweichung : $\pm 0,4$

Fett: Signifikante Abweichungen vom Mittelwert der Zellkontrolle

4.6 Umstellung des Zellkultursystems und der Inokulationsmethode

4.6.1 Einfluß der simultanen und sukzessiven Infektion auf die Virusreplikation

Für die weiterführenden Untersuchungen der Zelllinien aus der Gruppe 1 wurde die Inokulationsmethode von simultaner zu sukzessiver Infektion geändert. Dazu mußte vorher der Einfluß der Infektionsmethode auf die Virusreplikation untersucht werden, indem die Zellkulturen sowohl simultan als auch sukzessive mit dem Virusstamm C-STAMM infiziert wurden. Der Versuch wurde in einem Doppelansatz durchgeführt und zweimal wiederholt. Als Referenzzelllinie wurde die Zelllinie NIERE/PK(15)A untersucht. Es wurden dem Zellkulturmedium sowohl 5 % FKS als auch 10 % FKS (NIERE/PK(15)A/ad) zugesetzt. In Anlehnung an das Protokoll des EU-Referenzzentrums für KSP wurde 72 h p. i. der Virustiter der gesamten Zellkultur bestimmt. Eine weitere Virustiterbestimmung erfolgte 120 h p. i., da in vorhergehenden Versuchen gezeigt werden konnte, daß bis zu diesem Zeitpunkt eine Steigerung der Virustiter erfolgte.

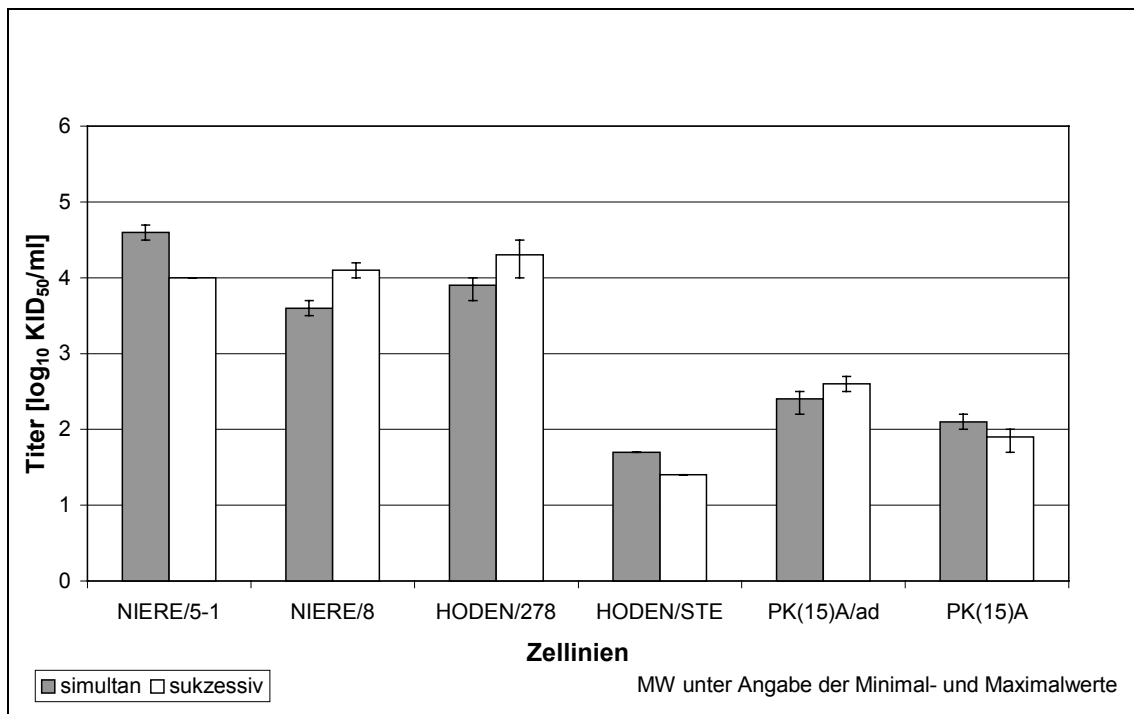


Abbildung 4: Vergleich der Virustiter 72 h p. i. nach simultaner und sukzessiver Infektion mit dem Virusstamm C-STAMM.

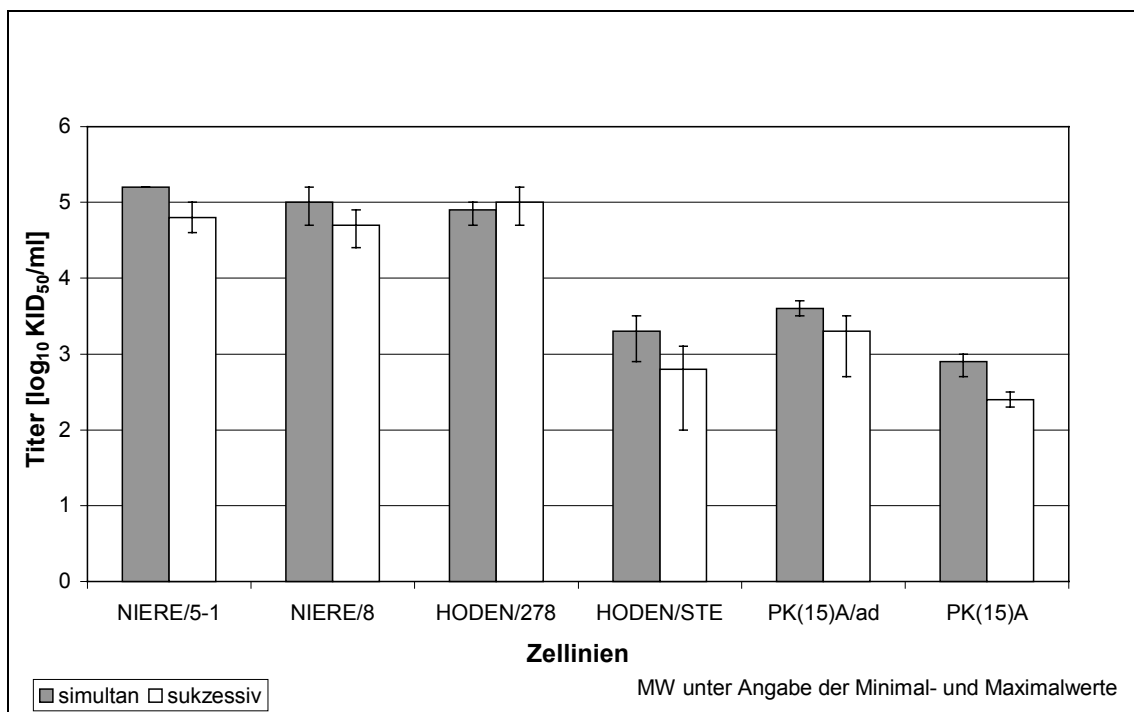


Abbildung 5: Vergleich der Virustiter 120 h p. i. nach simultaner und sukzessiver Infektion mit dem Virusstamm C-STAMM.

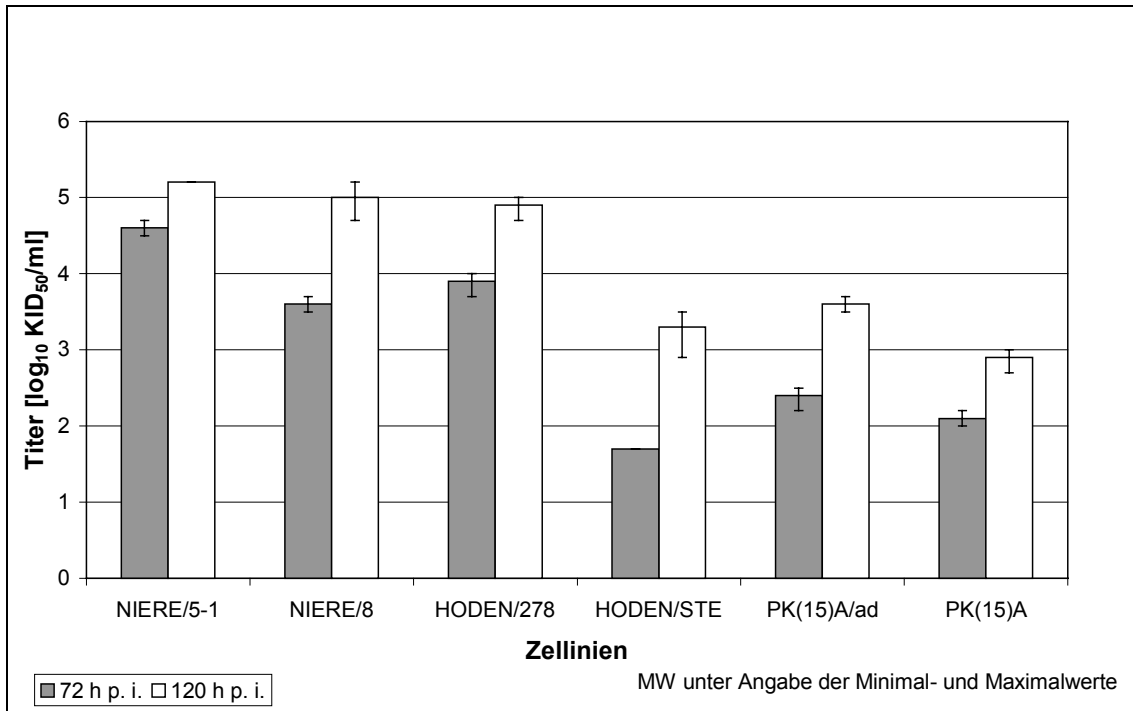


Abbildung 6: Vergleich der Virustiter 72 h p. i. und 120 h p. i. nach simultaner Infektion mit dem Virusstamm C-STAMM.

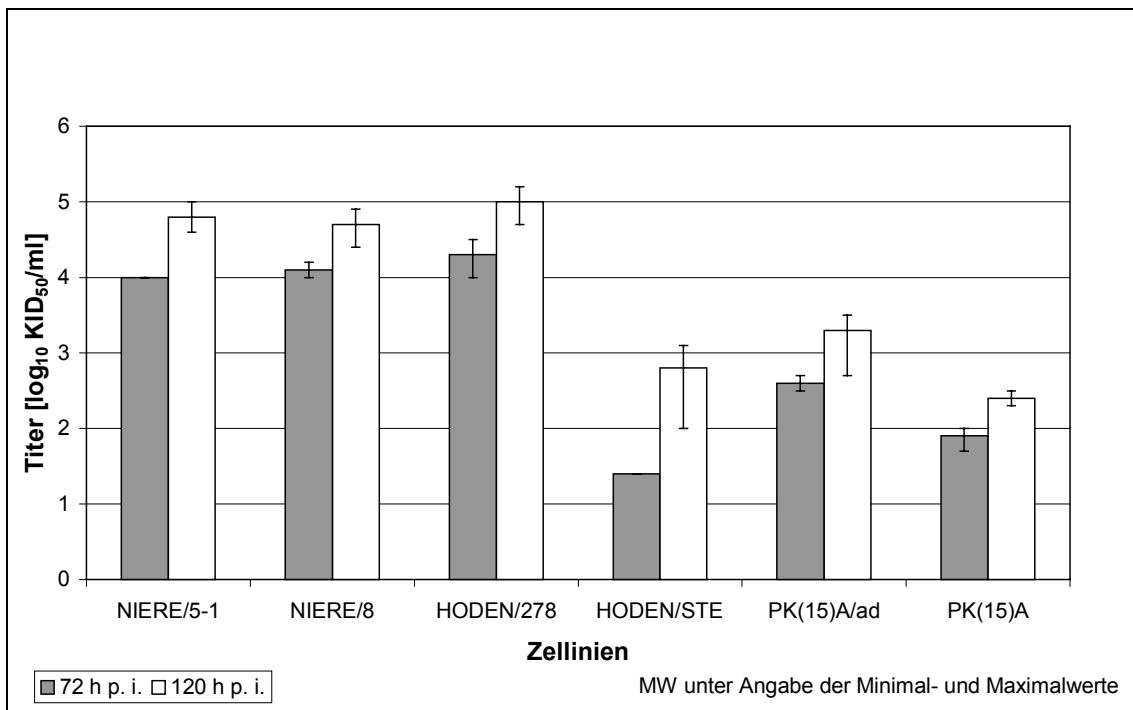


Abbildung 7: Vergleich der Virustiter 72 h p. i. und 120 h p. i. nach sukzessiver Infektion mit dem Virusstamm C-STAMM.

Die Ergebnisse des Vergleiches von simultaner und sukzessiver Infektion (Abbildungen 4 und 5) zeigten, daß kein signifikanter Unterschied in der Virusreplikation in Abhängigkeit vom Inokulationsmodus bestand. Nach 72 h p. i. betrug die Differenz 0,2 bis 0,6 \log_{10} KID₅₀/ml, nach 120 h p. i. war die Differenz vergleichbar niedrig, 0,1 bis 0,5 \log_{10} KID₅₀/ml. Dagegen ist sowohl bei simultaner als auch bei sukzessiver Infektion der Zellen eine Erhöhung der Virustiter von 72 h p. i. bis 120 h p. i. zu sehen (Abbildungen 6 und 7). In diesem Zeitraum betrug die Differenz bei simultaner Infektion 0,8 bis 1,4 \log_{10} KID₅₀/ml und bei sukzessiver Infektion 0,5 bis 1,3 \log_{10} KID₅₀/ml.

Im Vergleich der Zelllinien untereinander spiegelten sich die Verhältnisse voriger Versuche wider. Unabhängig von der Inokulationsweise und vom Infektionszeitpunkt wurden mit einigen Zelllinien hohe Titer des Virusstammes C-STAMM erreicht. Dazu zählten die Zelllinien NIERE/5-1 (Referenzzelllinie des Nationalen Referenzlabors für KSP), NIERE/8 und HODEN/278. In den Referenzzelllinien des EU-Referenzlabors für KSP, NIERE/PK(15)A und HODEN/STE wurden geringere Titer des Virusstammes C-STAMM erreicht. Mit der Zelllinie HODEN/STE waren auch in vorherigen Versuchen erst in der 3. Viruspassage maximale Virustiter erreicht worden. In der Zelllinie NIERE/PK(15)A replizierte der Virusstamm C-STAMM in der mit 10 % FKS kultivierten Kultur (NIERE/PK(15)A/ad) um durchschnittlich 0,7 \log_{10} besser.

4.7 Weiterführende Untersuchungen

4.7.1 Untersuchungen mit ausgewählten Isolaten

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Referenzstämmen EYSTRUP und C-STAMM hatten zu einer Auswahl von Zelllinien geführt, in denen sich beide Virusstämme gut replizierten. Ob diese Eigenschaft auf unter Standardbedingungen schwer zu kultivierende Feldisolate übertragbar ist, wurde in einem Doppelansatz mit KSPV-Isolaten überprüft, die sich in den Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A bzw. HODEN/STE schlecht (Virustiter $\leq 10^3$ KID₅₀/ml) oder nicht vermehrt hatten (Tabellen 12 und 13). Es wurden Zellkulturüberstände der 1. Viruspassage auf der NIERE/PK(15)A eingesetzt, da mit dieser Zelllinie die Erstanzucht versucht worden war und Originalmaterial nicht mehr vorhanden war. Die Menge des Ausgangsmaterials war begrenzt (benötigtes Volumen pro Ansatz 200 µl), so daß zum Teil nur eine Auswahl von Zelllinien infiziert werden konnte. Dabei wurde als Kontrolle immer die Referenzzelllinie NIERE/PK(15)A/ad mit untersucht. 120 h p. i. wurde das Virus nach einem zweimaligen Gefrier-Tau-Zyklus geerntet und der Virustiter bestimmt. Die Beurteilung der Zelllinien erfolgte nach zwei Kriterien, der Empfänglichkeit für die untersuchten Isolate und der bei der Replikation erreichten Höhe der Virustiter. In den Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 replizierten alle untersuchten Isolate (Tabellen 12 und 13). Die Zelllinie NIERE/8 dagegen erwies sich als sehr selektiv, sie war nur für drei von acht Isolaten empfänglich. In dieser Eigenschaft ist sie mit der Referenzzelllinie NIERE/PK(15)A/ad vergleichbar (Tabellen 12 und 13). In der Referenzzelllinie HODEN/STE replizierten 4 von 6 Virusisolaten. Die höchsten Virustiter wurden mit den Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 erreicht. Sie betragen mit der Zelllinie NIERE/5-1 4,5 bis 7,8 log₁₀ KID₅₀/ml und mit der Zelllinie HODEN/278 3,0 bis 6,4 log₁₀ KID₅₀/ml.

Tabelle 12: Virustiter von Isolaten, deren maximaler Virustiter in Voruntersuchungen mit den Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A bzw. HODEN/STE 72 h p. i. $\leq 10^3$ KID₅₀/ml war.

CSF-Nr.	0365	0638	0644
Zelllinie	Mittelwerte der Virustiter [log₁₀ KID₅₀/ml] 120 h p. i.		
NIERE/5-1	6,9	6,0	*
HODEN/278	6,4	5,8	5,6
NIERE/8	5,2	5,9	*
HODEN/STE	2,5	5,7	*
NIERE/PK(15)A/ad	1,9	5,6	2,7

Mittlere Standardabweichung: $\pm 0,2$

Tabelle 13: Virustiter von Isolaten, bei denen in Voruntersuchungen der Virusnachweis in den Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A bzw. HODEN/STE nur sporadisch oder nicht geführt werden konnte.

CSF-Nr.	0301	0332	0348	0396	0426	0461	0450	0571
Zelllinie	Mittelwerte der Virustiter [log₁₀ KID₅₀/ml]/120 h p. i.]							
NIERE/5-1	5,6	4,5	*	*	7,8	6,6	6,6	4,7
HODEN/278	4,0	6,0	5,5	5,6	6,2	6,0	5,9	3,0
NIERE/8	0	0	*	*	3,4	0	0	0
HODEN/STE	1,4	*	*	*	0	*	0	2,9
NIERE/PK(15)A/ad	0	0	0	3,2	0	0	0	0

Mittlere Standardabweichung: $\pm 0,3$

*: keine Untersuchung

4.7.2 Untersuchungen mit Organhomogenaten

Um festzustellen, ob sich die Zelllinien auch für die Isolierung von KSPV aus Organmaterial eignen, wurden Zellkulturen mit Organhomogenat beimpft (Tabelle 14). Als Ausgangsmaterial diente Nierengewebe KSPV infizierter Haus- und Wildschweine. Der Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt. Das Organhomogenat wurde auf den Zellrasen verbracht, und nach der Adsorptionszeit von 1 h wieder entfernt. Alle 24 h wurden die Zellkulturen lichtmikroskopisch beurteilt, ohne daß morphologische Veränderungen auffielen. Mit den Zelllinien NIERE/5-1, NIERE/8, HODEN/278 und PK(15)A/ad wurde das KSPV aus allen Homogenaten isoliert. Dabei wurden die höchsten Virustiter mit den Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 erreicht. Aus den Homogenaten 0570 und 0579 konnte das Virus mit der Zelllinie HODEN/STE nicht isoliert werden.

Tabelle 14: Virustiter nach Virusisolierung aus Organhomogenat.

CSF-Nr.	0411	0570	0574	0579
Zelllinie	Mittelwerte der Virustiter [log₁₀ KID₅₀/ml] 120 h p. i.			
NIERE/5-1	6,4	6,1	5,5	6,5
HODEN/278	6,3	6,5	6,0	6,4
NIERE/8	5,6	5,2	4,8	6,1
HODEN/STE	3,9	0	5,0	0
NIERE/PK(15)A/ad	5,7	5,7	4,5	5,1

Mittlere Standardabweichung: $\pm 0,2$

4.8 Anteil von zellgebundenem und freiem Virus in verschiedenen Zellkulturen

Der Virusgehalt der Gesamtkultur setzte sich aus dem Virustiter des zellfreien Virus (ZF) im Zellkulturüberstand und dem zellgebundenen Virus (ZG) in der Zellfraktion zusammen. Um zu untersuchen, ob ein Einfluß von Virusstamm oder Zelllinie auf die Verteilung des Virus in der Zellkultur besteht, wurden für diese beiden Fraktionen die Virustiter getrennt bestimmt. Dazu wurden neben den drei Referenzzelllinien die Zelllinien NIERE/8 und HODEN/278 mit den Virusstämmen EYSTRUP und C-STAMM infiziert und 120 h p. i. eine Viruspassage durchgeführt. Das Virus wurde 48 h p. i. und 120 h p. i. geerntet. Der Versuch wurde im Doppelansatz zweimal wiederholt.

Das Verhältnis der Fraktionen zueinander ergab sich aus dem Quotienten von ZF und ZG. Positive Werte zeigten an, daß der Anteil des Virus im Zellkulturüberstand größer war als in den Zellen. Für negative Werte war das Gegenteil der Fall (MITTELHOLZER, 2000).

Beim Vergleich der beiden Virusstämme fiel auf, daß die Viruspartikel des Virusstammes C-STAMM in allen Zelllinien vorwiegend frei im Zellkulturüberstand vorlagen.

Die Viruspartikel des Virusstammes EYSTRUP waren nur nach Infektion von einer Zelllinie, der NIERE/5-1, überwiegend frei im Zellkulturüberstand zu finden. Gegenteilige Verteilungsverhältnisse zeigten sich in der Zelllinie NIERE/PK(15)A. Bei drei der fünf untersuchten Zelllinien wurde der überwiegende Anteil der Viren jeweils in unterschiedlichen Fraktionen nachgewiesen. In der Zelllinie NIERE/8 war das Virus 48 h p. i. überwiegend frei im Zellkulturüberstand, 120 h p. i. hingegen vorwiegend zellgebunden (Abbildung 8). Die Zelllinien HODEN/STE und HODEN/278 zeigten 48 h p. i. einen größeren Anteil zellgebundenes Virus, der 120 h p. i. nur in der Zelllinie HODEN/STE zu finden war. Zu allen anderen Infektionszeitpunkten war der Virusanteil im Zellkulturüberstand größer (Abbildung 9 und 10).

Der Vergleich der verschiedenen Zelllinien zeigte die Tendenz, daß die Verteilung des Virus in der Zellkultur sowohl vom Virusstamm als auch von der Zelllinie abhängig war. In einigen Zelllinien, die mit dem Virusstamm EYSTRUP infiziert waren, schienen sich die Verteilungsverhältnisse im Verlauf der Infektion zu ändern.

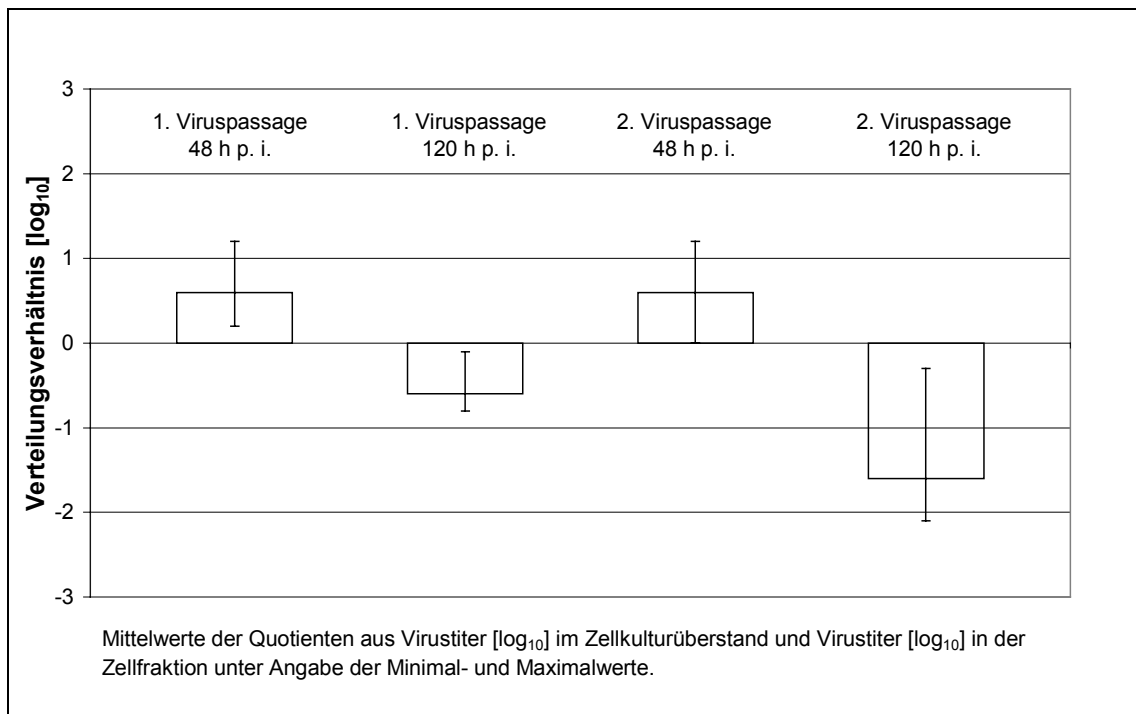


Abbildung 8: Anteil von freiem Virus (positiver Wert) und zellgebundenem Virus (negativer Wert) des Virusstammes EYSTRUP in Zellkulturen der Zelllinie NIERE/8.

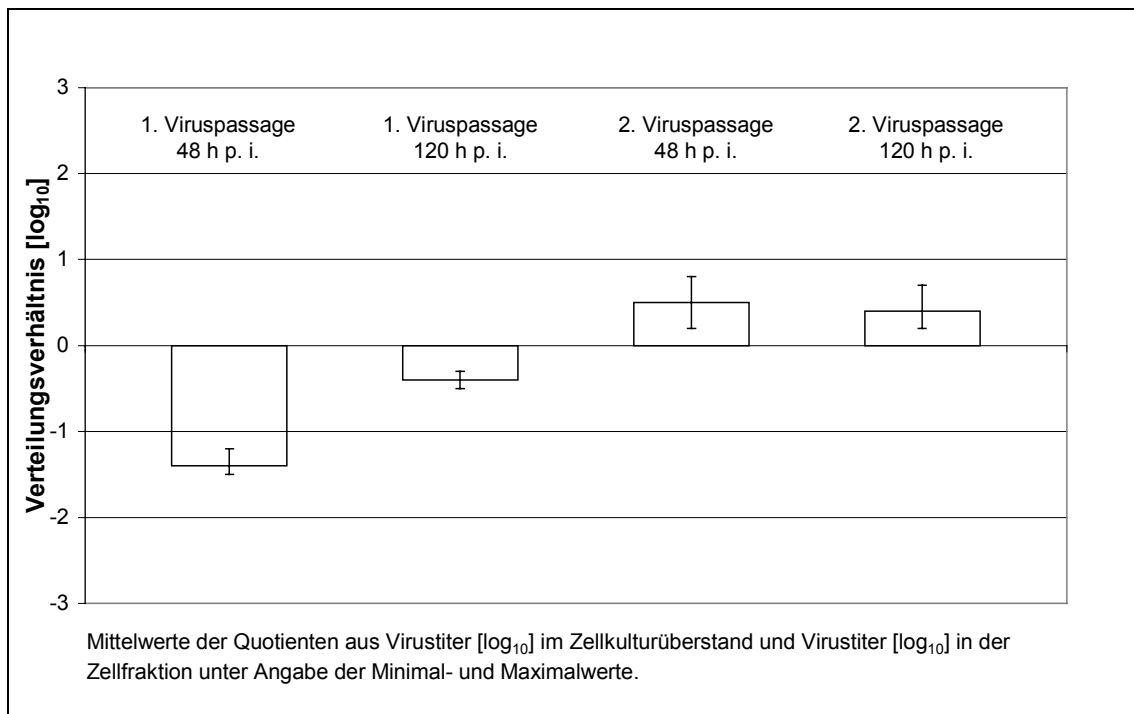


Abbildung 9: Anteil von freiem Virus (positiver Wert) und zellgebundenem Virus (negativer Wert) des Virusstammes EYSTRUP in Zellkulturen der Zelllinie HODEN/STE.

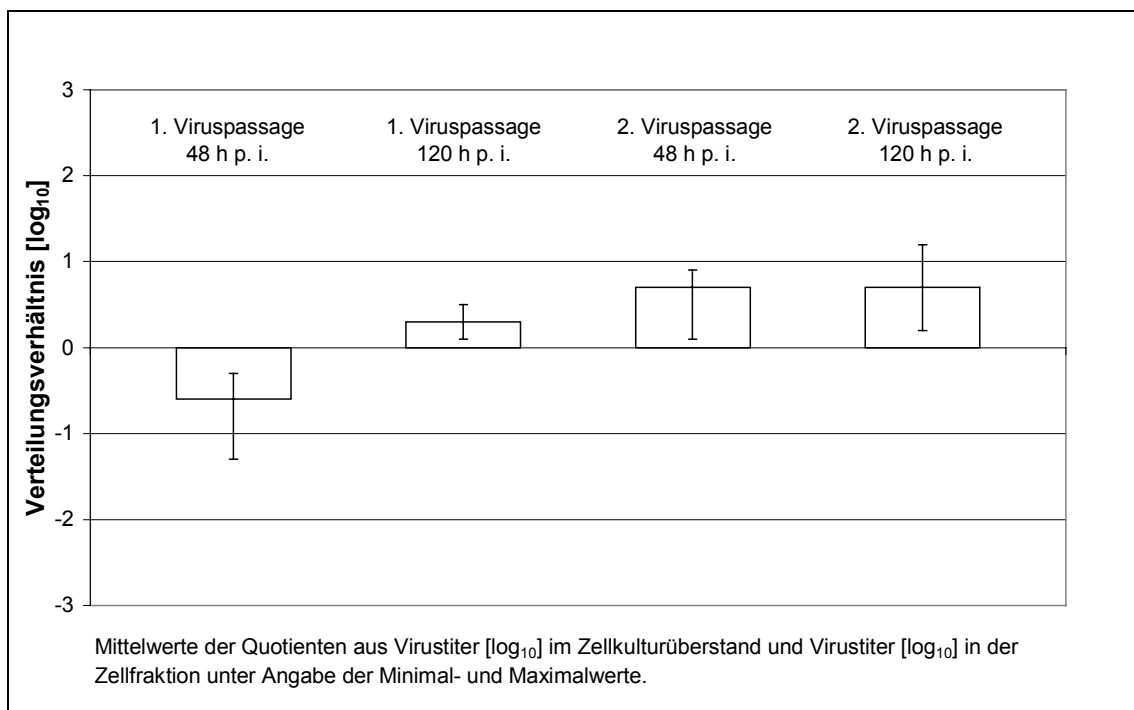


Abbildung 10: Anteil von freiem Virus (positiver Wert) und zellgebundenem Virus (negativer Wert) des Virusstammes EYSTRUP in Zellkulturen der Zelllinie HODEN/278.

5. Diskussion

Seit 1932 ist bekannt, daß sich das Virus der KSP in einer Vielzahl von Zelllinien unterschiedlichen Ursprunges repliziert (HECKE, 1932). Darüberhinaus konnte mehrfach gezeigt werden, daß sich permanente Zelllinien, die auf porcines Nieren- bzw. Hodengewebe zurückzuführen sind, besonders gut für die Virusvermehrung eignen. So konnten sich die Nierenzelllinie PK(15) (MENGELING et al., 1963; CARBREY et al., 1965; PIRTLE u. KNIAZEFF, 1968) und die Hodenzelllinie STE (McCLURKIN u. NORMAN, 1966; KOSMIDOU, 1995) in der Schweinepestdiagnostik etablieren. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine vergleichende Studie mit weiteren permanenten porcinen Zelllinien in bezug auf die Virusreplikation des KSPV durchzuführen. Es wurden nur vom Schwein stammende Zelllinien untersucht, da ein Vergleich porciner, boviner und oviner Zelllinien gezeigt hatte, daß die KSPV-Stämme in den porcinen Zelllinien die höchsten Virustiter erreichten (ROEHE u. EDWARDS, 1994). Da auch die verschiedenen KSPV-Stämme in ein und derselben Zellkultur unterschiedlich replizierten (PIRTLE u. KNIAZEFF, 1968; NAKAMURA et al., 1983), wurde auch dieser Aspekt berücksichtigt. So wurden als Referenzvirusstämme der virulente EYSTRUP (DRÄGER et al., 1964) und der attenuierte avirulente C-STAMM (URBANECK, 1971; WITTMANN et al., 1972) gewählt.

Eine Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war, daß die Zelllinien aus einem einheitlichen Zelltyp bestanden, da ein Gemisch von Zellen, wie in primären Zellkulturen vorhanden, die Reproduzierbarkeit erschwert (McGARRITY, 1979). Zur Differenzierung von fibroblastoiden Zellen und Epithelzellen wurde eine Zytokeratinfärbung durchgeführt und die erhaltenen Ergebnisse mit der lichtmikroskopisch bestimmten, vorherrschenden Morphologie der Zelllinie verglichen. Die Zelllinien HODEN/278, NABELVENENENDOTHEL/245, EILEITER/270 und HAUT/388 konnten, entgegen des lichtmikroskopischen Bildes, als homogen charakterisiert werden. Anders verhielt es sich bei den Zelllinien GEHIRN/565 und VOLLEMBRYO/139, die sich mit Hilfe der Zytokeratinfärbung als Zellgemisch herausstellten. Alle Zelllinien, in denen die Referenzstämme hohe Titer erreichten, bestanden aus nur einem Zelltyp. Beide Virusstämme replizierten sowohl in Epithelzellen als auch in fibroblastoiden Zellen (HAUT/388) zu hohen Virustitern. Eine Abhängigkeit vom Zelltyp konnte nicht gefunden werden. In Zelllinien

gleichen Ursprungsgewebes und Zelltyps dagegen, wie den Zelllinien HODEN/STE, HODEN/278 und HODEN/170, replizierte der Virusstamm C-STAMM mit deutlichen Titerunterschieden.

Zur Infektion der Zellkulturen wurde eine sehr niedrige MOI von < 1 gewählt. Sie war aus zwei Gründen niedriger als in vergleichbaren Untersuchungen (MITTELHOLZER et al., 2000): Einerseits konnten die Unterschiede in der Virusreplikation dadurch deutlicher gezeigt werden. Ein Beispiel ist der Vergleich der Referenzzelllinien HODEN/STE und NIERE/5-1, die mit dem Referenzstamm C-Stamm infiziert wurden. Der Virustiter nach der 1. Viruspassage 120 h p. i. in der Zelllinie NIERE/5-1 wurde in der Zelllinie HODEN/STE erst in der 3. Viruspassage 72 h p. i. erreicht. Die Kultivierungsdauer von 120 h wurde nicht überschritten, da die Zellkulturen zu diesem Zeitpunkt konfluent waren und das Wachstumsplateau erreicht hatten. Ein anderer Aspekt war der Bezug zu den in der diagnostischen Praxis vorgefundenen Verhältnissen. Auch geringe Mengen Virus müssen in der Zellkultur aus Untersuchungsmaterial isoliert werden können (FLOEGEL-NIESMANN, pers. Mitteilung). Die Virusmenge in einer Probe ist von vielen Faktoren abhängig. Eine wichtige Rolle spielen das Infektionsstadium des Tieres, die Immunkompetenz sowie umweltbedingte Einflüsse auf das Untersuchungsmaterial während des Transportes.

Die Untersuchung der Replikation des KSPV wurde mit 16 permanenten porzinen Zelllinien durchgeführt. Dabei erreichten die Referenzvirusstämme EYSTRUP und C-STAMM in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich hohe Titer.

Im Vergleich zum virulenten Virusstamm EYSTRUP erreichte der avirulente C-STAMM in der Zellkultur deutlich niedrigere Virustiter. Der Virusstamm EYSTRUP zeigte Virustiter in einer Größenordnung von 6,4 bis 7,2 \log_{10} KID₅₀/ml, was ca. 2 \log_{10} Titerstufen über den beim C-STAMM gefundenen maximalen Titern entsprach, die von 1,8 bis 5,3 \log_{10} KID₅₀/ml reichten. In Versuchen mit anderen virulenten KSPV-Stämmen, wie dem Virusstamm ALFORT, wurden in PK(15)-Zellen vergleichbare Virustiter von 6,5 bis 7,5 \log_{10} KID₅₀/ml erreicht (FROST et al., 1977). Bei Untersuchungen, in denen parallel virulente und avirulente KSPV-Vertreter auf ihr Replikationsverhalten in der Zellkultur getestet wurden, konnten sowohl gleiche (ROEHE u. EDWARDS, 1994) als auch höhere Virustiter (MITTELHOLZER et al., 2000) für den avirulenten KSPV-Vertreter BAKER A in den Nierenzellen PK(15) bzw.

SK6 gefunden werden. In Zellkulturen verschiedener Spezies kamen ROEHE und EDWARDS (1994) zu gleichen Ergebnissen wie MITTELHOLZER et al. (2000). Diese Unterschiede und die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, wie groß der Einfluß von Virusstamm und Zelllinie auf die Virusreplikation ist. Während die Titerunterschiede in den einzelnen Zelllinien für den Virusstamm EYSTRUP eher gering ausfielen, zeigten sich beim KSPV-Vertreter C-STAMM gravierende Unterschiede. 48 h p. i. konnte in 14 mit dem Virusstamm EYSTRUP infizierten Zelllinien über drei Viruspassagen Virusreplikation nachgewiesen werden. Die Replikation des Virusstammes C-STAMM war dagegen zu diesem Zeitpunkt in der 1. Viruspassage in fünf Zelllinien noch nicht und in der 2. bzw. 3. Viruspassage in drei Zelllinien nicht mehr nachweisbar. Dafür waren bei zwei der fünf erstgenannten Zelllinien niedrige Virustiter in der 2. und 3. Viruspassage vorhanden. In der Zelllinie VOLLEMBRYO/139 war 48 h p. i. der Virusnachweis in allen drei Viruspassagen negativ und konnte erst 120 h p. i. geführt werden.

Diese Unterschiede der Virusreplikation können in erster Linie auf die verschiedenen Zelllinien zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu steht die Differenz von 2 \log_{10} -Stufen zwischen den durchschnittlich erreichten Virustitern der Virusstämme EYSTRUP und C-STAMM, die als eine Eigenschaft der Virusstämme anzusehen ist. Daß das KSP-Virus in Zelllinien verschiedener Spezies unterschiedlich replizierte, konnte in vielfachen Untersuchungen gezeigt werden (PIRTLE u. KNIAZEFF, 1968; FERRARI, 1992; ROEHE u. EDWARDS, 1994). Die KSPV-Replikation in PK(15)-Zellen, Lymphozyten-Phytozellen und Monozytenzellstamm nahm in dieser Reihenfolge ab (KORN u. ZOETH, 1971).

Die Interpretation der unterschiedlichen KSPV-Replikation in verschiedenen Zelllinien ist unter Einbeziehung der Infektionsmechanismen möglich. Untersuchungen mit dem BVD-Virus zeigten, daß ein Infektionsweg der Pestiviren die Bindung des Virus an spezifische Rezeptoren der Zelle ist (MOENNIG, 1990; AGNELLO et al., 1999; SCHELP et al., 2000), wobei möglicherweise verschiedene BVD-Virusstämme unterschiedliche Rezeptoren nutzen (XUE u. MINOCHA, 1993). Ein Verlust oder eine Reduzierung dieser Rezeptoren könnte die Folge sein, wenn Zelllinien sich unter in-vitro-Bedingungen zu permanenten Zelllinien entwickeln. Dies hat wahrscheinlich rezeptorunabhängige, ineffizientere Adsorptions- und Penetrationsmechanismen des Virus zur Folge. Solche Mechanismen wurden auch in Versuchen mit BVD-Virusstämmen, in denen

BVDV-spezifische Rezeptordomänen blockiert worden waren, als Erklärung für fokale Infektionen des Zellrasens angenommen (MOENNIG et al., 1988b; SCHELP et al., 1995). Damit läßt sich auch erklären, daß Titrationsen mit der Zelllinie NIERE/PK(15)A, in der der Virusstamm C-STAMM schlecht replizierte, möglich waren. In einer Kultivierungszeit von 72 h konnte das Virus in die Zellen penetrieren, im Zytoplasma replizieren und nachgewiesen werden.

Die KSPV-Referenzstämme in der vorliegenden Arbeit replizierten ohne zytopathogenen Effekt, d.h. es war kein lichtmikroskopisch sichtbarer Einfluß auf die Zellkulturen feststellbar. Auch ein signifikanter Einfluß auf das Proliferationsverhalten der Zellen bestand für die Mehrzahl der Zelllinien nach Infektion mit den Virusstämmen EYSTRUP und C-STAMM nicht. In Untersuchungen mit dem *nicht zytopathogenen* (nzp) BVD-Virus 7443 war die maximale Teilungsrate in den infizierten Zellen (*fetale Kälbernierzellen* und *Madin Darby bovine kidney* [MDBK]-Zellen) 10 % niedriger (GRUMMER, 1999). Die enge Verwandtschaft der bovinen und porzinen Pestiviren ließ gleichartige Untersuchungsergebnisse erwarten. Es konnte jedoch nur in zwei von fünf Zelllinien eine vergleichbare Verminderung der Zellproliferation für Zellkulturen, die mit dem Virusstamm EYSTRUP infiziert waren, nachgewiesen werden. Dies betraf die Zelllinien NIERE/5-1 (120 h p. i.) und HODEN/STE (120 h p. i.).

Für die Vermehrung von Feldisolaten, die unter Standardbedingungen nicht gelungen war, wurden die Zelllinien NIERE/8, NIERE/5-1, HODEN/STE und HODEN/278 verwendet. In diesen Zelllinien replizierten die Referenzstämme EYSTRUP und C-STAMM zu hohen Virustitern. Als Kontrolle wurde die Referenzzelllinie NIERE/PK(15)A/ad mitgeführt, die an ein Medium mit höherer FKS-Konzentration adaptiert worden war. Es hatte sich erwiesen, daß die Virustiter des C-STAMMES gegenüber dem in der nicht adaptierten NIERE/PK(15)A um ca. 1 log₁₀-Stufen höher waren. Eine Inkubationszeit von 120 h wurde gewählt, da in allen Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß die Virustiter bis zu diesem Zeitpunkt unter den gewählten Versuchsbedingungen noch anstiegen. Für diese weiterführenden Untersuchungen war die Inokulationsdosis $\leq 10^{2,3}$ KID₅₀/200µl. Die Kulturen wurden in Zellkulturröhrchen sukzessiv infiziert. Die Kulturmethode wurde von

den leicht zu handhabenden Zellkulturflaschen auf Kulturröhrchen umgestellt, da in der diagnostischen Praxis eine hohe Zelldichte erforderlich ist, wenn wenig Inokulationmaterial zur Verfügung steht. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Inokulationsweise auf die maximal erreichten Virustiter keinen Einfluß hatte; dies ist auch für den BVD-Virusstamm NADL beschrieben worden (CHOONTANOM, 1977).

Elf Feldisolate, deren Vermehrung mit den Referenzzelllinien zwischen 1997 bis 1999 durch das EU-Referenzlabor für KSP versucht worden war, wurden zur Untersuchung der o. g. Zelllinien verwendet. Es handelte sich um die Feldisolate des genetischen Typs 2.3 Spante, 2.1 Paderborn, Typ 1 und Typ 2.2 unterschiedlichster Herkunft, von denen bekannt war, daß sie in den Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A und HODEN/STE schlecht replizierten. Daß verschiedene KSPV-Stämmen unterschiedlich replizieren, konnte anhand der unterschiedlich hohen Virustiter von zehn verschiedenen KSPV-Stämmen in der Zelllinie PK(15) gezeigt werden (ROEHE u. EDWARDS, 1994). In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob sich die Feldisolate in den ausgewählten Zelllinien replizieren. Die hier verwendeten Feldisolate replizierten in den Zelllinien NIERE/8 und NIERE/PK(15)A/ad nicht oder nur schlecht. Für die NIERE/PK(15)A ist bekannt, daß sie im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover kloniert wurde (LIESS, pers. Mitteilung). Eine klonierte Zellpopulation erhält man aus einer einzigen „Elternzelle“, mit dem Vorteil, daß man mit einer genetisch homogenen Zellpopulation arbeiten kann (EAGLE, 1959). Der Nachteil, der sich daraus ergibt, ist eine Einschränkung der Vielfalt der Zellen. Auch in der klonierten Zelllinie HODEN/STE (KOSMIDOU, 1995) replizierten die hier untersuchten Feldisolate weniger effizient. In der ursprünglichen Zelllinie HODEN/278 dagegen replizierten alle untersuchten KSPV-Stämme/Isolate und erreichten hohe Titer. In zwei Zelllinien, der NIERE/5-1 und dem HODEN/278 replizierten alle untersuchten Feldisolate.

Für BVDV-Stämme/Isolate wurden die Begriffe „Multipotenz“ und „Spezialist“ geprägt (MOENNG, 1990). Ob diese auf die untersuchten KSPV-Stämme/Isolate übertragen werden können, scheint fraglich. Danach waren „multipotente“ BVDV-Stämme/Isolate so charakterisiert, daß sie sich nicht ausschließlich in den Zellen ihres natürlichen Wirtes vermehren, sondern auch in heterologen Zellkulturen hohe Virustiter erreichen. Diese Eigenschaft wurde mit dem Vorkommen von Liganden, die für eine oder mehrere heterologe Zelllinie spezifisch sind, in Verbindung gebracht. Als „Spezialisten“ wurden dagegen

BVDV-Stämme/Isolate bezeichnet, die sich entweder ausschließlich in Rinderzellen vermehrten oder in heterologen Zellkulturen nur sehr geringe Titer erreichten. Für die verwendeten KSPV-Stämme/Isolate würde das bedeuten, daß es sich nur um „Spezialisten“ gehandelt hätte, und zwar bereits ohne sie auf heterologen Zelllinien zu untersuchen. Selbst in den jeweils drei Nieren- bzw. Hodenzelllinien replizierten die Virusstämme EYSTRUP und C-STAMM trotz gleichen Ursprungsgewebes sehr unterschiedlich. Wahrscheinlicher für die unterschiedliche Replikation ist, daß die Rezeptorbeschaffenheit der Zellen maßgeblich für die Virusreplikation war, da in den Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 alle sogenannten „Spezialisten“ zu hohen Titern replizierten. In weiterführenden Untersuchungen mit einem größeren Spektrum von Virusisolaten muß einerseits untersucht werden, wie Virusisolate in den Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 replizieren, von denen bekannt ist, daß sie sich in den Referenzzelllinien gut vermehren. Andererseits muß eine größere Zahl von Isolaten, die in den Referenzzelllinien schlecht replizierten, in die Untersuchungen einbezogen werden, um eine Empfehlung als Referenzzelllinie aussprechen zu können.

Das Verteilungsverhältnis zwischen der zellgebundenen und der zellfreien Virusfraktion nach Vermehrung von KSPV in verschiedenen Zelllinien wurde mit den beiden Referenzstämmen, dem avirulenten C-STAMM und dem virulenten EYSTRUP untersucht. Dazu wurde das zellgebundene Virus durch einen zweimaligen Gefrier-Tau-Zyklus freigesetzt. Es zeigte sich die Tendenz, daß die Verteilung des Virus in der Zellkultur sowohl vom Virusstamm als auch von der Zelllinie abhängig zu sein scheint. In allen fünf untersuchten Zelllinien wurde der avirulente Virusstamm C-STAMM zu einem größeren Anteil in den Zellkulturüberstand freigesetzt. Dagegen konnte der virulente Virusstamm EYSTRUP in Abhängigkeit von der Zelllinie teilweise überwiegend zellgebunden, teilweise frei im Zellkulturüberstand gefunden werden. Eine Voraussetzung für die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Untersuchungen ist die gleichartige Behandlung der Zellkultur zur Freisetzung des zellgebundenen Virus, da beispielsweise durch einen zweimaligen Gefrier-Tau-Zyklus das intrazelluläre Virus effektiver freigesetzt wird als durch eine Ultraschallbehandlung (MENGELING u. DRAKE, 1969). DANNER und BACHMANN (1969) führten zur Virusfreisetzung beide o. g. Verfahren hintereinander durch und fanden in PK(15)-Zellkulturen, die mit dem virulenten KSPV Stamm MÜNCHEN-1 infiziert waren, einen höheren Anteil von zellgebundenem Virus. In der Zelllinie NIERE/PK(15)A waren für

den virulenten KSPV-Stamm EYSTRUP nach zweimaligem Gefrier-Tau-Zyklus gleiche Ergebnisse erhalten worden. Dieselben Verteilungsverhältnisse wurden in der PK(15)-Zelllinie mit dem virulenten KSPV Stamm ALFORT durch Extraktion des zellgebundenen Virus mit Fluocarbon gefunden (LAUDE, 1977). Nach ihrer Virulenz charakterisierte KSPV-Stämme wiesen ein bestimmtes Verteilungsmuster in Abhängigkeit von dieser Eigenschaft auf (MITTELHOLZER et al., 2000). In der Nierenzelllinie SK-6 wurden nach zweimaligem Gefrier-Tau-Zyklus hoch virulente KSPV-Stämme überwiegend frei im Zellkulturüberstand nachgewiesen, moderat virulente und avirulente KSPV-Stämme waren vorwiegend zellgebunden. Der Klon des ALFORT/187 wurde entgegen früheren Publikationen (DAHLE u. LIESS, 1995), wo die Morbidität und Mortalität bei vergleichbar niedrigeren Inokulationsdosen stark ausgeprägt war, als moderat virulent eingestuft und lag demzufolge in erster Linie zellgebunden vor. Der als hoch virulent charakterisierte KSPV-Stamm EYSTRUP war zu einem größeren Anteil im Zellkulturüberstand zu finden. In den hier untersuchten Nierenzelllinien waren die Viruspartikel in der Zelllinie NIERE/5-1 vorwiegend frei im Zellkulturüberstand und in der Zelllinie NIERE/PK(15)A überwiegend zellgebunden. Nach Infektion der Zelllinie NIERE/8 war der Anteil zellgebundenen Virus 48 h p. i. größer als 120 h p. i., wo das Virus hauptsächlich im Zellkulturüberstand vorlag.

Bisherige Untersuchungen der Verteilungsverhältnisse in der Zellkultur wurden in Einschnittvermehrungskurven durchgeführt, bei denen die $MOI \geq 1$ und die Kultivierungsdauer kürzer als 120 h war (DANNER u. BACHMANN, 1969; MENGELING u. DRAKE, 1969; LAUDE, 1977; MITTELHOLZER et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen stets mit einer $MOI < 1$ infiziert, woraus Unterschiede zu anderen Befunden resultieren können. Weiterführende Untersuchungen mit niedriger und hoher MOI könnten Aufschluß darüber geben, welchen Einfluß die MOI auf die Verteilungsverhältnisse in der Zellkultur, in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer besitzt.

Für eine sichere Diagnostik werden Zelllinien benötigt, in denen alle KSPV-Stämme/Isolate zu hohen Virustitern replizieren. Die derzeitig verwendete Referenzzelllinie NIERE/PK(15)A zeigte diese Eigenschaft nicht konstant. Der Virustamm C-STAMM sowie elf Feldisolate replizierten schlecht bzw. es konnte mit sieben Feldisolaten keine Virusreplikation nachgewiesen werden. Dagegen erreichte der Virustamm EYSTRUP hohe Virustiter. In den

Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 replizierten die KSPV-Isolate zu deutlich höheren Titern und können nach entsprechenden Zusatzuntersuchungen als Referenzzelllinien eingesetzt werden. Für diese Zelllinien muß neben den o. g. Untersuchungen noch gezeigt werden, ob ein in der Zusammensetzung vereinfachtes Medium (z.B. MEM auf der Basis von Earle's-Salzen und 10 % FKS) auf das Wachstum der Zellen und die Virusreplikation einen Einfluß hat.

Die Kultivierungsdauer für die Virusisolierung ist derzeit in der KSPV-Diagnostik auf 72 h festgelegt. Drei Passagen könnten erforderlich sein, um geringe Mengen Virusantigen nachweisen zu können (ANONYMUS, 2001). Da der Zeitfaktor eine bedeutende Rolle bei der KSPV-Diagnostik (z.B. Bestandssperre) spielt, war für den Nachweis der Infektion der kürzeste Zeitraum bei größter Sicherheit gesucht. Die Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 erreichten 48 h p. i., mit dem Virusstamm C-STAMM und sehr niedriger MOI (10^{-4}) infiziert, Virustiter von 1,6 bzw. 1,9 \log_{10} KID₅₀/ml. 120 h p. i. hatten sich die Virustiter auf 4,7 bzw. 5,2 \log_{10} KID₅₀/ml erhöht. Mit einem Doppelansatz unter Verwendung dieser Zelllinien könnte das Virus sicher diagnostiziert werden, indem 48 h p. i. für einen Teil des Ansatzes der Virusnachweis (z.B. PLA) durchgeführt wird. Dieser erfordert weitere 48 h, bis das Virusantigen im PLA nachgewiesen werden kann. Im Fall eines negativen Ergebnisses kann mit dem verbliebenen Teil des Ansatzes der Virusnachweis 120 h p. i. erneut versucht werden.

6. Zusammenfassung

Die Klassische Schweinepest (KSP) wird durch ein Pestivirus (KSPV) aus der Familie Flaviviridae hervorgerufen. Da die Diagnose dieser anzeigepflichtigen Tierseuche unter Verwendung permanenter porziner Zelllinien erfolgt, stellen diese Zelllinien einen bedeutenden Faktor sowohl bei der Diagnostik als auch bei der Bekämpfung der Seuche dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Replikation des KSPV in permanenten porzinen Zelllinien analysiert, um eine Optimierung der Diagnostik der KSP zu ermöglichen. Untersucht wurden die maximal erreichten Virustiter in den verschiedenen Zelllinien, der Zelltyp der Wirtszellen, der Einfluß der Virusinfektion auf die Zellproliferation sowie die Verteilungsverhältnisse von freiem und zellgebundenem Virus in der Zellkultur.

Die untersuchten KSPV-Stämme vermehrten sich sowohl in Epithelzellen als auch in fibroblastoiden Zellen. Die Titer des virulenten KSPV-Stammes EYSTRUP und des avirulenten KSPV-Stammes C-STAMM wurden in 16 permanenten porzinen Zelllinien ermittelt. Dabei wurden die klonierten Referenz-Zelllinien des EU-Referenzlabors für KSP, HODEN/STE und NIERE/PK(15)A in die Untersuchungen einbezogen. Der KSPV-Stamm EYSTRUP erreichte in 14 Zelllinien, der KSPV-Stamm C-STAMM nur in fünf Zelllinien hohe Virustiter. Die Virustiter des KSPV-Stammes C-STAMM lagen dabei ca. 2 log₁₀-Stufen unter denen des Stammes EYSTRUP. In den Zelllinien NIERE/5-1, NIERE/8, HODEN/STE, HODEN/278 und HAUT/388 replizierten beide untersuchten KSPV-Stämme zu Titern $\geq 10^{4,8}$ KID₅₀/ml. Die Virustiter wurden jeweils 48 h und 120 h p. i. bestimmt, wobei die höchsten Titer immer erst 120 h p. i. erreicht wurden.

Die Untersuchung des Einflusses der Virusinfektion auf die Zellproliferation zeigte, daß nur zwei Zelllinien, NIERE/5-1 und HODEN/STE, nach Infektion mit dem virulenten KSPV-Stamm EYSTRUP eine verminderte Proliferationsrate aufwiesen.

In weiterführenden Untersuchungen wurde die Replikation von 11 KSPV-Feldisolaten mit einer Auswahl der untersuchten Zelllinien analysiert. Bei den Virusisolaten handelte es sich um die genetischen Typen 2.3 Spante, 2.1 Paderborn, Typ 1 und Typ 2.2 unterschiedlicher Herkunft. In den Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 replizierten alle eingesetzten Feldisolate. Die Ergebnisse für die Zelllinien HODEN/STE und NIERE/PK(15)A entsprachen

früheren Untersuchungsergebnissen des EU-Referenzlabors: Die untersuchten Isolate replizierten nicht oder nur zu sehr niedrigen Titern.

Auf das Verteilungsverhältnis von freiem und zellgebundenem Virus in der Zellkultur hatten sowohl die verwendete Zelllinie als auch der eingesetzte Virusstamm Einfluß. Der KSPV-Stamm C-STAMM war in fünf untersuchten Zelllinien 48 h und 120 h p. i. überwiegend frei im Zellkulturüberstand zu finden. Dagegen gab es unter den mit dem KSPV-Stamm EYSTRUP infizierten Zellkulturen eine Linie (NIERE/5-1) mit vorwiegend freiem und eine Zelllinie (NIERE/PK(15)A) mit überwiegend zellgebundenem Virus. In drei Zelllinien änderten sich die Verhältnisse im Laufe der Kultivierung.

Unter Einbeziehung noch durchzuführender Zusatzuntersuchungen, die ein größeres Spektrum an KSPV-Isolaten und den Einfluß des Nährmediums beinhalten, können die Zelllinien NIERE/5-1 und HODEN/278 für die KSPV-Diagnostik empfohlen werden.

Summary

Sebastian Fischer

Replication of Classical Swine Fever Virus in different permanent porcine cell lines

Classical Swine Fever (CSF) is caused by a Pestivirus (CSFV) within the family Flaviviridae. Laboratory diagnosis of this notifiable disease is performed by using permanent porcine cell lines for propagation of the virus. Consequently these cell lines represent an important factor both for diagnosis and for eradication of the disease.

The replication of CSFV in permanent porcine cell lines was investigated in order to achieve optimal conditions for the laboratory diagnosis of CSF. Therefore, the replication of CSFV in different cell lines, the cell type, the influence of the virus infection on the cell proliferation as well as the distribution ratios of free and cell bound virus in the cell cultures were analyzed.

The investigated CSFV strains replicated in epithelial cells as well as in cells with fibroblastic morphology. The titres of the virulent CSFV strain EYSTRUP and the avirulent CSFV strain C-strain were determined in 16 permanent porcine cell lines. In addition, the cloned reference cell lines of the EU-reference laboratory for CSF, HODEN/STE (testis) and NIERE/PK(15)A (kidney), were included into the investigations. The CSFV strain EYSTRUP achieved high virus titres in 14 cell lines, the CSFV strain C-strain in five cell lines only. The virus titres of CSFV-strain C-strain were about $2 \log_{10}$ steps lower than the titres of CSFV strain EYSTRUP. In the cell lines NIERE/5-1, NIERE/8, HODEN/STE, HODEN/278 and HAUT/388 (skin) both CSFV-strains replicated to titres $\geq 10^{4.8}$ TCID₅₀/ml. The titres were determined 48 h and 120 h p. i., respectively, whereby the highest titres were achieved 120 h p. i.

Analysis of the influence of the virus infection on the cell proliferation showed that after infection with the virulent CSFV strain EYSTRUP only two cell lines, NIERE/5-1 and HODEN/STE, exhibited a lower proliferation rate.

In further investigations, the replication of 11 CSFV field isolates was analyzed with a selection of the cell lines. The field isolates belonged to the genetic types 2.3 Spante, 2.1 Paderborn, type 1 and type 2.2 of different origin, respectively. In the cell lines

NIERE/5-1 and HODEN/278 all the field viruses were able to replicate. The results for the cell lines HODEN/STE and NIERE/PK(15)A were in concert with those obtained at the EU-reference laboratory: the isolates replicated either to very low titres or not at all.

Concerning the distribution ratios of free and cell bound virus in the cell culture it was obvious that the cell lines as well as the virus strains influenced the results. 48 h and 120 h p. i. the CSFV strain C-strain was found predominantly in the cell culture supernatant, whereas in cell cultures infected with CSFV-strain EYSTRUP, free virus and cell bound virus occurred. In contrast, in one cell line (NIERE/5-1) infected with EYSTRUP the virus was predominantly found in the supernatant and in a second cell line (NIERE/PK(15)A) the virus was found predominantly cell associated. In three cell lines, the ratios changed during the time of cultivation.

Although more investigations have to be performed, including characterization of additional CSFV isolates and different cell culture medium, the cell lines NIERE/5-1 and HODEN/278 can be recommended for the CSFV diagnosis.

7. Literaturverzeichnis

AGNELLO, V., G. ABEL, M. ELFAHAL, G. B. KNIGHT u. Q.-X. ZHANG (1999):

Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 12766-12771

ANONYMUS (1996):

List A diseases, Chapter 2.1.13: Classical swine fever, A. Diagnostic techniques.

In: OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (Hrsg.): Manual of standards for diagnostic tests & vaccines.

Off. Int. Epiz., 3rd Ed., 145-154

ANONYMUS (2001):

Chapter VI: Principles and applications of virological tests and evaluation of their results.

In: COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITY (Hrsg.): Classical swine fever diagnostic manual.

Commi. Europ. Commu., SANCO/398/2000rev6, 2-30

AYNAUD, J.-M. (1968):

Études de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la peste porcine.

Rech. Vet. 1, 25-36

BAKER, I. A. u. B. E. SHEFFY (1960):

A persistent hog cholera viraemia in young pigs.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105, 675-678

BEER, J., D. URBANECK, W. HEINICKE, H. SCHWEDLER u. W. WITTMANN (1972):

Neue Wege bei der Bekämpfung und Prophylaxe der Schweinepest in der Deutschen Demokratischen Republik.

Monatsh. Veterinärmed. 13, 489-493

- BIELEFELDT-OHMANN, H., M. H. JENSEN, K. J. SORENSEN u. K. DALSGAARD (1982):
Experimental fetal infection with bovine viral diarrhoea virus.
I. Virological u. serological studies.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 46, 357-362
- BEYERBACH, M. (2001):
Persönliche Mitteilung am 12. 02. 2001.
- BJORKLUND, H. V., T. STADEJEK, S. VILCEK u. S. BELAK (1998):
Molecular characterization of the 3' noncoding region of classical swine fever virus vaccine strains.
Virus Genes 16, 307-312
- BÖHM, K. H., I.S. ABDALLAH u. U. REUSS (1966):
Vergleichender Antigen- und Antikörpernachweis bei der Schweinepest mittels der Agargelpräzipitation.
Arch. Exp. Vet. Med. 20, 927-933
- BOLIN, S., V. MOENNIG, N. E. KELSO-GOURLEY u. J. RIDPATH (1988):
Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups.
Arch. Virol. 99, 117-123
- BOULANGER, D., J. DUBUISSON u. P. PASTORET (1992):
Studies on the neutralization mechanism of bovine viral diarrhoea virus.
Proc. Second Symposium on Pestiviruses, 157-162
- BOULANGER, D., S. WAXWEILER, L. KARELLE, M. LONCAR, B. MIGNON, J. DUBUISSON, E. THIRY u. P. PASTORET (1991):
Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp 48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum.
J. Gen. Virol. 72, 1195-1198
- BOYNTON, W. H. (1946):
Preliminary report on the propagation of hog cholera virus in vitro.
Vet. Med. 41, 346-347

CARBREY, E. A., W. C. STEWART, J. I. KRESSE u. L. R. LEE (1965):

Technical aspects of tissue culture fluorescent antibody technique.

Proc. U.S. Livestock Sanitary Assoc. 69, 487-500

CARBREY, E. A., W. C. STEWART u. S. H. YOUNG (1966):

The changing picture of hog cholera - case studies.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 149, 1720-1724

CARBREY, E. A., W. C. STEWARD, J. I. KRESSE u. M. L. SNYDER (1977):

Inapparent hog cholera infection following the inoculation of field isolates.

In: LIESS, B. (Hrsg.): Agricultural research seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever.

Commi. Europ. Commu., EUR 5904, 214-230

CARBREY, E. A., W. C. STEWART, J. I. KRESSE u. M. L. SNYDER (1980):

Persistent hog cholera infection detected during virulence typing of 135 field isolates.

Am. J. Vet. Res. 41, 946-949

CAY, B., G. CHAPPUIS, C. COULIBALY, Z. DINTER, S. EDWARDS, I. GREISER-WILKE, M. GUNN, P. HAVE, G. HESS, N. JUNTTI, B. LIESS, A. MATEO, P. McHUGH, V. MOENNIG, P. NETTLETON u. G. WENSVOORT (1989):

Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an international workshop.

Vet. Microbiol., 20, 123-129

CHEVILLE, N. F. u. W. L. MENGELING (1969):

The pathogenesis of chronic hog cholera. Histologic, immunofluorescence and electronmicroscopic studies.

Lab. Invest. 20, 261-274

CHOONTANOM, M. (1977):

Vergleichende Endpunkttitrationen von Stämmen des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) im Mikrotiter- und im CCSC-System. Zugleich ein Beitrag zur Gewinnung hochtitriger BVD-Hyperimmunseren vom Schwein unter Ausnutzung der anamnesticen Immunantwort.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

- COLLETT, M. S., R. LARSON, C. GOLD, D. STRICK, D. K. ANDERSON u. A. F. PURCHIO (1988a):
Molecular cloning and nucleotid sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus.
Virology 165, 191-199
- COLLETT, M. S., R. LARSON, S. K. BELZER u. E. RETZEL (1988b):
Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organisation of a pestivirus.
Virology 165, 200-208
- COLLETT, M. S., M. A. WISKERCHEN, E. WELNIAK u. S. K. BELZER (1991):
Bovine viral diarrhoea virus genomic organisation.
In: LIESS, B., V. MOENNIG, J. POHLENZ u. G. TRAUTWEIN (Hrsg.): Ruminant pestivirus infections.
Arch. Virol. [Suppl. 3], 19-27
- CORAPI, W. V., R. O. DONIS u. E. J. DUBOVI (1988):
Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections.
J. Virol. 62, 2823-2827
- DAHLE, J. u. B. LIESS (1995):
Comparative study with cloned classical swine fever virus strains ALFORT and GLENTORF: clinical, pathological, virological and serological findings in weaner pigs.
Wien. Tierärztl. Mschr. 82, 232-238
- DALE, C. N. u. J. R. SONGER (1957):
In vitro propagation of hog cholera virus.
I. Method of cultivation and observations on color changes in the medium.
Am. J. Vet. Res. 18, 362-368
- DALE, C. N. u. J. R. SONGER (1959):
II. Some biological and immunological characteristics of hog cholera virus in tissue culture.
Am. J. Vet. Res. 20, 304-318

DANNER, K. u. P. A. BACHMANN (1970):

Vermehrung und Ausbreitung von Schweinepest-Virus, Stamm München-1, in PK(15)-Zellkulturen.

Zbl. Vet. Med. B 17 353-362

DARBYSHIRE, J. H. (1960):

Serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle.

Vet. Rec. 72, 331.

DARBYSHIRE, J. H. (1962):

Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle.

II. A serological relationship between a mucosal disease and swine fever.

Res. Vet. Sci. 3, 125-128.

DENG, R. u. K. V. BROCK (1992):

Molecular cloning and nucleotid sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1.

Virology 191, 867-879

DEPNER, K. R., T. BAUER u. B. LIESS (1992):

Thermal and pH-stability of pestiviruses

Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 11, 885-893

DEPNER, K. R., A. GRUBER u. B. LIESS (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.

I: Clinical, virological and serological findings.

Wien. tierärztl. Mschr. 81, 370-373

DEPNER, K. R., A. RODRIGUEZ, J. POHLENZ u. B. LIESS (1996a):

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.

Europ. J. Vet. Pat. 2, 61-66

DEPNER, K. R., V. MOENNIG u. B. LIESS (1996b):

Epidemiologische Betrachtungen zur "typischen" und "atypischen" Schweinepest.

Amttierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle IV, 335-342

- DEPNER, K. R., U. HINRICHS, K. BICKHARDT, I. GREISER-WILKE, J. POHLENZ, V. MOENNIG u. B. LIESS (1997):
Influence of breed-related factors on the course of classical swine fever virus infection.
Vet. Rec. 140, 506-507
- DINTER, Z. (1963):
Relationship between bovine virus diarrhoea virus and hog cholera virus.
Zbl. Bakteriol. I. Orig. 188, 475-486
- DRÄGER, K., S. KAMPHANS u. W. MAASS (1964):
Bericht über den Einsatz der Schweinepest-Vaccine Suiferin zur Tilgung der Schweinepest in einem bereits infizierten Schweinezuchtbestand Nord-Deutschlands.
Tierärztl. Umschau 19, 405-414
- DUNNE, H. W., A. J. LUEDKE, C. V. REICH u. J. F. HOKANSON (1957):
The in vitro growth of hog cholera virus in cells of peripheral blood.
Am. J. Vet. Res. 17, 502-507
- DUNNE, H. W. (1970):
Hog Cholera.
In: H.W. DUNNE (Hrsg.): Diseases of swine.
Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 3rd Ed., 177-239
- DULBECCO, R. u. G. FREEMAN (1959):
Plaque production by the polyoma virus.
Virology 8, 396-407
- EAGLE, H. (1959):
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science 130, 432-434
- EDWARDS, S. (2000):
Survival and inactivation of classical swine fever virus.
Vet. Micro. 73, 175-181
- EHRENSPERGER, F. (1988):
Immunological aspects of the infection.
In: LIESS, B. (Hrsg.): Classical Swine Fever and Related Viral Infections.
Martinus Nijhoff Publishing, Boston/Dordrecht/Lancaster 143-163

- ELBERS, K., N. TAUTZ, P. BECHER, D. STOLL, T. RÜMENAPF u. H.-J. THIEL (1996):
Processing in the Pestivirus E2-NS2 Region: Identification of proteins p7 and E2p7.
J. Virol. 70, 4131-4135
- ENDERS, J. F. (1954):
Cytopathology of virus infections.
Ann. Rev. of Microbiol. 8, 473-502
- ENZMANN, P.-J. u. D. HÄRTNER (1977):
Studies on the structure of swine fever virus.
In: LIESS, B. (Hrsg.): Hog cholera/classical swine fever and African swine fever.
Commi. Europ. Commu., EUR 5904, 75-85
- ENZMANN, P. J. u. F. WEILAND (1978):
Structural similarities of hog cholera virus with togaviruses.
Arch. Virol. 57, 339-348
- FERRARI, M. (1992):
A tissue culture vaccine with lapinized chinese (LC) strain of hog cholera virus
(HCV).
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 15, 221-228
- FLOEGEL, G., K. R. DEPNER, D. PATON u. F. KOENEN (1998):
Proposal for EU diagnostic manual for classical swine fever (CSF) diagnosis: CSF
virus isolation.
Commi. Europ. Commu., VI/8857/98, 47-49
- FLOEGEL-NIESMANN, G. (2000):
Persönliche Mitteilung am 15. 05. 2000.
- FRENKEL, S., J. G. v. BEKKUM u. H. S. FRENKEL (1955):
On the cultivation of hog cholera virus in swine spleen tissue explantated in a fluid
medium.
Bull. Off. int. Epiz. 43, 327-330
- FROST, J. W., B. LIESS u. D. PRAGER (1977):
Purification and electron microscopical observation of hog cholera.
In: LIESS, B. (Hrsg.): Hog cholera/classical swine fever and African swine fever.
Comm. Europ. Comm., EUR 5904, 23-30

- GREISER-WILKE, I., V. MOENNIG, C. O. Z. COULIBALY, J. DAHLE, L. LEDER u. B. LIESS (1990):
Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein.
Arch. Virol. 111, 213-225
- GREISER-WILKE, I., K. E. DITTMAR, B. LIESS u. V. MOENNIG (1992):
Heterogenous expression of the non-structural protein p80/125 in cells infected with different pestiviruses.
J. gen. Virol. 73, 47-52
- GREISER-WILKE, I., K. DEPNER, J. FRITZEMEIER, L. HAAS u. V. MOENNIG (1998):
Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany.
J. Virol. Micro. Meth. 75, 141-150
- GREISER-WILKE, I., B. ZIMMERMANN, J. FRITZEMEIER, G. FLOEGEL u. V. MOENNIG (2000):
Structure and presentation of a World Wide Web database of CSF virus isolates held at the EU reference laboratory.
Vet. Micro. 73, 131-136
- GRUMMER, B. (1999):
Der Einfluß der Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe auf die Wirtszelle.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- GUSTAVSON, D. P. u. C. M. POMERAT (1956):
Cytopathic changes in tissue culture derived from a pig infected with hog cholera.
Am. J. Vet. Res. 17, 165-173
- GUTEKUNST, D. E. u. W. A. MALMQUIST (1963):
Separation of a soluble antigen and infectious particles of bovine viral diarrhoea viruses and their relationship to hog cholera.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 121-123
- HAFEZ, S. M., K. PETZOLDT u. E. RECZKO (1968):
Morphology of bovine viral diarrhoea virus.
Acta Virol. 12, 471-473

HAFEZ, S. M. u. B. LIESS (1972):

Studies on bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus.

I. Cultural behaviour and antigenic relationship of some strains.

Acta virol. 16, 388-398

HARRIS, M. (1960):

Specificity and cross-reactions in a strain of pig kidney cells resistant to 2,6-Diaminopurine.

Exp. Cell. Res. 21, 439-446

HECKE, F. (1932):

Die künstliche Vermehrung des Schweinepestvirus mittels Gewebekulturen.

Zbl. Bakteriologie. I. Orig. 126, 517-526

HEENE, D., G. HOFFMANN-FEZER, R. HOFFMANN, E. WEISS, G. MÜLLER BERGHAUS u. H. G. LASCH (1971):

Gerinnungsstörungen bei akuter Schweinepest.

Beitr. Pathol. 144, 259-271

HERMANN, W. G. TRAUTWEIN, H. MEYER u. B. LIESS (1980):

Immunpathologische Untersuchungen zur experimentellen diaplazentaren Schweinepestinfektion.

Fortschr. Veterinärmed. 30, 145-147

HESS, R. G., C. O. Z. COULIBALY, I. GREISER-WILKE, V. MOENNIG u. B. LIESS (1988):

Identification of hog cholera viral isolates by use of monoclonal antibodies to pestiviruses.

Vet. Microbiol. 16, 315-321.

HOFFMANN, R., G. HOFFMANN-FEZER, B. KIMETO u. E. WEISS (1971):

Mikrothromben als morphologischer Ausdruck einer Verbrauchskoagulopathie bei akuter Schweinepest.

Zbl. Vet. Med. B. 18, 710-718

HORZINEK, M. C., E. REZKO u. K. PETZOLD (1967):

On the morphology of hog cholera virus.

Arch. Ges. Virusforsch. 21, 475-478

- HORZINEK, M. C., J. MAESS u. R. LAUFS (1971):
Studies on the substructure of togaviruses:
II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea u. hog cholera viruses.
Arch. gesamte Virusforsch. 33, 306-318
- HORZINEK, M. C. (1973):
The structure of togaviruses.
Prog. Med. Virol. 16, 109-156
- HORZINEK, M. C. (1981):
Non-arthropod-borne togaviruses.
Academic Press, London, 65-75
- HORZINEK, M. C. (1991):
Pestiviruses - taxonomic perspectives.
Arch. Virol. [Suppl. 3], 1-5
- KAADEN, O. R. u. S. VAN DAWEN (1983):
Persistierende Virusinfektionen bei Tieren. Mechanismen und Konsequenzen.
Zbl. Vet. Med. B 30, 1-21
- KADEN V., P. HÜBERT, G. STREBELOW, E. LANGE, H. STEYER, u. P. STEINHAGEN
(1999):
Vergleich labordiagnostischer Methoden zum Nachweis einer Infektion mit dem Virus
der Klassischen Schweinepest (KSPV) in der frühen Infektionsphase: Experimentelle
Studie.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 112, 52-57
- KAERBER, G. (1931):
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162, 480-483
- KOPROWSKI, H., T. R. JAMER, H. R. COX (1946):
Propagation of hog cholera virus in rabbits.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 63, 178-183

KORN,G. u. B. ZOETH (1971):

Über die Vermehrung des Schweinepestvirus in einem Stamm von Lymphozyten-Phytozellen und einem Monozytenzellstamm.

Zbl. Bakteriolog. I. Orig. 218, 407-416

KORN,G., W. MATTHAEUS, R. LORENZ u. J. JAKUBIK (1973):

Über eine Globulin- (Transferrin-) und Antikörperbildungsstörung während des Leukopeniestadiums der Schweinepestkrankung.

Z. Immun. Forsch. 145, 139-155

KOSMIDOU, A. (1995):

Differenzierung und Charakterisierung von Isolaten und Mutanten des Schweinepestvirus mittels monoklonaler Antikörper.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

KOSMIDOU, A., M. BÜTTNER u. MEYERS (1998):

Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV).

Arch. Virol. 143, 1295-1309

KUBIN, G. (1964):

Modifizierung eines Schweinepestvirusstammes durch Virusdauerpassagen in Ferkelhodenzellkulturen.

Zbl. Vet. Med. B. 11, 51-59

KUBIN, G. (1965):

Demonstration of swine fever virus in piglet testis cell culture by additional inoculation of culture with teschen disease virus.

Wiener tierärztl. Wschr. 52, 487-496

KUBIN, G. (1967):

In vitro Merkmale des Schweinepestvirus.

Zbl. Vet. Med. B 14, 543-552

KUMAGAI, T., T. SHIMIZU u. M. MATUMOTO (1958):

Detection of hog cholera virus by its effect on newcastle disease virus in swine tissue culture.

Science 128, 366

KUMAGAI, T., T. SHIMIZU, S. IKEDA u. M. MATUMOTO (1961):

A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on newcastle disease virus in swine tissue culture.

J. Immunol. 87, 245-256

LAUDE, H. (1977):

An improved method for purification of classical swine fever virus grown in tissue culture.

In: LIESS, B. (Hrsg.): Hog cholera/classical swine fever and african swine fever.

Commi. Europ. Commu., EUR 5904, 5-22

LIESS, B. u. D. PRAGER (1976a):

Detection of neutralizing antibodies (N.I.F. Test): Use of new technical equipment (CCSC-System) for laboratory swine fever diagnosis.

In: Diagnosis and epizootiology of classical swine fever.

Commi. Europ. Commu., EUR 5486, 187-202

LIESS, B., H. R. FREY, D. PRAGER, S. M. HAFEZ u. ROEDER (1976b):

The course of the natural swine fever and investigations on the development of inapparent SF infections.

In: Diagnosis and epizootiology of classical swine fever.

Commi. Europ. Commu., EUR 5486, 99-113

LIESS, B., H. R. FREY u. D. PRAGER (1977):

Antibody response of pigs following experimental infections with strains of hog cholera virus, bovine viral diarrhoea virus.

In: LIESS, B. (Hrsg.): Agricultural research seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever.

Commi. Europ. Commu., EUR 5904, 200-213

LIESS, B. (1984):

Persistent infections of hog cholera: a review.

Preventive Vet. Med. 2, 109-113

LIESS, B. (1987):

Pathogenesis and epidemiology of hog cholera.

Ann. Rech. Vet. 18, 139-145

LIESS, B. u. V. MOENNIG (1990):

Ruminant pestivirus infection in pigs.

Rev. Sci. Techn., Off. Int. Epiz. 9, 151-161

LIESS, B. (1999):

Persönliche Mitteilung am 21. 01. 1999.

LOAN, R. W. u. P. GUSTAFSON (1961):

Cultivation of hog cholera virus in subculturable swine buffy coat cells.

Am. J. Vet. Res. 22, 741-745

LOAN, R. W. (1964):

Studies on the nucleic acid type and essential content of hog cholera virus.

Am. J. Vet. Res. 25, 1366-1370

LOWINGS P., G. IBATA, J. NEEDHAM u. D. PATON (1996):

Classical swine fever virus diversity and evolution.

J. Gen. Virol. 77, 1311-1321

MAHNEL, H., A. MAYR u. B. BIBRACK (1966):

Züchtung von Schweinepestvirus in Ferkelhodenkulturen mit zytopathogenem Effekt.

Zbl. Vet. Med. B 13, 250-259

MARKOVITS, P. u. J. BIRO (1955):

Propagation of swine fever virus in tissue culture.

Magy Allator Lapja 10, 38-43

MARKWELL, M. A. K., A. PORTNER u. A. L. SCHWARTZ (1985):

An alternative route of infection for viruses; entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a sendai virus mutant lacking its attachment protein.

Proc. Nat. Acad. Sci. 82, 978-982

McCLURKIN, A. W. u. J. O. NORMAN (1966):

Studies on transmissible gastroenteritis of swine.

II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis.

Can. J. Comp. Med. 30, 190-198

McGARRITY, G. J. (1979):

Sources of stable cell lines.

In: W. B. JAKOBY u. I. H. PASTAN (Hrsg.): Meth. Enzymol. Vol. LVIII Cell Culture.

Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 439-444

McKISSICK, G. E. u. D. P. GUSTAFSON (1967):

In vivo demonstration of lability of hog cholera virus to lipolytic agents.

Am. J. Vet. Res. 28, 909-914

MENGELING, W. L., E. C. PIRTLE u. J. P. TORREY (1963):

Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence. Application as a diagnostic and assay method.

Can. J. Comp. Med. 27, 249-252

MENGELING, W. L. u. N. F. CHEVILLE (1968):

Host response to persistent infection with hog cholera virus.

Proc. U.S. Anim. Hlth. Assoc. 72, 283-296

MENGELING, W. L. u. R. A. PACKER (1969):

Pathogenesis of chronic hog cholera: Host response.

Am. J. Vet. Res. 30, 409-417

MENGELING, W. L. u. L. DRAKE (1969):

Replication of hog cholera virus in cell culture.

Am. J. Vet. Res. 30, 1817-1823

MEYER, H., B. LIESS, H. R. FREY, W. HERMANNNS u. G. TRAUTWEIN (1981):

Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs.

IV. Virological and serological studies in newborn piglets.

J. Vet. Med. B 28, 659-668

MEYERS, G., T. RÜMENAPF u. H.-J. THIEL (1989):

Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus.

Virology 171, 555-567

MEYERS, G. u. H.-J. THIEL (1995):

Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles.

J. Virol. 69, 3683-3689

MEYERS, G., H.-J. THIEL u. T. RÜMENAPF (1996):

Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles.

J. Virol. 70, 1588-1595

MITTELHOLZER, C., C. MOSER, J.-D. TRATSCHIN u. M. A. HOFMANN (1997):

Generationen of cytopathogenic subgenomic RNA of classical swine fever virus in persistently infected porcine cell lines.

Virus Res. 51, 125-137

MITTELHOLZER, C., C. MOSER, J.-D. TRATSCHIN u. M. A. HOFMANN (2000):

Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains.

Vet. Microbiol. 74, 293-308

MOENNIG, V. (1988a):

Characteristics of the virus.

In: LIESS, B. (Hrsg.): Classical swine fever and related viral infections.

Martinus Nijhoff Publishing, 55-80

MOENNIG, V., S. R. BOLIN, A. MATEG-ROSELL, N. E. KELSO-GOURLEY, I. GREISER-WILKE u. B. LIESS (1988b):

Identification of a single receptor for bovine viral diarrhea virus (BVDV) on the surface of cultured bovine cells.

Abstr. 88th Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol., 326

MOENNIG, V. (1990):

Pestiviruses: a review.

Vet. Micro. 23, 35-54

- MOENNIG, V. u. P. G. W. PLAGEMANN (1992):
The pestivirus.
Adv. Virus Res. 41, 53-98
- MOORMANN, R. u. M. M. HULST (1988):
Hog cholera virus: identification and characterization of the virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells.
Virus Res. 11, 281-291
- MOORMANN, R. J. M., P. M. WARMERDAM, B. VON DER MEER, W. M. M. SCHAAPERG, G. WENSVOORT u. M. M. HULST (1990):
Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1.
Virology 167, 184-198
- NAKAMURA, S., J. SASAHARA, M. SHIMIZU u. Y. SHIMIZU (1983):
Replication of hog cholera virus in porcine alveolar macrophage cultures.
Natl. Inst. Anim. Health Q. (Japan) 23, 101-102
- NUSSHAG, W. (1927):
Über Ferkelkrankheiten.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 43, 457-461
- PATON, D. J., J. J. SANDS u. P. M. ROCHE (1991):
BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity.
Arch. Virol. Suppl. 3, 47-54
- PATON, D. J., J. J., SANDS u. S. EDWARDS (1994):
Border disease virus: delineation by monoclonal antibodies.
Arch. Virol. 135, 241-252
- PATON D. J., A. MCGOLDRICK, I. GREISER-WILKE, S. PARCHARIYANON, J.Y. SONG, P. P., LIOU, T. STADEJEK, J. P. LOWINGS, H. BJORKLUND u. S. BELAK (2000a):
Genetic typing of classical swine fever virus.
Vet. Microbiol. 73, 137-157

- PATON D. J., A., MCGOLDRICK, S. BELAK, C. MITTELHOLZER, F. KOENEN, H. VANDERHALLEN, M. BIAGETTI, G.-M. DE MIA, T. STADEJEK, M. A. HOFMANN u. B. THUER (2000b):
Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods.
Vet. Microbiol. 73, 159-174
- PATON D. J., A. MCGOLDRICK, E. BENSAUDE, S. BELAK, C. MITTELHOLZER, F. KOENEN, H. VANDERHALLEN, I. GREISER-WILKE, H. SCHEIBNER, T. STADEJEK, M. A. HOFMANN u. B. THUER (2000c):
Classical swine fever virus: a second ring test to evaluate RT-PCR detection methods.
Vet. Microbiol. 77, 71-81
- PIRTLE, E. C. u. A. J. KNIAZEFF (1968):
Susceptibility of cultured mammalian cells to infection with virulent and modified hog cholera virus.
Am. J. Vet. Res. 29, 1033-1040
- PITTLER, H., M. BRACK, L.-CI. SCHULZ, G. ROHDE, K. WITTE u. B. LIESS (1968):
Untersuchungen über die Europäische Schweinepest.
I. Ermittlungen zur gegenwärtigen Seuchensituation in Norddeutschland.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 21, 537-542
- PETERS, W., I. GREISER-WILKE, V. MOENNIG u. B. LIESS (1986):
Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies.
Vet. Microbiol. 12, 195-200
- PLATEAU, E., P. VANNIER u. J. P. TILLON (1980):
Experimental study of a mild virulence strain of hog cholera: Individual variations and horizontal transmission.
Zbl. Vet. Med. B 27, 650-657
- RENARD, A., D. SCHMETZ, C. GUIOT, S. BROWN-SUMMER, L. DAGENAIS, P. P. ASTORET, D. DINA u. J. A. MARTIAL (1985):
Molecular cloning of the bovine viral diarrhoea virus genomic RNA.
Ann. Rech. Vet. 18, 121-125

- REPPIN, K. (1963):
Die Schweinepest in Niedersachsen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 76, 423-425
- ROEHE, P. M., S. EDWARDS (1994):
Comparison of pestivirus multiplication in cells of different species.
Res. Vet. Sci. 57, 210-214
- RESSANG, A. A. (1973):
Studies on the pathogenesis of hog cholera.
II. Virus distribution in tissue and the morphology of the immune response.
Zbl. Vet. Med. B 20, 272-288
- RUGGLI, N., J.-D. TRATSCHIN, C. MITTELHOLZER u. M. A. HOFMANN (1996):
Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA.
J. Virol. 70, 3478-3487
- RÜMENAPF, T., G. MEYERS, R. STARK u. H.-J. THIEL (1989):
Hog cholera virus – characterization of specific antiserum and identification of cDNA clones.
Virology 171, 18-27
- RÜMENAPF, T., G. MEYERS, R. STARK u. H.-J. THIEL (1991):
Molecular characterization of hog cholera virus.
In: LIESS, B., V. MOENNIG, J. POHLENZ, G. TRAUTWEIN (Hrsg.): Ruminant pestivirus infections.
Arch. Virol. [Suppl. 3], 7-18
- RÜMENAPF, T., G. UNGER, J. H. STRAUSS u. H.-J. THIEL (1993):
Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses.
J. Virol. 67, 3288-3294
- SAMEJIMA, T., A. KAWAKUBO, H. KUWAHARE, I. KURATA u. N. HAYASHI (1977):
Studies on the attenuation of hog cholera virus:
I. Continuous cultivation of the virus in established cell lines and kidney cells of various animal origins.
NIBS Bull. Biol. Res. 9, 1-16

- SCHELP, C., I. GREISER-WILKE, G. WOLF, M. BEER, V. MOENNIG u. B. LIESS (1995):
Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection.
Arch. Virol. 140, 1997-2009
- SCHELP, C., I. GREISER-WILKE, V. MOENNIG (2000):
An actin-binding protein is involved in pestivirus entry into bovine cells.
Virus Res. 68, 1-5
- STARK, R., T. RÜMENAPF, G. MEYERS u. H.-J. THIEL (1990):
Genomic localization of HCV Glycoproteins.
Virology 174, 286-289
- TANAKA, Y., Y. INABA, T. OMORI u. M. MATUMOTO (1968):
Bovine diarrhea virus:
III. Physico chemical properties of bovine diarrhea virus.
Jpn. J. Microbiol. 12, 201-210
- TAUTZ, N., H.-J. THIEL, E. J. DUBOVI u. G. MEYERS (1994):
Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion.
J. Virol. 68, 3289-3297
- TAYLOR, D. O. N., D. P. GUSTAFSON u. R. M. CLAFIN (1963):
Properties of some viruses of the mucosal disease - virus diarrhea complex.
Am. J. Vet. Res. 24, 143-149
- TENBROEK, C. (1941):
Cultivation of the hog cholera virus.
J. Exp. Med. 74, 427-432
- TRATSCHIN, J.-D., C. MOSER, N. RUGGLI u. M. A. HOFMANN (1998):
Classical swine fever virus leader proteinase N^{pro} is not required for viral replication in cell culture.
J. Virol. 72, 7681-7684

TRAUTWEIN, G. (1988):

Pathology and pathogenesis of the disease.

In: B. LIESS (Ed.): Classical Swine Fever and Related Viral Infections.

Martinus Nijhoff Publishing, Boston/Dordrecht/Lancaster 27-54

TSUBAKI, S. (1942):

Cultivation of hog cholera.

I. Cultivation of the organism in hog testicular tissue in Tyrode solution. (Saikingaku

Zasshi No. 513, 1938)

Vet. Bull. 12, 212-217

URBANECK, D. (1971):

Stand der Entwicklung und des Einsatzes von Schweinepest-Impfstoffen.

Monatsh. Veterinärmed. 26, 785-792

VAN DER MOLEN, E. J. u. J. T. VAN OIRSCHOT (1981):

Congenital persistent swine fever (hog cholera).

I. Pathomorphological lesions in lymphoid tissues, kidney and adrenal.

Zbl. Vet. Med. B 28, 89-101

VAN OIRSCHOT, J. T. (1977a):

Congenital persistent swine fever infection. Preliminary results.

In: LIESS, B. (Hrsg.): Agricultural research seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever.

Commi. Europ. Commu., EUR 5904, 184-199

VAN OIRSCHOT, J. T. (1977 b):

A congenital persistent swine fever infection.

II. Immune response to swine fever virus and unrelated antigens.

Vet. Microbiol. 2, 133-142

VAN OIRSCHOT, J. T. (1979a):

Experimental production of congenital persistent swine fever infections.

I. Clinical pathological and virological observations.

Vet. Microbiol. 4, 117-132

VAN OIRSCHOT, J. T. (1979b):

Experimental production of congenital persistent swine fever infections.

II. Effects on functions of immune system.

Vet. Microbiol. 4, 133-147

VAN OIRSCHOT, J. T. (1988):

Description of the virus infection.

In: LIESS, B. (Hrsg.): Classical Swine Fever and Related Viral Infections.

Martinus Nijhoff Publishing, Boston/Dordrecht/Lancaster, 1-25

WALLIS, C. u. J. L. MELNICK (1968):

Stabilization of enveloped viruses by dimethyl sulfoxide.

J. Virol. 2, 953-954

WEILAND, E., R. AHL, R. STARK, F. WEILAND u. H.-J. THIEL (1992):

A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus.

J. Virol. 66, 3677-3682

WENGLER, G. (1991):

Family Flaviviridae.

In: FRANCKI, R. I. B., C. M. FAUQUET, D. L. KNUDSON u. F. BROWN (Hrsg.):

Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on taxonomy of viruses.

Springer Verlag, Wien, Arch. Virol. [Suppl. 2], 223-233

WENGLER, G., D. W. BRADLEY, M. S. COLLETT, F. X. HEINZ, R. W. SCHLESINGER

u. J. H. STRAUSS (1995):

Family Flaviviridae.

In: MURPHY F. A., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, S. A. GHABRIAL, A. W.

JARVIS, G. P. MARTELLI, M. A. MAYO u. M. D. SUMMERS (Hrsg.): Virus

Taxonomy. Sixth report of the International Committee on taxonomy of viruses.

Springer Verlag, Wien, New York, 415-427

- WENSVOORT, G., C. TERPSTRA, J. BOONSTRA, M. BLOEMRAAD, D. VAN ZAANE (1986):
Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis.
Vet. Microbiol. 12, 101-108
- WENSVOORT, G., C. TERPSTRA, E. P. DE KLUIJVER, C. KRAGTEN u. J. C. WARNAAR (1989):
Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus.
Vet. Microbiol. 21, 9-20
- WENSVOORT, G., J. BOONSTRA u. B. G. BODZINGA (1990):
Immunaaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of hog cholera virus.
J. Gen. Virol. 71, 531-540
- WESTAWAY, E. G., M. A. BRINTON, S. Y. A. GAIDAMOVICH, M. C. HORZINEK, A. IGARACHI, L. KÄÄRIÄINEN, D. K. LVOV, J. S. PORTERFIELD, P. K. RUSSEL u. D. W. TRENT (1985):
Flaviviridae
Intervirology, 24, 183-192
- WISKERCHEN, M. u. M. S. COLLETT (1991):
Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing.
Virology 184, 341-350
- WITTMANN, W., D. URBANECK, S. TESMER, H. BERGMANN, J. BEYER (1972):
Zur Immunitätsausbildung beim Schwein nach Impfung mit Schweinepest-Lebendvirusvakzine "Riems".
Monatsh. Veterinärmed. 27, 601-606
- XUE, W. u. H. C. MINOCHA (1993):
Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies.
J. Gen. Virol. 74, 73-79

ZEEGERS, J. J. W. u. M. C. HORZINEK (1977):

Some properties of bovine viral diarrhoea virus and hog cholera virus and their RNAs.

In: LIESS, B. (Hrsg.): Agricultural research seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and African Swine Fever.

Commi. Europ. Commu., EUR 5904, 52-57

8. Anhang

8.1 Linienpässe der Zelllinien der BFAV-Insel Riems

Tabelle 15: Linienpaß der Zelllinie Niere/RIE 5-1

Herkunft	Ursprung unbekannt; seit ca. 25 Jahren an der BFAV Insel Riems; Anzucht verschiedener Sublinien in der Zellbank (ZELLBANK/Riebe/1975)
Umsatzverhältnis	1:6 bis 1:10
Wachstums- charakteristika	klare, regelmäßige, polygonale Zellen; in gut begrenzten Kolonien wachsend; Monolayer bei 1:6 nach 72 h konfluent; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 14 d; ältere Kulturen neigen zu Multilayerbildung
Chromosomen	2n = 38; stem-line = 32/51, ein großes metazentrisches Markerchromosom
Virusempfänglich- keit	KSPV, VSV (Indiana), TGEV, PI-3-V., Adeno-V. Typ 3/Rd, PPV (stark abhängig vom Virusstamm)
Latente Viren	im ELMI geringgradig Typ-C Partikel; FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 16: Liniensaß der Zelllinie Niere/RIE 8

Herkunft	Anzucht im Allunionsinstitut für experimentelle Veterinärmedizin (VIEV) Moskau 1968; erhalten 1974 aus dem Staatlichen Kontrollinstitut (GNKI), Moskau
Umsatzverhältnis	1:6 bis 1:8
Wachstumscharakteristika	klare, regelmäßige, polygonale Zellen, in gut begrenzten Kolonien wachsend; bei 1:6 Monolayer nach 56–72 h konfluent; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 14 d; ältere Kulturen neigen zu Multilayerbildung
Chromosomen	2n = 38, stem-line = 41 (~ 38 %)
Virusempfänglichkeit	TGEV, Parvo-V (Schwein), KSPV, PrV, u. a.
Latente Viren	im ELMI geringgradig Typ-C Partikel; FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 17: Linienpaß der Zelllinie Lunge/RIE 113

Herkunft	Lunge eines männlichen Fetus ca. 14 d vor Geburt; Anzucht über Explantatkultur; Linienentwicklung gekennzeichnet von zwei Restriktionsphasen im Bereich der 20. und 40. Subkultur; danach kontinuierliche Kultivierbarkeit; Linie erfüllt alle Parameter der Permanenz (ZELLBANK/Riebe/1983)
Umsatzverhältnis	1:4-1:6
Wachstums- charakteristika	Relativ klare, mittelgroße, etwas derbe, meist spindelförmige Zellen; flächenhaft in lockeren Gruppen wachsend; etwas desorientiertes Gesamtzellbild; Monolayer bei 1:4 nach 56-72 h konfluent; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 10 d
Chromosomen	2n = 38, stem-line = 54/55 (~ 28 %) an 50 Mitosen der 160. Subkultur
Virusempfänglich- keit	KSPV, PrV, TGEV, PRCV ?
Latente Viren	Im ELMI nichts nachweisbar; FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 18: Linienpaß der Zelllinie Vollembryo/RIE 139

Herkunft	2 daumennagelgroße Embryonen am 23. Tag der Trächtigkeit; Gewebesaufschluß der Vollembryonen durch fraktionierte Trypsinierung mit Versen/Trypsin/Gemisch bei Zimmertemp.; diskontinuierliche Linienentwicklung mit deutlicher Restriktionsphase zwischen 12. und 20. Subkultur; Linie erfüllt inzwischen Parameter für permanentes Wachstum (Subkultur > 120); anfängliche Polymorphie der Zelltypen durch relativ einheitlichen fibroblastoiden Zelltyp ersetzt (ZELLBANK/Riebe/1985)
Umsatzverhältnis	1:2 bis 1:6
Wachstumscharakteristika	klare, meist langgestreckte bis polymorphe Zellen; flächenhaft wachsend; anfänglich hoher Rundzellanteil typisch; Monolayer bei 1:4 nach ca. 72 h konfluent; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 10 d
Chromosomen	2n = 38, stem-line = 31/32 (~ 18 %) an 50 Mitosen der 72. Subkultur
Virusempfänglichkeit	TGEV, PCV, andere nicht geprüft
Latente Viren	FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 19: Linienpaß der Zelllinie Thymus/RIE 169

Herkunft	Thymi dreier Feten ca. 1 Woche vor Geburt; Aufschluß des Gewebes durch fraktionierte Trypsinierung mit einem Gemisch von Versen/Trypsin; Alteration zur Permanenz ohne auffällige Restriktionsphase nach Änderung der Morphologie; nach anfänglicher Umsatzrate von 1:2 später 1:4 möglich; Subkulturen > 125 vorliegend (ZELLBANK/Riebe/1987)
Umsatzverhältnis	1:2 bis 1:4
Wachstumscharakteristika	langgestreckte, klare, flächenhaft wachsende Zellen mit leichter Orientierung; Monolayer bei 1:4 nach ca. 56–72 h konfluent; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 14 d
Chromosomen	2n = 38, stem-line = 38 (~ 32 %) an 50 Mitosen der 3. Subkultur
Virusempfänglichkeit	KSPV, VSV (Indiana), TGEV, PI-3-V., Adeno-V. Typ 3/Rd, PPV (stark abhängig vom Virusstamm)
Latente Viren	FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 20: Linienpaß der Zelllinie Hoden/RIE 170

Herkunft	Hoden dreier Feten ca. 1 Woche vor Geburt; Aufschluß der etwa erbsengroßen Organe mit Versen/Trypsin; kontinuierliche Linienentwicklung mit deutlicher Restriktionsphase zwischen 30. und 40. Subkultur; Alteration zur Permanenz vermutlich zwischen 30. und 50. Subkultur verbunden mit prägnanter Veränderung der Morphologie von anfänglich starker Polymorphie (epitheloid-polymorphe und fibroblastoide Elemente) zu recht einheitlichem epitheloidem Zelltyp; nach anfänglichen Umsatzraten von 1:2 später von 1:3 bis 1:6 möglich; Subkulturen > 160 vorliegend (ZELLBANK/Riebe/1987)
Umsatzverhältnis	1:4 bis 1:8
Wachstums- charakteristika	klare, relativ kleine, polygonale Zellen, in gut begrenzten großen Kolonien aufeinander zuwachsend; Monolayer bei 1:4 nach 48–56 h konfluent; sehr dicht wachsend; regelmäßiges Gesamtzellbild; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 14 d; bei älteren Kulturen Multilayerbildung möglich; obere Schichten schwimmen häufig ab
Chromosomen	2n = 38, stem-line = 38 (~ 40 %) an 50 Mitosen der 100. Subkultur
Virusempfänglich- keit	KSPV, Influenza-V. (Schwein u. Mensch), Teschen/Talfan-V., keine Vermehrung von TGEV und Parvo-V. nachweisbar
Latente Viren	FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ; Revertase-Test neg.

Tabelle 21: Linienpaß der Zelllinie Nabelvenenendothel/RIE 245

Herkunft	Zellgemisch aus zwei ca. 5 cm langen Nabelvenenstücken zweier Schweinefeten etwa 24 h vor Geburt; Präparation: nach mehrfachem Spülen und Abbinden der Enden Injektion von Versen/Trypsin; nach 10–15 min Einwirkungszeit Gewinnung der Zellsuspension; mehrfache Wiederholung des Vorgangs: Zentrifugation, Aussaat; Linienentwicklung nicht abgeschlossen; Alteration zur Permanenz sehr wahrscheinlich (ZELLBANK/Riebe/1991)
Umsatzverhältnis	1:2
Wachstums- charakteristika	klare, zarte, langgestreckt-vielgestaltige Zellen; eingestreute Rundzellen typisch; flächenhaft einzeln wachsend; Monolayer bei 1:4 nach 72–96 h konfluent; lockeres, wabiges Gesamtzellbild, Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 14 d
Chromosomen	2n = 38, stem-line 38 (~ 52 %) an 50 Mitosen in 15. Subkultur
Virusempfänglich- keit	KSPV, VSV (Indiana), TGEV, PI-3-V., Adeno-V. Typ 3/Rd, PPV (stark abhängig vom Virusstamm)
Latente Viren	im ELMI nichts nachweisbar; FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 22: Linienpaß der Zelllinie Eileiter/RIE 270

Herkunft	Fa. Bio-Serv, Rostock, Labor Dr. W. Latzke, 1993; Anzucht aus Zellaggregaten nach 4 °C-Übernacht-Trypsination eines mit Versen/Trypsin gefüllten Eileiters; Mischpopulation mit langgestreckt wachsenden, fibroblastoiden Zelltypen durchsetzt; Fibroblastendeprivation durch Serumreduktion; etwa ab 5. Subpassage Reinkultur
Umsatzverhältnis	1:2
Wachstumscharakteristika	klare, mittelgroße, im geschlossenen Monolayer puzzleartig verzahnte Zellen mit stark lichtbrechenden Auflagerungen; Monolayer bei 1:2 nach ca. 72 h konfluent; Mediumwechsel nach 3–4 d vorteilhaft; Subkultivierung in wöchentlichem Abstand
Chromosomen	2n = 38, stem-line der 37. Subkultur 38 (~ 80 %)
Virusempfänglichkeit	bisher keine Untersuchungen
Latente Viren	FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 23: Liniensaß der Zelllinie Hoden/RIE 278

Herkunft	USA, ATCC, CRL 1746; PEI Langen, Labor Dr. Anduleit; 1994 zur Zellbank (nach 5 Subkulturen); (McCLURKIN und NORMAN, 1966)
Umsatzverhältnis	1:3 bis 1:8
Wachstums- charakteristika	klare, relativ kleine, meist polygonale, weniger längliche Zellen; flächenhaft und in kleinen Gruppen wachsend; Monolayer bei 1:3 nach ca. 56 h konfluent; sehr dicht wachsend; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 10 d
Chromosomen	bisher keine eigenen Untersuchungen
Virusempfänglich- keit	laut ATCC: TGEV, PPV, porcines Enterovirus, PrV
Latente Viren	FAT gegen BVDV und Circo-V. und in PCR negativ

Tabelle 24: Linienpaß der Zelllinie Nasenschleimhaut/RIE 541

Herkunft	Nasenschleimhaut eines adulten Schweines; Anzucht der Zellen über Explantatkultur; nach Auswachsen morphologisch verschiedener Zelltypen Selektion von polygonal-polymorpher Population für Linienentwicklung; ausgeprägte Restriktionsphase nach 12. und etwa 30. Subkultur mit deutlicher Änderung der Morphologie; Subkulturen > 60 vorliegend; Linienentwicklung nicht abgeschlossen (ZELLBANK/Riebe/1998)
Umsatzverhältnis	1:2
Wachstumscharakteristika	klare, langgestreckt-polymorphe Zellen; Wachstum beginnt flächenhaft; Monolayer bei 1:2 nach ca. 48–56 h konfluent; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 10 d
Chromosomen	bisher nicht untersucht
Virusempfänglichkeit	PrV, KSPV, andere nicht geprüft
Latente Viren	FAT gegen BVDV und Circo-V. und in PCR negativ, andere nicht untersucht

Tabelle 25: Linienpaß der Zelllinie Gehirn/RIE 565

Herkunft	Stammhirn eines ca. 8 Wochen alten Absatzferkels; Aufschluß des Organs durch fraktionierte Trypsinierung; in Primär- bis Tertiärkultur gutes Wachstum vorwiegend polymorpher Zellen unterschiedlichen Typs; danach abrupte, ausgeprägte Restriktionsphase mit völliger Stagnation; ca. 5 Monate alte Zellkolonie bildete Ausgang für weitere und bisher kontinuierliche, aber nicht abgeschlossene Linienentwicklung; Konserven > 70. Subkultur vorliegend, Alteration zur Permanenz sehr wahrscheinlich (ZELLBANK/Gerds/Schmidt/Riebe/1998)
Umsatzverhältnis	1:4 bis 1:6
Wachstums- charakteristika	klare, langgestreckte Zellen; anfangs in gut begrenzten eckigen Kolonien wachsend; Monolayer bei 1:6 nach ca. 56–72 h konfluent; dicht wachsend mit deutlicher Orientierung; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 14 d
Chromosomen	bisher nicht untersucht
Virusempfänglich- keit	PrV; andere bisher nicht untersucht
Latente Viren	FAT gegen BVDV und Circo-V. und in PCR negativ, andere nicht untersucht

Tabelle 26: Linienpaß der Zelllinie Gehirn/RIE 378

Herkunft	Kleinhirne von 1 männlichen und 3 weiblichen Schwarzwildfeten ca. 3 Wochen vor Geburt; Anzucht des Gewebes nach fraktionierter Trypsinierung bei Zimmertemperatur; Linienentwicklung kontinuierlich bis auf kurze, aber deutliche Restriktionsphase zwischen 12. und 18. Subkultur; nach anfänglich starker Polymorphie überwiegen ab etwa der 30. Subkultur relativ große, polygonale bis fibroblastoide Zellen; Linie erfüllt allgemeine Parameter der Permanenz (ZELLBANK/Riebe/1996)
Umsatzverhältnis	1:4
Wachstumscharakteristika	klare, relativ große, polygonale bis langgestreckte Zellen; flächenhaft, in sternförmigen Gruppen wachsend; Monolayer bei 1:4 nach ca. 56–72 h konfluent; zwischenzeitlicher Mediumwechsel kann angezeigt sein; ältere Kulturen neigen zu Haufenbildung
Chromosomen	Untersuchungen nicht abgeschlossen
Virusempfänglichkeit	KSPV; andere bisher nicht geprüft
Latente Viren	FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 27: Linienpaß der Zelllinie Lunge/RIE 379

Herkunft	Lungen dreier Schwarzwildfeten ca. 3 Wochen vor Geburt; Aufarbeitung des Gewebes über fraktionierte Trypsinierung; kontinuierliche Linienentwicklung ohne auffällige Restriktionsphase; deutliche Änderung der Morphologie nach etwa der 30. Subkultur von anfänglich fibroblastoid-polymorph zu reinem epitheloiden Zelltyp; Linie erfüllt allgemeine Parameter der Permanenz (ZELLBANK/Riebe/1996)
Umsatzverhältnis	1:3
Wachstumscharakteristika	klare, mittelgroße, polygonale Zellen; Wachstum beginnt mit gut begrenzten Kolonien; Monolayer bei 1:3 nach ca. 56–72 h konfluent; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 10 d
Chromosomen	Auswertung nicht abgeschlossen
Virusempfänglichkeit	KSPV, andere bisher nicht geprüft
Latente Viren	FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

Tabelle 28: Linienpaß der Zelllinie Haut/RIE 388

Herkunft	Haut eines männlichen Schwarzwildfetus ca. 3 Wochen vor Geburt; Anzucht des Gewebes über Explantatkultur; Linienentwicklung diskontinuierlich mit zwei deutlichen Restriktionsphasen (zwischen 12. u. 15. bzw. 40. u. 50. Subkultur), Linie erfüllt allgemeine Parameter der Permanenz (ZELLBANK/Riebe/1996)
Umsatzverhältnis	1:2 bis 1:4
Wachstumscharakteristika	klare, langgestreckte bis polymorphe Zellen; flächenhaft mit leichter Orientierung wachsend; Monolayer bei 1:4 nach ca. 48-56 h konfluent; Haltbarkeit nach EM-Wechsel ca. 10 d; stärkere Polymorphie bei sehr jungen Passagen
Chromosomen	Auswertung nicht abgeschlossen
Virusempfänglichkeit	KSPV; andere bisher nicht geprüft
Latente Viren	FAT gegen acht porcine (KSPV, Adeno-V., Rota-V., HEV, TGEV, Parvo-V., Enteroviren und Circo-V. [Typ 1 und 2]) und zehn bovine (BHV-1, Rota-V., Corona-V., BRSV, BVDV, BPIV-3, BLV, Reo-V. [Typ 1], Adeno-V. und BSV) Viren negativ

8.2 Zusammensetzung der verwendeten Medien und Reagenzien

8.2.1 Zellkulturmedien

MEM (minimum essential medium)-Earle

(Medium für Zelllinie Niere/PK(15)A)

MEM-Earle-Fertigpulver ¹	9,60 g
NaHCO ₃	2,20 g
Aqua bidest. ster.	ad 1000,00 ml
Fetales Kälberserum ²	50 ml

Der pH-Wert wurde durch CO₂-Begasung auf 7,0 eingestellt.

MEM-Earle/L-15 Leibovitz

(Medium für Zelllinie Hoden/STE)

MEM-Earle-Fertigpulver	4,88 g
L-15 Leibovitz ³	7,08 g
Tryptose ⁴	2,95 g
Aqua bidest. ster.	ad 900,00 ml
Pferdeserum ⁵	100 ml

Der pH-Wert wurde durch CO₂-Begasung auf 7,2 eingestellt.

¹ Fa. Gibco BRL, Eggenstein, Kat.-Nr. 61100-087

² Fa Biochrom, Berlin, Kat.-Nr. 0115

³ Fa. Biochrom KG, Berlin, Kat.-Nr. T 437-10

⁴ Fa. Difco, Detroit, Michigan, USA, Kat.-Nr. 0060-17

⁵ Fa. Biochrom KG, Berlin, Kat.-Nr. S 9135

MEM-Earle/MEM-Hanks

(Medium für Zelllinien der Zellbank BFAV Insel Riems)

MEM-Earle-Fertigpulver	4,76 g
MEM-Hanks-Fertigpulver ⁶	5,32 g
NaHCO ₃	1,52 g
Nichtessentielle Aminosäuren ⁷	10 ml
Natrium-Pyruvat ⁸	0,6 g
Aqua bidest. ster.	ad 900,00 ml
Fetales Kälberserum	100 ml

Der pH-Wert wurde durch CO₂-Begasung auf 7,2 eingestellt.

Einfrriermedium

Medium der Zellbank BFAV Insel Riems	925,00 ml
DMSO ⁹	75 ml

⁶ Fa. Gibco BRL, Eggenstein, Kat.-Nr. 41200-080

⁷ Biochrom KG, Kat.-Nr. K0293

⁸ Fluka, Kat.-Nr. 15990

⁹ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Prod.-Nr. D 5879

EDulb (EMEM [*Eagle's minimum essential medium*], modifiziert nach DULBECCO und FREEMAN [1959])

(Medium für die Titrationsen)

EDulb-Pulvermedium ¹⁰	13,53 g
NaHCO ₃	2,20 g
Penicillin G ¹¹	0,06 g
Streptomycin Sulfat ¹²	0,05 g
Aqua bidest. ster.	ad 1000,00 ml

Der pH-Wert wurde durch CO₂-Begasung auf 6,9 eingestellt.

ELA (*Earle's Salzlösung mit Lactalbuminhydrolysat*)

(Medium für die Herstellung von Organhomogenat)

NaCl	6,80 g
KCl	0,40 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,14 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,27 g
NaHCO ₃	0,10 g
Glukose	1,00 g
Phenolrot ¹³	0,02 g
Lactalbuminhydrolysat ¹⁴	5,00 g
Aqua bidest. ster.	ad 1000,00 ml

¹⁰ Fa. Serva, Heidelberg, Art.-Nr. 47303

¹¹ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Prod.-Nr. P 3032

¹² Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Prod.-Nr. S 9137

¹³ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 7241

¹⁴ Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, USA, Art.-Nr. 5996-01

8.2.2 Reagenzien

8.2.2.1 Puffer

Elektrodenpuffer (pH-Wert: 8,5)

Glycin	14,41 g
SDS	1,00 g
Tris-HCl	3,03 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml

PBS (Phosphatpuffer pH 7,0-7,2; DULBECCO u. VOGT (1954))

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,37 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,13 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10 g
Aqua bidest. ster.	ad 1000,00 ml

PBS/Tween

PBS	1000,00 ml
Tween® 20 ¹⁵	100,00 µl

¹⁵ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr 109280

PBSM (Phosphatpuffer ohne Kalzium und Magnesium mit Phenolrot und Dextrose, pH 7,3)

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,37 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Dextrose	1,00 g
Phenolrot	0,016 g
Aqua bidest. ster.	ad 1000,00 ml

8.2.2.2 Lösungen

ATV (adjusted trypsin-versen)-Lösung

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
NaHCO ₃	0,58 g
Dextrose	1,00 g
EDTA (Versen)	0,20 g
Trypsin(3U/mg) ¹⁶	0,50 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 ml

Lagerung bei -20 °C, nicht erneut einfrieren.

AEC-Lösung

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) ¹⁷	20,00 mg
Dimethylformamid	3,00 ml
Natriumazetat-Puffer	ad 50,00 ml
H ₂ O ₂ (3 %)	0,40 ml

1000 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol und 150 ml Dimethylformamid wurden für 3 Monate bei 4 °C gelagert.

Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenztechnik

Ziege-anti-Maus-IgG mit Cy3 ¹⁸	5,00 µl
PBSM, filtriert	ad 1,00 ml

¹⁶ Fa. Serva, Heidelberg, Art.-Nr. 37290

¹⁷ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Prod.-Nr. A 5754

¹⁸ Fa. Dianova, Hamburg, Prod.-Nr. 115-165-062

8.3 Sonstige Chemikalien

Calciumchlorid	Merck, Darmstadt,	102083
Dextrose	Riedel-de Haen, Seelze,	16325
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt,	103053
EDTA	Merck, Darmstadt,	108418
Glycin	Jürgens, Hannover	4201.1000
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt,	104934
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt,	112034
(Di)Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt,	105109
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt	814733
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt,	106067
Natriumazetat	Merck, Darmstadt,	101539
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt,	1.06404.5004
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe	2326.2
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt	106329
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	106352
Tris(hydroxymethyl)aminomethan p. A.	Merck, Darmstadt,	1.08382
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt,	107209

8.4 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Autoklaven

Autoklav 17 Melag, Berlin

Inkubator

CO₂-Inkubator Typ B 5060 EK/CO₂ Heraeus, Hanau

Ständer für Einfrierröhrchen

Kryo-Vials Support Rack Greiner, Nürtingen

Mikroskope

Inverses Mikroskop (715075) Leitz, Wetzlar

pH-Meter

Calimatic 766 H. Jürgens, Hannover

Pipetten

Pipetman, P20, P100, P200, P1000 ABIMED Analysen Technik GmbH, Langenfeld

Digitale 12-Kanal Pipette Finland Labsystems for Flow Laboratories

Pipettierhilfen

pipetus[®]-standard Hirschmann Laborgeräte

Pipetboy plus[®] Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz

Reibschale und Pistill

Reibschale (Durchmesser 63 mm) Landgraf Laborgeräte, Langenhagen

Pistill (Kopfdurchmesser 30 mm) Landgraf Laborgeräte, Langenhagen

Sicherheitswerkbänke

NUAIRE[™] Klasse II Typ A/B3 NUAIRE, Plymouth, Minnesota, USA

Zählkammer

Thoma	H. Jürgens, Hannover
Neubauer improved	Landgraf Laborgeräte, Langenhagen

Trockenschrank (80 °C)

Ehret, Emmerdingen

Waagen

1213 MP	Sartorius GmbH, Göttingen
---------	---------------------------

Wasserbäder

Type 1003	Gesellschaft für Labortechnik m.b.H, Burgwedel
-----------	--

Zentrifugen

Labofuge 400R	Heraeus-Christ GmbH, Osterode/Harz
---------------	------------------------------------

8.5 VerbrauchsmittelEinfrierröhrchen

Kryo-Vials 2 ml	Greiner, Nürtingen	126263
-----------------	--------------------	--------

Gewebekulturflaschen

Gewebekulturflaschen 50 ml	Greiner, Nürtingen	690160
----------------------------	--------------------	--------

Gewebekulturflaschen 250 ml	Greiner, Nürtingen	658170
-----------------------------	--------------------	--------

Gewebekulturröhrchen

Greiner, Nürtingen	163160
--------------------	--------

Gewebekulturschalen

Durchmesser 60 mm	Nunc GmbH, Wiesbaden	150288
-------------------	----------------------	--------

Pipettenspitzen

Volumen bis 1000 μ l	Lab, Degersheim, Schweiz	961702602
Volumen bis 200 μ l	ratiolab, Dreilich	2100601

Polystyrolmikrotiterplatten

Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen	653190
Makrotiterplatten	Greiner, Nürtingen	662160

8.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Permanente Zelllinien vom Haus- und Wildschwein	37
Tabelle 2:	Isolate, deren maximaler Virustiter in der Referenzzellinie PK(15)A bzw. STE $\leq 10^3$ KID ₅₀ /ml betrug.....	39
Tabelle 3:	Isolate, bei denen der Virusnachweis in den Referenzzellinien nur sporadisch oder nicht geführt werden konnte.	39
Tabelle 4:	Organmaterialien, aus denen das KSPV mit der Referenzzellinien PK(15)A isoliert werden konnte.....	40
Tabelle 5:	Zelllinien, die unter Diagnostikbedingungen untersucht wurden	49
Tabelle 6:	Morphologie der verwendeten Zelllinien und Charakterisierung nach Zytokeratinfärbung.	55
Tabelle 7:	Virustiter [\log_{10} KID ₅₀ /ml], die 48 h nach Infektion der 13 permanenten porzinen Zelllinien und der Referenzzellinien mit dem Virusstamm EYSTRUP erreicht wurden.....	60
Tabelle 8:	Virustiter [\log_{10} KID ₅₀ /ml], die 120 h nach Infektion der 13 permanenten porzinen Zelllinien und der Referenzzellinien mit dem Virusstamm EYSTRUP erreicht wurden.....	61
Tabelle 9:	Virustiter [\log_{10} KID ₅₀ /ml], die 48 h nach Infektion der 13 permanenten porzinen Zelllinien und der Referenzzellinien mit dem Virusstamm C-STAMM erreicht wurden.....	62
Tabelle 10:	Virustiter [\log_{10} KID ₅₀ /ml], die 120 h nach Infektion der 13 permanenten porzinen Zelllinien und der Referenzzellinien mit dem Virusstamm C-STAMM erreicht wurden.....	63
Tabelle 11:	Zellzahlen der nicht infizierten und infizierten Kulturen 48 h und 120 h p. i. auf einer Grundfläche von 25 cm ²	68
Tabelle 12:	Virustiter von Isolaten, deren maximaler Virustiter in Voruntersuchungen mit den Referenzzellinien NIERE/PK(15)A bzw. HODEN/STE 72 h p. i. $\leq 10^3$ KID ₅₀ /ml war.....	74

Tabelle 13:	Virustiter von Isolaten, bei denen in Voruntersuchungen der Virusnachweis in den Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A bzw. HODEN/STE nur sporadisch oder nicht geführt werden konnte.....	74
Tabelle 14:	Virustiter nach Virusisolierung aus Organhomogenat.....	75
Tabelle 15:	Linienpaß der Zelllinie Niere/RIE 5-1	114
Tabelle 16:	Linienpaß der Zelllinie Niere/RIE 8	115
Tabelle 17:	Linienpaß der Zelllinie Lunge/RIE 113	116
Tabelle 18:	Linienpaß der Zelllinie Vollembryo/RIE 139	117
Tabelle 19:	Linienpaß der Zelllinie Thymus/RIE 169	118
Tabelle 20:	Linienpaß der Zelllinie Hoden/RIE 170.....	119
Tabelle 21:	Linienpaß der Zelllinie Nabelvenenendothel/RIE 245	120
Tabelle 22:	Linienpaß der Zelllinie Eileiter/RIE 270.....	121
Tabelle 23:	Linienpaß der Zelllinie Hoden/RIE 278.....	122
Tabelle 24:	Linienpaß der Zelllinie Nasenschleimhaut/RIE 541	123
Tabelle 25:	Linienpaß der Zelllinie Gehirn/RIE 565	124
Tabelle 26:	Linienpaß der Zelllinie Gehirn/RIE 378	125
Tabelle 27:	Linienpaß der Zelllinie Lunge/RIE 379	126
Tabelle 28:	Linienpaß der Zelllinie Haut/RIE 388.....	127

8.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wachstumskurven der Referenzzelllinien NIERE/PK(15)A, HODEN/STE und NIERE/5-1.	56
Abbildung 2: Virustiterverlauf über 120 h der mit dem Virusstamm EYSTRUP infizierten Referenzzelllinien.	58
Abbildung 3: Virustiterverlauf über 120 h der mit dem Virusstamm C-STAMM infizierten Referenzzelllinien.	58
Abbildung 4: Vergleich der Virustiter 72 h p. i. nach simultaner und sukzessiver Infektion mit dem Virusstamm C-STAMM.	70
Abbildung 5: Vergleich der Virustiter 120 h p. i. nach simultaner und sukzessiver Infektion mit dem Virusstamm C-STAMM.	70
Abbildung 6: Vergleich der Virustiter 72 h p. i. und 120 h p. i. nach simultaner Infektion mit dem Virusstamm C-STAMM.	71
Abbildung 7: Vergleich der Virustiter 72 h p. i. und 120 h p. i. nach sukzessiver Infektion mit dem Virusstamm C-STAMM.	71
Abbildung 8: Anteil von freiem Virus (positiver Wert) und zellgebundenem Virus (negativer Wert) des Virusstammes EYSTRUP in Zellkulturen der Zelllinie NIERE/8.	77
Abbildung 9: Anteil von freiem Virus (positiver Wert) und zellgebundenem Virus (negativer Wert) des Virusstammes EYSTRUP in Zellkulturen der Zelllinie HODEN/STE.	78
Abbildung 10: Anteil von freiem Virus (positiver Wert) und zellgebundenem Virus (negativer Wert) des Virusstammes EYSTRUP in Zellkulturen der Zelllinie HODEN/278.	78

Veröffentlichung

Erste Ergebnisse dieser Arbeit sind vorab veröffentlicht worden:

FISCHER, S., R. RIEBE, K. R. DEPNER, G. FLOEGEL-NIESMANN, I. GREISER-WILKE

(2000):

Examination of cells of different origin for their susceptibility to classical swine fever virus.

Commi. Europ. Commu., SANCO/2598/2000, 31-32

Mein besonderer Dank gilt

Frau Priv.-Doz. Dr. I. Greiser-Wilke, meiner Doktormutter, für das interessante Thema sowie für ihre engagierte wissenschaftliche und menschliche Förderung und Betreuung;

Herrn Prof. Dr. V. Moennig für die freundliche Aufnahme im Institut für Virologie;

Herrn Dr. R. Riebe – der mit der Führung der Zellbank der BFAV Insel Riems die Voraussetzung für das Zustandekommen dieser Arbeit geschaffen hat –, für seine Unterstützung beim Umgang mit Zellkulturen und die hervorragende Begleitung dieses Teils der Arbeit.

Herrn Dr. K. R. Depner, für die engagierte Betreuung des virologischen Teils der Arbeit und für seine jederzeit gewährte freundschaftliche und fachliche Unterstützung;

Frau U. Pohlenz, die durch ihre gewissenhafte, zuverlässige Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat;

Frau Dr. B. Grummer für ihre freundschaftliche und fachliche Hilfe bei allen Problemen, die die Arbeit mit sich brachte;

Frau Dr. G. Floegel-Niesmann, Herrn Dr. H.-R. Frey und Herrn Dr. J. Fritzeimer für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre Hilfestellung in methodischen Fragen;

Herrn Dr. M. Beyerbach, Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung, für die Lösung statistischer Fragen;

Frau G. Müller für ihre freundliche Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche;

allen Mitarbeitern der Zellbank für die freundliche Aufnahme und die Bereitstellung der Zellkulturen;

Frau B. Herzog für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor;

allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für ihr Entgegenkommen und ihre Hilfsbereitschaft;

meiner lieben Familie für ihre Unterstützung und Geduld

und allen Freunden.