

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden)  
und dem Zentralinstitut des Tiergesundheitsdienstes Bayern e.V., Grub

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Uwe Truyen

Untersuchungen der genetischen Varianz aktueller Isolate des  
porzinen Parvovirus

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**von  
Pia Zimmermann  
aus  
München**

**München 2003**

---

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. U. Truyen

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	5
2.	Schrifttum.....	6
2.1	Entdeckung des porzinen Parvovirus (PPV) .....	6
2.2	Klassifikation .....	7
2.3	Morphologie .....	8
2.4	Genomorganisation .....	11
2.5	Virale Proteine.....	12
2.6	Replikation .....	14
2.7	Pathogenese und Klinik der Infektion mit porzinen Parvovirus .....	17
2.8	Diagnose.....	22
2.9	Verbreitung und Bekämpfung .....	23
3.	Material und Methoden .....	25
3.1	Polymerase-Kettenreaktion .....	25
3.1.1	Probenauswahl und Aufreinigung.....	25
3.1.2	Nachweis von PPV .....	31
3.2	Gelelektrophorese.....	34
3.3	PCR-Reaktionsansätze zur Sequenzierung .....	35
3.3.1	Sequenzierung des IDT-Virus.....	35
3.3.2	Sequenzierung des Kapsids der Feldisolate .....	36
3.3.3	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	36
3.4	Klonierung viraler DNA.....	37
3.4.1	Ligation .....	38
3.4.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	38
3.4.3	Transformation kompetenter Bakterien .....	38
3.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien .....	38
3.5	DNA-Sequenzierung .....	39
3.6	Zellkultur .....	40
3.6.1	Kultivierung von STE-Zellen.....	41
3.6.2	Kultivierung von PK15-Zellen.....	42
3.6.3	Kultivierung von SPEV-Zellen .....	42
3.7	Virusisolierung .....	43
3.7.1	Virusanzucht.....	43

## Inhaltsverzeichnis

---

3.7.2	Verwendete Virusisolate .....	44
3.7.3	Virustitration und Bestimmung der KID <sub>50</sub> .....	44
4.	Ergebnisse .....	46
4.1	Probenvorbereitung .....	46
4.1.1	Nachweis von PPV mit der TaqMan <sup>®</sup> -PCR .....	46
4.1.2	Nachweis des porcinen Parvovirus mit dem LightCycler <sup>®</sup> (Etablierungsversuch) ...	50
4.1.3	Qualitative PCR .....	51
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen auf porcines Parvovirus ....	52
4.2	Anzucht von Feldisolaten des porcinen Parvovirus .....	53
4.3	Sequenzierung .....	57
4.3.1	Impfstamm .....	57
4.3.2	Zwei Isolate aus England .....	58
4.3.3	Kapsidbereich der Feldisolate .....	58
4.4	Sequenzanalyse .....	60
4.4.1	Nukleinsäuresequenzen der Strukturproteine VP1/VP2 .....	60
4.4.2	Aminosäuresequenz der Strukturproteine VP1/VP2 .....	67
5.	Diskussion .....	82
5.1	Häufigkeit von porcinem Parvovirus bei Reproduktionsstörungen .....	82
5.2	Virusisolierung .....	86
5.3	Mögliche Auswirkungen von Punktmutation in publizierten Primersequenzen .....	87
5.4	Besonderheit von NADL-2 am 5'-Ende des Genoms .....	88
5.5	Sequenzanalyse des Strukturproteingenoms .....	88
6.	Zusammenfassung .....	93
7.	Summary .....	94
8.	Materialliste .....	95
8.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	95
8.2	Chemikalien, Puffer und Lösungen .....	97
9.	Abkürzungsverzeichnis .....	101
10.	Literaturverzeichnis .....	104
	Lebenslauf .....	120

## 1. Einleitung

Das porcine Parvovirus (PPV) gehört innerhalb der Subfamilie der *Parvovirinae* zu der Familie der *Parvoviridae*. Dazu zählen bedeutende Krankheitserreger verschiedener Tierarten, wie zum Beispiel das canine Parvovirus (CPV), felines Parvovirus (FPV), das Virus der Aleutenkrankheit der Nerze und das Minute Virus of Mice (MVM).

Das porcine Parvovirus hat bei Schweinen eine enorme wirtschaftliche Bedeutung, da es die Hauptursache für Fruchtbarkeitsstörungen darstellt. In der Regel verläuft eine Infektion klinisch inapparent, aber eine Erstinfektion mit PPV bei tragenden Sauen kann zu einer klinischen Manifestation führen. Der Verlauf der Erkrankung hängt dabei entscheidend vom Zeitpunkt der Infektion ab. Bis zum 65. Tag der Trächtigkeit sind die Feten noch nicht immunkompetent und es kommt zum Fruchttod mit anschließender Resorption oder Abort der Ferkel. Klassische Symptome der Erkrankung sind die Mumifikation der Früchte, gehäuft auftretende kleine Würfe und Umrauschen. Ab dem 65. Tag reagieren die Feten mit einer starken Immunantwort und Eliminierung des Erregers.

Über die Häufigkeit der Beteiligung von PPV an Aborten liegen kaum Informationen vor. Es wurden Feldstudien in den USA, Niederlande, der Schweiz und in Dänemark durchgeführt. Die Angaben variierten zwischen 4,5 und 48%. Für Deutschland sind vergleichbare Informationen nicht verfügbar.

Um die hohen wirtschaftlichen Verluste zu begrenzen ist das konsequente Einhalten einer Impfstrategie unerlässlich. In Europa sind allerdings nur Vakzinen aus inaktivierten Viren zugelassen. Die meisten dieser kommerziellen Impfstoffe basieren auf älteren Isolaten.

Tatsächlich gibt es nur ausgesprochen wenige Untersuchungen, die sich mit der antigenen Variabilität von PPV beschäftigen. Die einzige Studie, in der Feldisolate genauer charakterisiert werden, wurde im Jahr 1996 in Kanada durchgeführt. Es wurden 15 kanadische Feldisolate mit dem virulenten PPV-Stamm Kresse und mit dem avirulenten Stamm NADL-2 verglichen. Obwohl höchstens 5 Aminosäuren ausgetauscht wurden, sind die biologischen Eigenschaften dieser beiden Viren sehr unterschiedlich.

Diese Arbeit hat zum Ziel, zum einen die Verbreitung des PPV in Süddeutschland zu bestimmen, und zum anderen durch Sequenzvergleiche aktueller Isolate mit gebräuchlichen Vakzinestämmen eine mögliche antigene Diversität dieser Viren zu untersuchen.

## 2. Schrifttum

### 2.1 Entdeckung des porzinen Parvovirus (PPV)

Erstmals im Jahre 1964 wurde die Problematik von Kontaminationen primärer und sekundärer Zellkulturen vom Schwein mit einem unbekanntem Virus bekannt (Mayr & Mahnel, 1964, 1966). Es wurde ein 22-23 nm kleines Partikel entdeckt, das mit dem Maul- und Klauenseuche-Virus und dem Kilham-Rat Virus verglichen wurde (Mahnel, 1965). Desweiteren wurde es als Desoxyribonukleinsäure-haltig beschrieben und deswegen zunächst als Picodnavirus bezeichnet (Horzinek *et al.*, 1967). Kurz darauf konnte das Virus aus primären Schweinenierenzellen isoliert werden und seine Eigenschaften erschienen mit denen der Parvoviren vergleichbar (Mayr *et al.*, 1968).

Parallel dazu wurde ein gehäuftes Auftreten von Reproduktionsstörungen beschrieben, das bereits als SMEDI-Syndrom bezeichnet wurde, jedoch wurden dafür zunächst Enteroviren verantwortlich gemacht (Dunne *et al.*, 1965). Im Rahmen einer weiteren Studie wurden die aus dem Abortmaterial isolierten 111 Mikroorganismenisolate untersucht. Es zeigte sich, dass es sich bei 96 um den gleichen Typ DNA-Virus handelte. Es wurden erste physikalisch-chemische Eigenschaften, wie Äther- und Säureresistenz, Hitzestabilität und Hämagglutination beschrieben (Cartwright & Huck, 1967). Mit Hilfe serologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die isolierten Viren mit denen aus Zellkulturen isolierten identisch bzw. ihnen sehr ähnlich waren (Cartwright *et al.*, 1969).

Zunächst war die Rolle des porzinen Parvovirus (PPV) bei Reproduktionsstörungen ätiologisch sehr umstritten, jedoch konnte der Nachweis, dass das porzine Parvovirus zu Mumifikation und Aborten führt, durch zahlreiche Infektionsexperimente erbracht werden (Johnson & Collings, 1969; Redmann *et al.*, 1974; Cutlip & Mengeling, 1975; Fujisaki *et al.*; 1975; Johnson *et al.*, 1976; Joo *et al.*, 1976; Mengeling & Cutlip, 1976).

Die weltweite und endemische Verbreitung wurde anhand von serologischen Untersuchungen und Virusisolierungen gezeigt (Bachmann 1969, 1970; Cartwright *et al.*, 1969; Johnson, 1973; Horner & Buddle, 1974; Redman *et al.*, 1974; Mengeling, 1975; Johnson *et al.*, 1976; Thacker, 1981; Nöckler, 1985; Obaldia, 1991; Rivera, 1995).

## 2.2 Klassifikation

Das porcine Parvovirus wird in die Familie der *Parvoviridae* eingeordnet. Zu dieser Familie gehören kleine (parvus (lat.) = klein) unbehüllte DNA-Viren. Es folgt eine weitere Unterteilung in zwei Subfamilien, die *Densovirinae* und die *Parvovirinae* (Murphy *et al.*, 1995). Die Subfamilie *Densovirinae* beinhaltet die drei Genera Brevidensovirus, Densovirus und Iteravirus, die ausschließlich Arthropoden infizieren und keine medizinische Relevanz besitzen. Die Subfamilie *Parvovirinae* beinhaltet Parvoviren, die Vertebraten infizieren. Sie umfasst die drei Genera Dependovirus, Erythrovirus und Parvovirus (Abbildung 1).

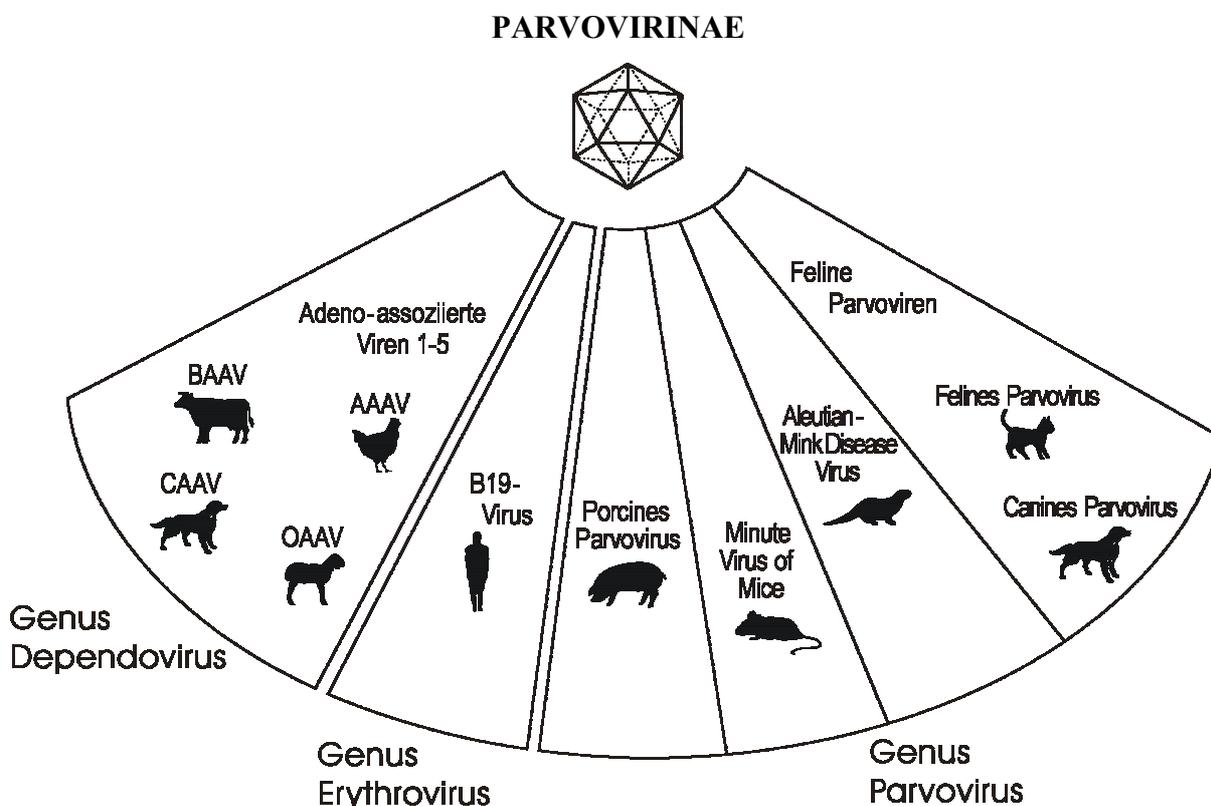


Abbildung 1: Zusammenfassung wichtiger Vertreter der Unterfamilie *Parvovirinae*

Dependoviren benötigen ein Helfervirus (Adeno-, Pox- oder Herpesvirus) um sich replizieren zu können. Fehlen diese, so können sich die Adeno-assoziierten Viren relativ ortsspezifisch und stabil in das zelluläre Genom integrieren ohne schwerwiegende Erkrankungen hervorzurufen. Wegen dieser Eigenschaft werden Adeno-assoziierte Viren als Vektoren für gentherapeutische Ansätze verwendet.

Der wichtigste Vertreter des Genus Erythrovirus ist das humanpathogene Parvovirus B19, der Erreger der Ringelröteln. Viren dieses Genus infizieren vorwiegend Affen und den Menschen. Der dritte Genus Parvovirus ist die größte Gruppe der *Parvovirinae*. Die Viren dieses Genus infizieren ausschließlich Tiere. Die wichtigsten Spezies sind: Minute Virus of Mice (MVM), felines Parvovirus (FPV), canines Parvovirus (CPV), Nerz-Enteritis-Virus (MEV), Aleutian Mink Disease Virus und porcines Parvovirus (PPV). Viele Vertreter dieses Genus, wie FPV, CPV und MEV, sind Enteritis-Erreger.

Wegen ihrer Eigenschaft sich ohne Helfervirus replizieren zu können, werden die Viren der Genera Parvovirus und Erythrovirus auch häufig als "autonome Parvoviren" bezeichnet.

### 2.3 Morphologie

Die Größe des porcinen Parvovirus wurde elektronenmikroskopisch bestimmt und beträgt circa 20 nm (Abbildung 2) (Mayr *et al.*, 1968; Molitor *et al.*, 1983). Das Molekulargewicht beträgt  $5,3 \times 10^6$  Dalton (Siegl, 1976).

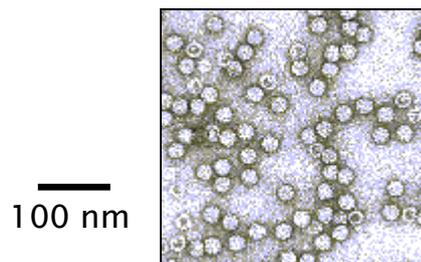


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von porcinen Parvovirus (Reddy *et al.*; 2001)

Das Virus besitzt keine Hülle, dies ist mit für die große Tenazität gegen äußere Einflüsse verantwortlich. So ist es sehr hitzestabil (Cartwright & Huck, 1967; Mayr *et al.*, 1968; Cartwright *et al.*; 1969; Siegl, 1976), pH-resistent im Bereich von pH 3-9 (Cartwright & Huck, 1967; Mayr *et al.*, 1968; Johnson & Collings, 1969; Bachmann, 1970; Morimoto, 1972), unempfindlich gegen Chloroform und Äther (Cartwright & Huck, 1967; Mayr *et al.*, 1968), sowie gegen Trypsin und andere proteolytische Enzyme (Bachmann, 1970; Castro, 1971; Croghan *et al.*, 1973).

Die mittlere Dichte im CsCl-Gradienten von infektiösen Virionen beträgt 1,38 g/ml (Horzinek *et al.*, 1967; Bachmann, 1970; Shahrabadi *et al.*, 1982) und von leeren Kapsiden 1,29 g/ml (Shahrabadi *et al.*, 1982).

Die hämagglutinierenden Eigenschaften von PPV mit Erythrozyten vom Menschen, Affen, Meerschweinchen, Ratte, Maus und Huhn (Horzinek *et al.*, 1967; Cartwright & Huck, 1967;

Mayr *et al.*, 1968; Cartwright *et al.*, 1969; Hallauer *et al.*, 1972; Mengeling, 1972; Rott, 1981) werden für Hämagglutinations- und Hämagglutinationsinhibitionstest (Joo *et al.*, 1976) genützt, jedoch sind diese Nachweissysteme nicht sehr sensitiv (Jenkins, 1992).

Das 5 kb große Genom der Parvoviren ist von einem Kapsid umgeben, das sich aus den Strukturproteinen VP1 und VP2 zusammensetzt. Das Kapsid besteht aus insgesamt 60 Molekülen VP1 und VP2, die im Verhältnis 1:10 im Virion vorliegen.

Die dreidimensionale Struktur des Viruskapsids von PPV konnte durch Röntgenstrukturanalyse dargestellt werden (Simpson *et al.*, 2002). Dabei wurden leere Virus-ähnliche Partikel ("virus-like particles", VLP) untersucht, die nur aus VP2 bestehen. Diese besitzen die gleichen antigenen Eigenschaften wie Virionen und man nimmt daher an, dass die so dargestellte dreidimensionale Struktur mit der von Virionen übereinstimmt. Die Struktur des VLP wird als ähnlich der Struktur von CPV, FPV und MVM beschrieben.

Die oberflächliche Struktur des Viruskapsids bildet einen Ikosaeder. Die Virusoberfläche stellt sich folglich aus 60 identischen Dreiecken, mit verschiedenen Symmetrieachsen (2x-, 3x- und 5x-Achse), zusammengesetzt dar (Abbildung 4). Die zylindrisch hervorgehobene 5x-Achse ist von einer kreisförmigen Vertiefung, dem sogenannten "canyon", umgeben. Die 2x-Achse wird von einer als "dimple" bezeichneten Einkerbung durchzogen und auf der 3x-Achse befindet sich zwei breite Erhebungen, die als "three-fold-spikes" bezeichnet werden (Abbildung 3). Rossmann stellte 1989 eine canyon-Hypothese auf, die besagt, dass Vertebraten-Viren den "canyon" als Struktur entwickelt haben, um entscheidende Stellen an der Virusoberfläche vor Antikörper-Erkennung zu schützen (Rossmann, 1989).

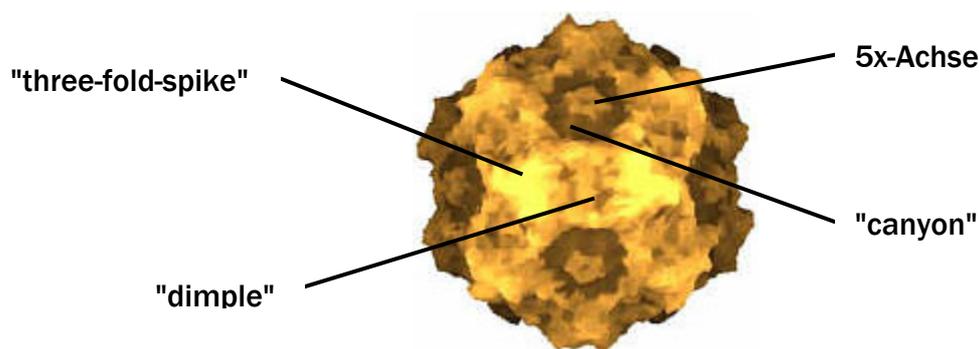


Abbildung 3: Das Kapsid eines porzinen Parvovirus mit der 5x-Achse, die vom "canyon" zirkulär umgeben ist und den "three-fold-spikes". Diese stellen gleichzeitig die 3x Achse dar und dazwischen liegt der "dimple" (Reddy *et al.*, 2001)

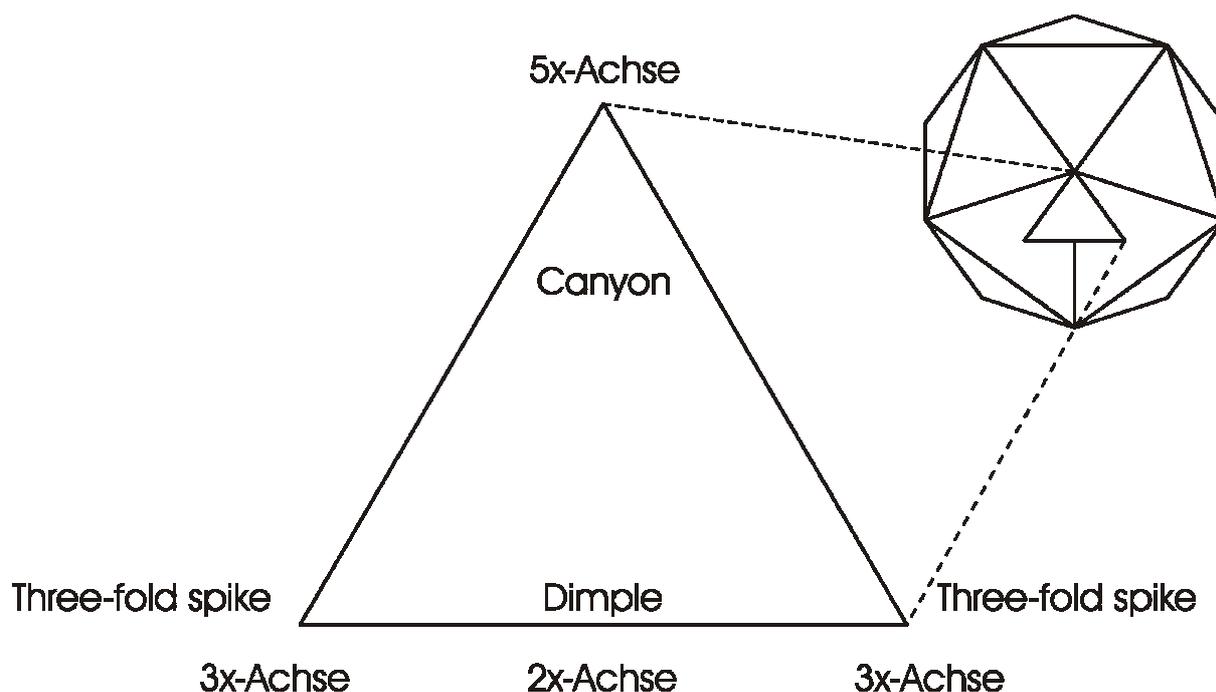


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Symmetrieachsen und des strukturellen Aufbaus des Viruskapsids autonomer Parvoviren

Je eine dieser Dreiecksuntereinheiten wird aus Teilen der Proteinkette von verschiedenen VP2 gebildet. Das VP2 bildet ein fassförmiges Faltungsmuster, das aus acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen besteht. Diese Stränge sind durch große, ineinandergreifende Schleifen (sog. "loops") miteinander verbunden. Diese "loops" liegen weitgehend auf der Kapsidoberfläche und erklären auch die große Stabilität des Kapsids, denn sie werden durch zahlreiche nicht-kovalente Bindungen stabilisiert.

Im Kanal der 5x-Achsen der Symmetrie konnte keine Struktur dargestellt werden, was dafür spricht, dass sich das aminoternale Ende von VP2 innerhalb des leeren Kapsids befindet. Da jedoch gegen das aminoternale Ende virusneutralisierende Antikörper erzeugt werden (Kamstrup *et al.*, 1998), ist dieses Ende bei DNA-haltigen Virionen wahrscheinlich durch die 5-fach Pore herausgefädelt und frei beweglich am Virion.

Bei NADL-2 handelt es sich um ein avirulentes Isolat des porzinen Parvovirus, bei Kresse hingegen um ein hochvirulentes. Drei von vier Veränderungen in der Aminosäuresequenz von VP2 werden mit für die unterschiedliche Virulenz verantwortlich gemacht (Bergeron *et al.*, 1996). Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Aminosäure 436 von Serin bei NADL-2 zu Prolin bei Kresse auf der Oberfläche des "three-fold-spike" liegt. Dies bewirkt jedoch wahrscheinlich keine Änderung der Struktur. Von den zwei anderen Mutationen wird angenommen, dass sie zu einer Verzerrung der dreidimensionalen Struktur führen. Beide Aminosäuren liegen am Rand des "canyon". Die

Aminosäure 378 (bei NADL-2 Asparaginsäure, bei Kresse Glycin) interagiert mit der Aminosäure 314 Lysin und diese mit der Aminosäure 509 Asparaginsäure. Die Veränderung von Asparaginsäure zu Glycin bei Kresse zieht wahrscheinlich eine Konformationsänderung nach sich, die eine vermeintliche Rezeptorbindungsstelle verändert. Ähnlich verhält es sich bei der Aminosäure 383, die von Histidin zu Glycin verändert ist, was alle existierenden Wasserstoffbrückenbindungen mit den umgebenden Carbonyl-Gruppen der Hauptkette aufbricht (Simpson *et al.*, 2002).

Mit Hilfe von Anti-PPV Antisera konnten lineare Epitope erkannt werden (Kamstrup *et al.*, 1998), diese liegen auf den exponiertesten Regionen der Oberfläche (Simpson *et al.*, 2002).

## 2.4 Genomorganisation

Das Genom des porzinen Parvovirus besteht aus einer linearen, einzelsträngigen Desoxyribonukleinsäure-Kette mit negativer Polarität (und damit komplementär zur mRNA) (Bergeron *et al.*, 1993). Es ist circa 5000 Basen lang (Molitor *et al.*, 1984; Bergeron *et al.*, 1993).

Das Genom des porzinen Parvovirus besitzt zwei große und einen kleinen offenen Leserahmen ("open reading frame", ORF) auf dem komplementären (positiven) Strang. Am 5'-Ende des Genoms liegt der große ORF 1. Innerhalb dieses auf der linken Seite liegenden Leserahmens liegt vollständig der kleine ORF 3 verankert. Am rechten 3'-Ende des Genoms befindet sich der große ORF2. Alle drei offenen Leserahmen überlappen sich gegenseitig (Abbildung 5). Auf dem negativen Strang liegt kein ORF.

Der große und der kleine ORF am 5'-Ende des Genoms enthält Informationen für die Nichtstrukturproteine und für die ersten zehn Aminosäuren des Strukturproteins VP1. Der rechte ORF kodiert für die Strukturproteine (Bergeron *et al.*, 1993). Die Proteine werden durch alternatives Spleißen prozessiert. Dabei wird der gleiche Genomabschnitt in verschiedenen Leserastern abgelesen. Gespleißte und ungespleißte Transkripte können als mRNA dienen. Dies ermöglicht den kleinen Parvoviren ihre gesamte Erbinformation auf dem kleinen Genom unterzubringen (Berns, 1990).

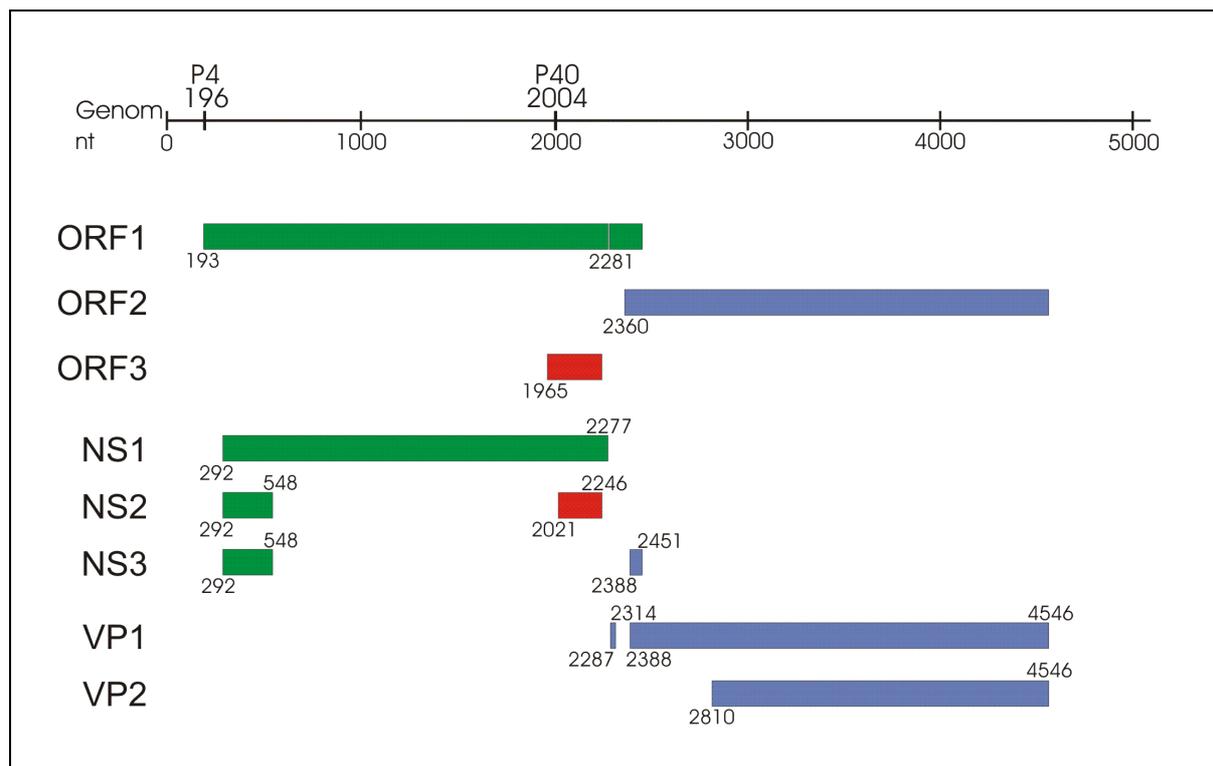


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Genomorganisation des porzinen Parvovirus. Die Lage der beiden Startsignale (P4, P40) für die Transkription, die 3 verschiedenen Leserahmen (ORF1-3), die Nichtstrukturproteine (NS1-NS3) und die Strukturproteine (VP1, VP2) sind dargestellt. Die verschiedenen Farben stellen dar, von welchen ORF das jeweilige Protein translatiert wurde.

## 2.5 Virale Proteine

Das porzine Parvovirus besitzt die Nichtstrukturproteine NS1, NS2 und NS3. Die Funktionen der Nichtstrukturproteine der Parvoviren sind noch nicht genau geklärt. Beim porzinen Parvovirus werden sie vom Promotor P4 (TATA, Nucleotid 196) transkribiert (Abbildung 5) (Bergeron *et al.*, 1993).

Am meisten ist über das NS1 bekannt. Das Protein besitzt eine Nickase-, Helikase- und ATPase-Aktivität und ist bei der Replikation wichtig für die Auflösung der sogenannten "hairpin"-Strukturen (Wilson *et al.*, 1991). Es nimmt Einfluss auf die Genexpression (Christensen *et al.*, 1995) und das Virus kann sich ohne NS1-Protein nicht replizieren (Berns, 1990). Beim porzinen Parvovirus ist NS1 phosphoryliert und konnte bisher nur aus der Zellfraktion infizierter Zellkulturen isoliert und nicht in gereinigten Virionenfraktionen von PPV nachgewiesen werden (Molitor *et al.*, 1985). Bei einer Infektion mit porzinem Parvovirus werden Antikörper gegen NS1 gebildet, bei einer Impfung hingegen nicht

(Madsen *et al.*, 1997). Interessante Aspekte eröffnet dieses Protein in der Onkologie, so kann das NS1-Protein der Adeno-assoziierten Viren die Tumortransformation suprimieren ohne dabei die Zelle zu zerstören (Schlehofer, 1994).

Die Funktion von NS2 beim porzinen Parvovirus ist unbekannt, jedoch ist bekannt, dass es beim Minute Virus of Mice NS2 eine entscheidende Rolle für die effizienten Translation spielt (Naeger *et al.*, 1993) und dass NS2 für die Kapsidbildung gebraucht wird (Cotmore *et al.*, 1997). Beim caninen Parvovirus scheint NS2 für die Replikation und Reifung nicht notwendig zu sein (Wang *et al.*; 1998)

NS3 ist bisher für kein anderes Parvovirus beschrieben worden, die Funktion von NS3 ist unbekannt (Bergeron *et al.*, 1996).

Die beiden Strukturproteine VP1 und VP2 werden vom Promotor P40 (AATA, Nukleotid 2004) transkribiert (Abbildung 5). Die ersten zehn Aminosäuren am aminoterminalen Ende des Strukturproteins liegen im linken offenen Leserahmen (ORF1) (Bergeron *et al.*, 1993). Die Aminosäuresequenz des kleineren VP2 ist vollständig in der des VP1 enthalten. Beide Kapsidproteine werden über die gleiche mRNA transkribiert. Wird die mRNA vom ersten Startcodon (ATG) translatiert, entsteht das VP1-Kapsidprotein. VP2 wird gebildet, wenn vom zweiten Startcodon ab die mRNA translatiert wird. VP1 und VP2 sind antigenetisch eng verwandt, es ist anzunehmen, dass eine Virus-neutralisierende Determinante auf beiden Proteinen vorhanden ist (Molitor *et al.*, 1983).

Vom VP1 des Parvovirus B19 ist bekannt, dass es eine Phospholipase A2-ähnliche Aktivität besitzt (Dorsch *et al.*, 2002), ob das VP1 des porzinen Parvovirus auch diese Aktivität besitzt ist unbekannt. Beim porzinem Parvovirus liegen die ersten zehn Aminosäuren von VP1 auf dem positiven DNA-Strang von Nukleotid 2287-2314, die restlichen 719 Aminosäuren werden von Nukleotid 2388-4546 kodiert.

VP2 ist das Hauptstrukturprotein. Es bildet nach Expression durch rekombinante Baculoviren in Insektenzellen Virus-ähnliche Partikel (virus like partikels = VPLs). Die immunologische Aktivität der VPLs ist nicht unterscheidbar von der inaktivierter Impfstoffe (Martinez *et al.*, 1992). Die Peptide am N-terminalen Teil des VP2 sind in der Lage die Bildung Virus-neutralisierender Antikörper zu induzieren (Kamstrup *et. al.*, 1998). Die Nukleotide 2810-4546 des porzinen Parvovirus kodieren für das 579 Aminosäuren große VP2.

## 2.6 Replikation

Das porcine Parvovirus kann sich *in vitro* nur in Zelllinien von Schweinen replizieren. Von Zellen anderen Ursprungs kann es aufgenommen werden, jedoch kommt es zu keiner Vermehrung (Ridpath & Mengeling, 1988; Oveerakul *et al.*, 1992). Ein weiterer Versuch zeigte darüber hinaus, dass die Eigenschaft des PPV, sich nur in Zelllinien von Schweinen zu vermehren, nicht allein abhängig von dem Rezeptor ist, denn dieser ist auch auf Zellen anderer Spezies zu finden (Harding & Molitor, 1992). Der genaue Mechanismus der Adsorption und Penetration ist jedoch auch beim porcinen Parvovirus nicht geklärt.

Die Replikation erfolgt im Nukleus der Zelle und findet nur in der S-Phase des Zellkreislaufs statt. Dies sind Hinweise darauf, dass autonome Parvoviren bei der Virusvermehrung von zellulären Enzymen, wie der zellulären DNA-Polymerase  $\delta$ , abhängig sind.

Die Replikation der autonomen Parvoviren wird mit einem "unidirectional, quasi-circular rolling-hairpin"-Modell erklärt (Tattersall & Ward, 1976; Astell *et al.*, 1985; Cotmore & Tattersall, 1987, 1995).

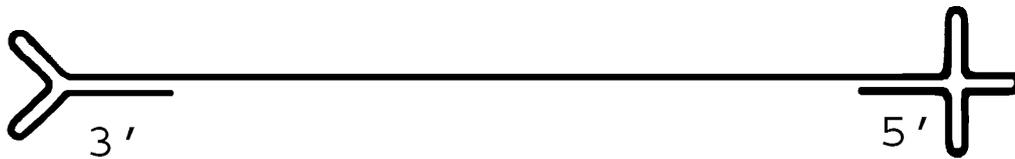


Abbildung 6: Darstellung der "hairpins" am 3' und 5'-Ende des Genoms

Eine wichtige Rolle spielt dabei die aufgefaltete Struktur am 3'-Ende des Genoms, der sogenannter "hairpin". Auch das 5'-Ende besitzt einen "hairpin". Sie entstehen durch palindromische Sequenzen, die bei den autonomen Parvoviren am 5'- und am 3'-Ende unterschiedlich sind (Abbildung 6). Der "hairpin" am 3'-Ende dient der DNA-Polymerase als Primer zur DNA-Synthese entlang des viralen Einzelstrangs bis zum "hairpin" am 5'-Ende. Dann erfolgt wahrscheinlich eine Ligation des synthetisierten Stranges mit der Originalsequenz. Das geschlossene Genom wird durch das bereits synthetisierte NS1-Protein, mit Hilfe dessen Nickase-Aktivität, an einer anderen, sequenzspezifischen Stelle wieder aufgespalten. Die DNA-Synthese wird wieder entlang der Matrize fortgesetzt, der "hairpin" wird dabei aufgefaltet. Die Synthese wird mit dem komplementären Strang als Matrize fortgesetzt. Es entsteht ein doppelsträngiges DNA-Molekül doppelter Genomlänge. Dieses Molekül wird in zwei intermediäre Formen im 3'-Ende-Bereich getrennt, unter Ausnützung

der "flip"- und "flop"-Orientierung des 5'-Endes. Diese Intermediate werden an ihren 5'-Enden verlängert, eine Form liegt anschließend in einer Synthese-Form vor, und kann für die DNA-Synthese wieder eingesetzt werden. Die andere intermediäre Form besteht aus einem kompletten Strang positiver und einem negativer Polarität. Der negative Strang wird in ein Kapsid verpackt. Bei frisch gepackten Virionen ist das NS1 noch angeheftet (Abbildung 7).

Es wird angenommen, dass dieses Modell auch für die Replikation des porzinen Parvovirus zutrifft. Diese Theorie wird unterstützt von einigen wenigen Experimenten. Es wurde eine replikative Form des Genoms des porzinen Parvovirus nachgewiesen, die circa 5000 Basenpaare groß ist und teilweise am 3'-Ende geschlossen ist und ein großes "hairpin" bildet. Zudem gab es Hinweise auf eine geschlossene Form des 3'-Endes (Molitor *et al.*, 1984). Die "flip" und "flop" Orientierung des 5'-Endes, die für die Trennung des doppelsträngigen DNA-Moleküls in die zwei Intermediär-Formen Voraussetzung ist, konnte gezeigt werden (Bergeron *et al.*, 1996). Das NS1-Protein konnte in infizierten Zellkulturen, zum gleichen Zeitpunkt wie die Initiation der Virussynthese, nachgewiesen werden (Molitor *et al.*, 1985). Die Enkapsidierung findet im Zellkern statt. Es ist noch unklar, wie die Nachkommenviren aus der Wirtszelle ausgeschleust werden, aber für manche Parvoviren wird ein "Egress" durch Zellyse, beziehungsweise Zelltod angenommen (Muzyczka und Berns, 2001).

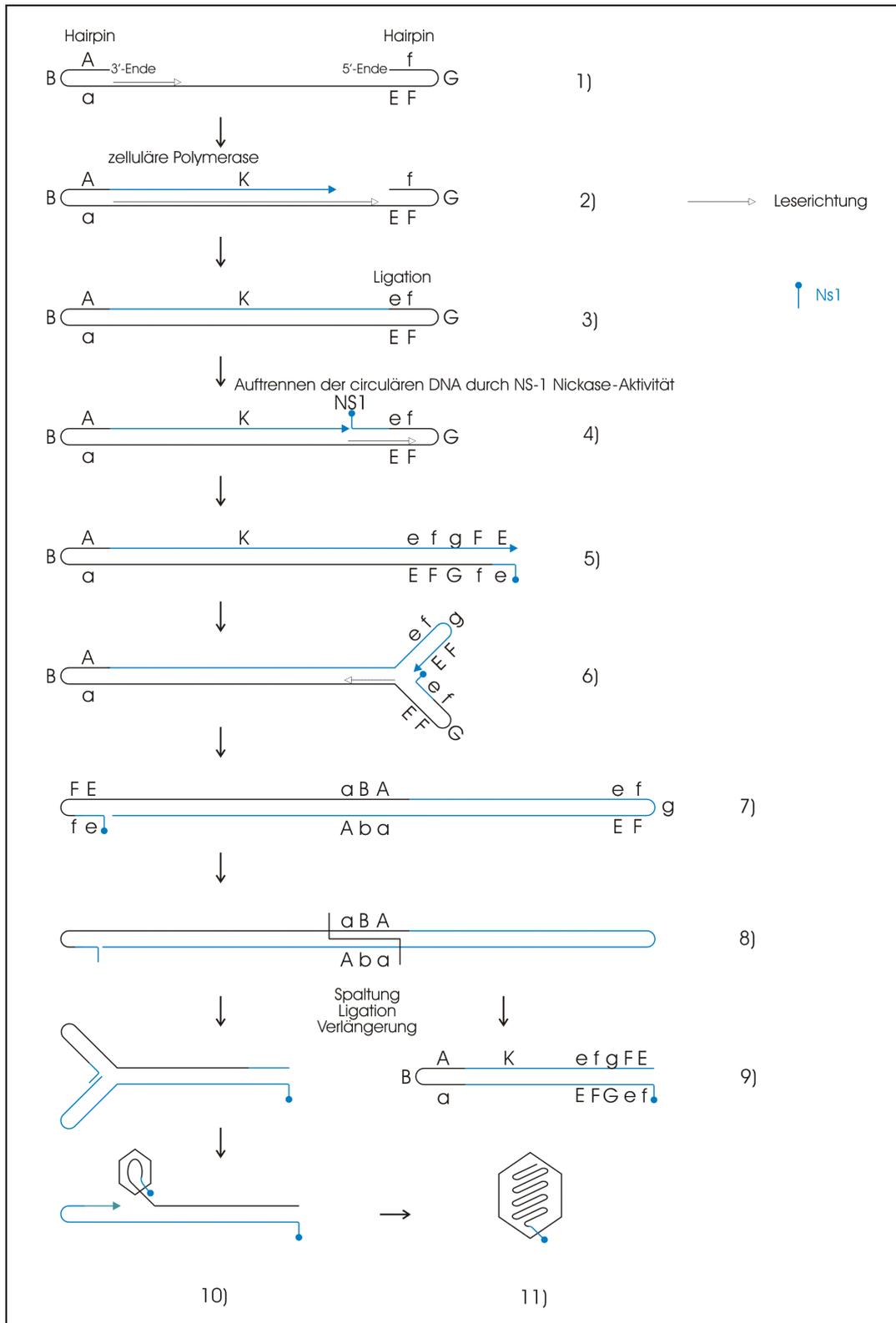


Abbildung 7: Model der Parvovirus-Replikation, ABA, EFF sollen die palindromischen Sequenzen darstellen 1) die "hairpin"-Struktur am 3'-Ende des Genoms dient als Primer und es kommt 2) mittels zellulärer Polymerase zur Amplifikation 3) nach Ligation erfolgt ein 4) Auftrennen der zirkulären DNA durch die Nickase-Aktivität des NS1 5-7) ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit doppelter Genomlänge wird gebildet 8) dieses wird gespalten, ligiert und anschließend verlängert 9) und es entstehen 2 Intermediärprodukte 10) Enkapsidierung des negativen DNA-Strangs 11) Virion mit zunächst angehefteten NS1.

---

## 2.7 Pathogenese und Klinik der Infektion mit porzinen Parvovirus

In Zusammenhang mit dem porzinen Parvovirus werden Unfruchtbarkeit, Abort, Totgeburt, Mumifikation, neonataler Tod und reduzierte neonatale Lebensfähigkeit beschrieben (Cartwright & Huck, 1967; Johnson, 1969; Morimoto et al, 1972, Narita *et al.*, 1975; Forman *et al.*, 1977). PPV wird als häufigste Ursache für Fruchtbarkeitsstörungen angesehen. In der Klinik wird häufig der Begriff des "SMEDI"-Syndroms in Zusammenhang mit Fruchtbarkeitsstörungen genannt. Darunter werden verschiedene Fruchtbarkeitsstörungen wie Stillbirth (Totgeburt), Mumification (Mumifikation), Embryonic Death (embryonaler Fruchttod) und Infertility (Unfruchtbarkeit) zusammengefasst. PPV ist nur ein Erreger dieses uneinheitlichen, ätiologisch nicht definierten Symptome-Komplexes. Porzine Enteroviren (PEV Typ 1, 3, 6-8) werden als weitere Erreger angesehen.

Die akute Infektion neonataler und adulter Schweine mit dem porzinen Parvovirus verläuft in der Regel subklinisch, dies konnte in einer Reihe von Versuchen nachgewiesen werden (Johnson & Collings, 1969; Cutlip & Mengeling, 1975; Fujisaki *et al.*, 1975; Johnson *et al.*, 1976; Joo *et al.*, 1976, Mengeling & Cutlip, 1976). Nur serologisch lässt sich bei vielen Tieren eine transiente leichte Leukopenie feststellen (Johnson & Collings, 1969, 1971; Joo *et al.*, 1976; Mengeling & Cutlip, 1976) und bei neonatalen Tieren ließ sich das porzine Parvovirus in schnell proliferierenden Geweben, vor allem in lymphatischen Geweben, nachweisen (Cutlip & Mengeling, 1975; Fujisaki *et al.*, 1975; Paul *et al.*, 1980). Anders als bei feline Parvoviren kommt es nicht zu einer Anhäufung von Antigen im Kryptenepithel des Darmes (Johnson *et al.*, 1976; Brown *et al.*, 1980).

Pathologische Veränderungen nach einer porzinen Parvovirusinfektion finden sich nur bei Embryonen und Feten. Ob und in welcher Schwere es zu einer klinischen Veränderung kommt, hängt von der Virulenz des PPV-Stammes ab. Avirulente Stämme, wie NADL-2, können die Plazentarschranke nicht übertreten (Mengeling & Cutlip, 1976). Virulente Stämme, wie z.B. NADL-8, NADL-7, sind nur pathogen für noch nicht immunkompetente Feten (Mengeling & Cutlip, 1976), danach kommt es zur Immunantwort mit neutralisierenden Antikörpern (Bachmann *et al.*, 1975). Hochvirulente Stämme wie Kresse verursachen sogar Läsionen bzw. führen auch nach Erreichen der Immunkompetenz zum Tod (Kresse *et al.*, 1985).

Wird eine Sau ohne PPV-Antikörper während der Trächtigkeit infiziert, so kommt es zu einer Virämie, die abhängig von der Virulenz des Erregerstammes zu einer transplazentaren

Infektion der Feten führt (Johnson & Collings, 1971; Mengeling & Cutlip, 1976). Der weitere Verlauf der Infektion ist abhängig vom Alter der Feten zum Zeitpunkt der Infektion.

Werden Feten bis zum 30. Gestationstag infiziert, so sterben diese ab und werden resorbiert (Cropper *et al.*, 1976, Mengeling *et al.*, 1980). Werden alle Früchte resorbiert, wird das klinische Erscheinungsbild als Umrauschen bezeichnet. Geschieht die Resorption in den ersten Tagen der Gestation, so bleibt die Sau im Zyklus von 21 Tagen, erfolgt sie später, so kann ein verlängerter Zyklus bis zu 35 Tagen auftreten (Wrathall & Mengeling, 1979, Kuiper 1985). Sind nicht alle Früchte von der Infektion betroffen, werden diese bis zum Gestationstag 11 resorbiert, wenn weniger als vier Embryonen leben. Danach werden überlebende Früchte ausgetragen (Plonait, 1997)

Ab den 30. Tag bis zur Immunkompetenz sterben infizierte Feten ab und werden mumifiziert, teilweise mazeriert (Abbildung 8) (Mengeling & Cutlip, 1975). Sind alle Feten abgestorben, kommt es zu einer verlängerten Gravidität oder zum Abort (Johnson *et al.*, 1976; Donaldson-Wood *et al.*, 1977).

Mit zahlreichen Versuchen, bei denen die Früchte oronasal, intramuskulär, in den Amnionsack oder intramuskulär infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Immunkompetenz circa an Tag 65 der Gestation einsetzt (Redmann *et al.*, 1974; Joo *et al.*, 1976; Nielsen *et al.*, 1991). Ab diesem Zeitpunkt kommen gesunde Ferkel mit hohem Antikörpertiter zur Welt (Donaldson-Wood *et al.*, 1977), sofern es sich bei dem Virusstamm nicht um einen hochvirulenten handelt. Bei einem Infektionsversuch mit einem bis dahin als virulent eingestuften Stamm traten auch nach dem 70. Gestationstag Läsionen auf (Nielsen *et al.*, 1991). Solche pathologischen Veränderungen, auch nach Erreichen der Immunkompetenz, die keinen intrauterinen Tod nach sich ziehen, jedoch auch nicht vollständig regeneriert werden, könnten eine Erklärung für neonatale Mortalität und Läsionen sein (Forman *et al.*, 1977; Hogg *et al.*, 1977; van Leengoed *et al.*; 1983; Huysman *et al.*, 1992).

Es gibt Berichte, dass Sauen, die ihre abgestorbenen Embryonen in den ersten Wochen der Trächtigkeit komplett resorbiert haben, endokrinologisch tragend blieben und erst zum theoretischen Geburtstermin wieder in den Östrus gekommen sind (Rodeffer *et al.*, 1975).

Der genaue Mechanismus der transplazentaren Infektion ist nicht bekannt. Es konnte Virus in endothelialen und mesenchymalen Zellen des Chorions nachgewiesen werden, jedoch nicht in maternalen Epithelium oder Trophectoderm, jedoch konnte nur ein kleiner Bereich der sehr großen Kontaktzone untersucht werden (Mengeling, 1999). Eine Infektion durch maternale

Makrophagen wird diskutiert, konnte aber nicht bewiesen werden (Paul *et al.*, 1979, Harding & Molitor, 1988). Man nimmt an, dass eine Virämie der Muttersau Voraussetzung einer transplazentaren Infektion ist (Joo *et al.*, 1976; Mengeling & Cutlip, 1976). Fünf bis sechs Tage nach der Infektion setzt die Virämie ein und dauert vier bis fünf Tage an (Brown *et al.*, 1980). Eine transplazentare Übertragung dauert 10 bis 14 Tage (Mengeling *et al.*, 1978, 1980). Ist ein Fetus im Uterus infiziert, kann sich das Virus intrauterin im Horn weiterverbreiten (Johnson & Collings, 1969,1971; Bachmann *et al.*, 1975), dies ist der häufigste Verbreitungsweg unter den Feten. Durch diesen langsamen Infektionsweg kommt es zu den typischen Bild der bunten Würfen mit Feten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten infiziert wurden und damit zu den verschiedenen Stadien der Infektion, von Mumien bis lebendigen Feten sind möglich (Abbildung 8) (Mengeling, 1979). Die Mumifikation ist auch der am häufigsten berichtete Krankheitsbefund (Mengeling & Cutlip, 1975, 1976; Donaldson-Wood *et al.*, 1977; Cutler *et al.*, 1983).



Abbildung 8: Feten einer experimentell am 47. Gestationstag infizierten Sau, Obduktion 34 Tage p.i.; auf der linken Hälfte des Bildes sind die Feten des linken, auf der rechten Seite des rechten Horns zu sehen. Die Photographie ist freundlicherweise von Prof. Dr. Heinritzi, II.Medizinische Tierklinik, München, zur Verfügung gestellt worden.

Bei der Replikation ist das porcine Parvovirus auf mitotisch aktives Gewebe angewiesen, das dem Virus zelluläre und enzymatische Hilfsfunktionen zur Verfügung stellt (Tattersall, 1972). Deswegen repliziert sich das Virus stark in embryonalem bzw. fetalem hämato- und lymphopoetischen Gewebe und schädigt dabei vaskuläre Endothelien und intestinale Epithelien. Es sind diese massiven pathologischen Veränderungen, die zum Tod des Fetus führen. Feten, die mit porzinem Parvovirus infiziert wurden und daran gestorben sind, sind aus diesem Grund meist ödematös und durch Hämolyse braunrot verfärbt. Häufig kann man Hämorrhagien in Organen, seröse, blutige Flüssigkeitsansammlungen in Körperhöhlen und Vergrößerung von Organen feststellen (Bachmann *et al.*, 1975; Mengeling & Cutlip, 1975; Joo *et al.*, 1976,1977; Lenghaus *et al.*, 1978; Nielsen *et al.*, 1991). Histologisch lässt sich ein Anstieg mononuklearer Zellen, Nekrose und Mineralisation im gesamten Organsystem darstellen (Lenghaus *et al.*, 1978). Auch in der Plazenta kommt es im Bereich der toten Feten zur Mineralisation und Nekrose, deren Ursache jedoch unbekannt ist (Joo *et al.*, 1977; Lenghaus *et al.*, 1978).

Die Virusausscheidung erfolgt unter anderem über Fäzes, Speichel und Nasensekret während der akuten Phase (Paul *et al.*, 1980). Von akut infizierten Ebern ließ sich PPV aus dem Sperma isolieren (Cartwright *et al.*, 1967, 1971; Lucas *et al.*, 1974; Bonté *et al.*, 1984).

Durch die hohe Tenazität lässt sich noch Monate nach den Infektionsgeschehen in Ställen infektiöses Parvovirus nachweisen (Mengeling & Paul, 1986).

Die Aufnahme des Virus erfolgt oronasal. Der kritische Zeitraum bei Sauen für eine Infektion mit porzinem Parvovirus ist kurz vor der Belegung bis zur Immunkompetenz der Feten. PPV ist in Herden endemisch verbreitet und fast alle Tiere werden natürlich infiziert, sofern sie nicht durch eine Impfung vor einer Infektion geschützt sind. Da maternale Antikörper sechs bis neun Monate persistieren können (Johnson *et al.*, 1976) und dies bis in die Zeit der ersten Belegung fällt, sind Jungsauen häufig im kritischen Zeitraum empfänglich für eine Infektion mit PPV und es kommt zu Fruchtbarkeitsstörungen. Meist wird die porcine Parvovirus-Problematik nur mit Jungsauen in Verbindung gebracht, jedoch können auch Altsauen von einer Parvovirusinfektion betroffen sein (Vannier *et al.*, 1984; Huysman *et al.*, 1992). Da die Impfung gegen PPV in den Zeitraum der persistierenden maternalen Antikörper fallen kann, kann der Erfolg einer Impfung beeinträchtigt sein (Pollock & Carmichael, 1982, Alt & Witte, 1986).

Bei Ebern konnte nach oronasaler Aufnahme von porzinem Parvovirus in den Samendrüsen (Bonté *et al.*, 1984) und nachdem Virus ins Präputium inokuliert wurde, vom Penis, Präputium und aus einem Hoden eines Ebers PPV nachgewiesen werden (Lucas *et al.*, 1974). Darum wird diskutiert, ob Eber als Überträger für PPV beim Abortgeschehen eine Rolle spielen. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da Untersuchungen in geschlossenen Schweinebeständen mit seropositiven Zuchtebern zeigen, dass es in diesen keine größere Beteiligung von PPV an Fruchtbarkeitsstörungen gibt (Plonait *et al.*, 1985).

Obwohl das porcine Parvovirus mit Enteritiden in Verbindung gebracht wird (Dea *et al.*, 1985; Yasuhara *et al.*, 1989), gibt es keine Hinweise darauf, dass es wie andere Parvoviren Darmerkrankungen hervorruft (Cutlip & Mengeling, 1975; Brown *et al.*, 1980).

Bei dem hochvirulenten Stamm Kresse wurden Hautläsionen beobachtet (Kresse *et al.*, 1985) und es gibt einen weiteren Bericht, in dem aus exsudativen Hautläsionen porcines Parvovirus isoliert werden konnte (Whitaker *et al.*, 1990). Eine Untersuchung lässt vermuten, dass Kresse kein primäres Hautpathogen ist, eventuell besitzt Kresse einen Tropismus für Zellen der Haut (Lager & Mengeling, 1994). Studien zeigten, dass Kresse einen anderen Zelltropismus besitzt als andere PPV Isolate. So vermehrt es sich in Gehirn und in Milz (Oraveerakul *et al.*, 1993), andere Isolate konnten dort noch nicht nachgewiesen werden.

In den letzten Jahren wurde das porcine Parvovirus mit dem Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Zusammenhang gebracht. Untersuchungen zeigten, dass eine Koinfektion von neonatalen Ferkeln mit PPV und PCV-2 (porzines Circovirus Typ 2) das Krankheitsbild von PMWS verstärken. PPV soll eine Immundysfunktion bewirken, die ein gesteigertes Eindringen von PCV-2 in Zellen erleichtern soll (Ellis *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 1999; Kennedy *et al.*, 2000). Der PMWS-Komplex tritt meist bei Saug- und Absatzferkeln auf und ist wenig spezifisch: Abmagerung, Kümern, raues Haarkleid, reduziertes Allgemeinbefinden, Fieber, Atemwegssymptome und in einigen Fällen Ikterus (Hinrichs *et al.*, 1999, Mankertz *et al.*, 2000, Kennedy *et al.*, 2000). Die Morbidität von PMWS variiert zwischen 5 und 50% und die Letalität zwischen 40 und 100% (Morozov *et al.*, 1998, Krakowka *et al.*, 2000).

## 2.8 Diagnose

Kommt es in einem Bestand zu Fruchtbarkeitsstörungen, kann mit Hilfe verschiedener Untersuchungsmethoden auf porcines Parvovirus untersucht werden.

Die sensitivste und spezifischste Methode zum Nachweis von PPV ist die Polymerasekettenreaktion (Molitor *et al.*, 1991, Gradil *et al.*, 1994, Belak *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 1999). Nachteil dieser Methode sind ein hohes Kontaminationsrisiko und damit falsch-positive Ergebnisse. Um diese Risiken zu mindern wurde eine PCR entwickelt, bei der das PCR-Produkt an eine PPV-spezifische Sonde gebunden und anschließend colorimetrisch gemessen wird (Arnauld *et al.*, 1998).

Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik lässt sich porcines Parvovirus in Geweben nachweisen (Mengeling & Cutlip, 1975; Mengeling 1978; Joo *et al.*, 1976, 1977). Um Antigen nachzuweisen ist es nicht nötig, dass das Virus intakt ist. Jedoch kann bei gleichzeitiger Anwesenheit von Antikörpern im Gewebe die Sensitivität gemindert sein (Oraveerakul *et al.*, 1990; Molitor *et al.*, 1991; Waldvogel *et al.*, 1995). Diese Methode ist auch geeignet um den Erfolg einer Virusisolierung in Zellkultur nachzuweisen (Cartwright, 1970; Johnson, 1973; Mengeling, 1978).

Ein "slot-blot hybridization"-Protokoll mit nichtradioaktiven Sonden zum Antigennachweis in Gewebe und in Zellkultur wurde entwickelt und wird als 10-100fach sensitiver als die Immunfluoreszenztechnik beschrieben (Oraveerakul *et al.*, 1990).

Es ist möglich, porcines Parvovirus auf Zellkultur zu isolieren, jedoch nimmt die Infektiösität progressiv nach dem Tod des Fetus ab und die Isolierung in Zellkulturen ist daher häufig erfolglos (Mengeling & Cutlip, 1975; Mengeling, 1978). Wegen der hohen Tenazität ist bei diesen Verfahren auch das Kontaminationsrisiko sehr hoch (Cartwright, 1969).

Es wurden Hämagglutinationstests entwickelt, diese sind weniger sensitiv als eine PCR, relativ unspezifisch und empfindlich gegenüber Faktoren, die die Hämagglutination stören (Joo *et al.*, 1976; Molitor & Joo, 1990; Jenkins, 1992; Mengeling *et al.*, 1993).

Zum Nachweis von Antikörper gegen das porcines Parvovirus werden Hämagglutinationshemmtest (Cartwright *et al.*, 1969; Joo *et al.*, 1976), Serumneutralisationstest (Joo *et al.*, 1975), indirekter Immunfluoreszenztest (Sørensen *et al.*, 1980), Immundiffusionstechnik (Joo *et al.*, 1978), modifizierte direkte Komplementbindungsreaktion (Ruckerbauer *et al.*, 1978) und ELISA (Hohdatsu *et al.*, 1988; Jenkins *et al.*, 1992) verwendet. Da porcines Parvovirus endemisch vorkommt, ist ein

Nachweis von Antikörpern nur bedingt aussagekräftig. Bei adulten Tieren kann man bei negativem Ergebnis eine Beteiligung von PPV an den Fruchtbarkeitsstörungen ausschließen, bei positiven Ergebnis ist es jedoch nicht bewiesen. Da das porcine Parvovirus endemisch vorkommt, kann eine Infektion schon früher geschehen sein und einen hohen Antikörpertiter zur Folge haben. Aussagekraft besitzt nur ein Antikörpertiteranstieg, was allerdings bedeutet, dass die Tiere regelmäßig serologisch untersucht werden müssten (Morimoto *et al.*, 1972; Mengeling *et al.*, 1975; Rodeffer *et al.*, 1975). Werden Antikörper in Seren von Feten, totgeborenen Ferkeln oder von neugeborenen Ferkeln vor der Kolostrumaufnahme nachgewiesen, dann ist die Parvovirusinfektion im Uterus nachgewiesen, da maternale Antikörper nicht über die Plazentarschranke treten (Johnson & Collings, 1969, 1971; Cartwright *et al.*, 1971; Mengeling, 1972). Ist es nicht möglich Serum von Feten/Ferkeln zu gewinnen, kann man Körperflüssigkeiten auf Antikörper untersuchen (Cropper *et al.*, 1976; Joo *et al.*, 1976).

## 2.9 Verbreitung und Bekämpfung

Über die Häufigkeit des porcinen Parvovirus als Abortursache gibt es sehr unterschiedliche Angaben. So wurden bei zwei Untersuchungen in den USA nur in 4,9% bzw. 4,3% der Fälle von Aborten PPV nachgewiesen (Kirkbride & McAdaragh, 1978; Nielsen *et al.*, 1989). In den Niederlanden wurde bei einer ähnlichen Untersuchung in 10,6% der Fälle PPV nachgewiesen (Broll *et al.*, 1993). Eine weit höhere Häufigkeit von PPV bei Aborten wurde in Dänemark festgestellt, in 45% aller Proben wurde eine Beteiligung des Virus nachgewiesen (Sørensen & Askaa, 1981). In drei Studien in der Schweiz wurden in 48% (Zanoni *et al.*, 1984) bzw. in 38% (Brunner *et al.*, 1987), in der neuesten in 29,2% (Broll *et al.*, 1993) der untersuchten Abortfälle PPV nachgewiesen.

Zur Bekämpfung wurden zahlreiche inaktivierte Impfstoffe auf Öl-Emulsionsbasis, mit Aluminiumhydroxid-Adjuvantien (Joo & Johnson, 1977; Fujisaki *et al.*, 1978, Mengeling *et al.* 1979; Paul *et al.*, 1980, Edwards *et al.* 1986; Wrathall, 1988) und sogar mit Ginseng-Zusätzen (Rivera *et al.*, 2003) entwickelt. Allen gemeinsam ist, dass sie als inaktivierte Impfstoffe niedrige Antikörpertiter (0–640, gemessen mit einem Hämagglutinationsinhibitionstest) erzeugen. Bei Impfstoffen mit Aluminiumhydroxid-Adjuvantien fallen diese nach kurzer Zeit bei einem Großteil der Sauen unter die Nachweisgrenze (Brown *et al.*, 1987; Castro *et al.* 1992). Bei den Impfstoffen mit Öl-Emulsion wurde die Immunantwort als längerfristig (7-12 Monate) beschrieben (Wrathall *et*

*al.*, 1984; Edwards *et al.*, 1986). Untersuchungen auf Replikation von porzinem Parvovirus bei verschiedenen hohen Antikörpertitern lassen den Schluss zu, dass relativ hohe Antikörpertiter (>320) eine Replikation verhindern (Johnson *et al.*, 1976). Niedrige Antikörpertiter (<80) können eine lokale Replikation nicht verhindern (Mengeling *et al.*, 1979, Paul *et al.*, 1980), jedoch eine Virämie (Paul *et al.*, 1980), die die Voraussetzung für eine transplazentare Infektion der Feten ist (Mengeling & Cutlip, 1976). Deutlich höhere Antikörpertiter (320 – 1280) können mit einem Lebendimpfstoff erzeugt werden, dessen Ungefährlichkeit auch gezeigt wurde (Paul & Mengeling, 1980). Eine neue Entwicklung ist ein Baculovirussystem, das leere PPV-Kapside erzeugt. Die Immunantwort gegen den Impfstoff mit leeren Kapsiden war nicht von der gegen inaktivierte Impfstoffe unterscheidbar (Martinez *et al.*, 1992). In Europa, Kanada und USA sind nur inaktivierte Impfstoffe kommerziell erhältlich.

Trotz der sehr unterschiedlichen Häufigkeiten beim Nachweis von porzinem Parvovirus bei Abortgeschehen wird die Impfung gegen PPV als finanziell lohnenswert angesehen (Parke & Burgess, 1993). Diese Annahme wurde in einer weiteren Studie bestätigt (Gardner *et al.*, 1996).

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Polymerase-Kettenreaktion**

#### **3.1.1 Probenauswahl und Aufreinigung**

Zur Untersuchung auf PPV sind abortierte Feten und Mumien, unter Umständen auch lebensschwache Ferkel geeignetes Probenmaterial. Anderes Abortmaterial (wie Fruchthüllen) ist nicht zum Nachweis von PPV geeignet.

Zu untersuchende Gewebe zum Nachweis von PPV aus Feten und Mumien sind Leber, Lunge und, falls noch identifizierbar, Darmlymphknoten. Da es jedoch auch zur Fruchtdesorption kommen kann und dann kein Abortmaterial vorliegt, kann man auch Rektumtupfer von umrauschenden Sauen untersuchen. Diese werden in 4 ml einer Kochsalzlösung oder einem Zellkulturmedium aufbewahrt. Der Nachweis von PPV in diesem Fall hat zwar keine Beweiskraft für die Beteiligung von PPV an den Fruchtbarkeitsstörungen, ist jedoch ein Hinweis darauf.

Die Gewebeproben und Rektumtupfer (in Medium) wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

##### **3.1.1.1 Aufreinigung von Gewebe**

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit von Qiagen nach dessen Protokoll für Gewebe. Dabei wird Gewebe (25 mg) lysiert und anschließend auf die Silikat-Säulen gegeben. Bei dem Verfahren für Gewebe wird genomische, mitochondriale und auch virale DNA an eine Silikatgelmembrane gebunden. Nach zweimaligem Waschen der Säule wird die DNA mit 100  $\mu\text{l}$  Wasser (pH-Wert  $\sim 7,5$ ) eluiert. Das Eluat konnte sofort zum Virusnachweis mittels PCR verwendet werden.

##### **3.1.1.2 Aufreinigung aus Rektumtupferproben**

Um virale DNA aus Rektumtupfer aufzureinigen wurden die Tupfer in 3-4 ml Medium, bzw. Kochsalzlösung, über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. 200-400  $\mu\text{l}$  Probe wurden dann mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit nach dem Protokoll für Serum aufgereinigt. Dazu wird die Probe auch lysiert und anschließend auf die Silikat-Säule gegeben. Nach zwei Waschschritten wurde mit 100  $\mu\text{l}$  Wasser eluiert.

### 3.1.1.3 Aufreinigung aus Zellkulturüberstand

Um PPV in Zellkulturüberstand nachzuweisen, wurden 200 µl Medium mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit nach dem Protokoll für Serum aufgereinigt. Die Probe wird dabei lysiert und die DNA wird an die Silikat-Säulen gebunden. Nach zwei Waschschritten wurde mit 100 µl Wasser eluiert.

Alternativ wurde nach Angaben des Herstellers mit 200-400 µl eluiert und anschließend das Volumen auf 100 µl reduziert, um eine höhere DNA-Konzentration zu erhalten.

### 3.1.1.4 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich bei der sogenannten Amplifikation enzymatisch viele Kopien einer bestimmten Nukleotidsequenz herstellen. So kann man auch bei einer sehr geringen DNA-Menge eine bestimmte Nukleotidsequenz nachweisen.

Dazu werden als „Primer“ bezeichnete DNA-Oligonukleotide als Startermoleküle für die anschließende Replikation benötigt. Um Kopien einer bestimmten Sequenz herzustellen braucht man weiterhin ein Gemisch aller Desoxynukleotidtriphosphate, eine thermostabile DNA-Polymerase, wie z.B. die Taq-Polymerase, Puffer und Magnesiumchlorid, das wichtig für die Bindung der Primer an die Ausgangs-DNA ist.

Die drei Grundschritte der Polymerase-Kettenreaktion:

1. Erzeugung von Einzelsträngen durch Hitzedenaturierung bei 90 – 94°C
2. Hybridisierung mit strangspezifischen Primern bei der „annealing temperature“
3. Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Hitzedenaturierung werden die zwischenmolekularen Bindungen der DNA-Doppelhelix aufgebrochen und man erhält einzelsträngige DNA. Nun können die Oligonukleotid-Primer an die Zielsequenz binden. Dies geschieht bei circa 5°C unter dem primerspezifischen Schmelzpunkt. Bei niedrigen Temperaturen können Primer unspezifisch an die DNA binden. Sie bilden dabei jedoch im Verhältnis zu einer spezifischen Hybridisierung nur schwache Bindungskräfte aus. Bei höheren Temperaturen werden diese aufgespalten, so dass nur noch Primer, die an den richtigen DNA-Abschnitt gebunden haben, angelagert bleiben. Erhöht man die Temperatur, wird die Spezifität erhöht. Ist sie jedoch zu hoch, dann kommt es trotz Vorliegen des gesuchten DNA-Abschnitts zu keiner

Amplifikation. Die Taq-Polymerase erkennt die Primer als Startpunkte und synthetisiert mit Hilfe der Desoxynukleotridtriphosphate einen komplementären DNA-Strang. Pro Amplifikationsschritt kann theoretisch die Anzahl der Kopien verdoppelt werden (exponentieller Anstieg) und so erhält man in der Regel nach 30-40 Amplifikationsschritten genügend DNA um sie durch andere Methoden zu detektieren (Abbildung 9).

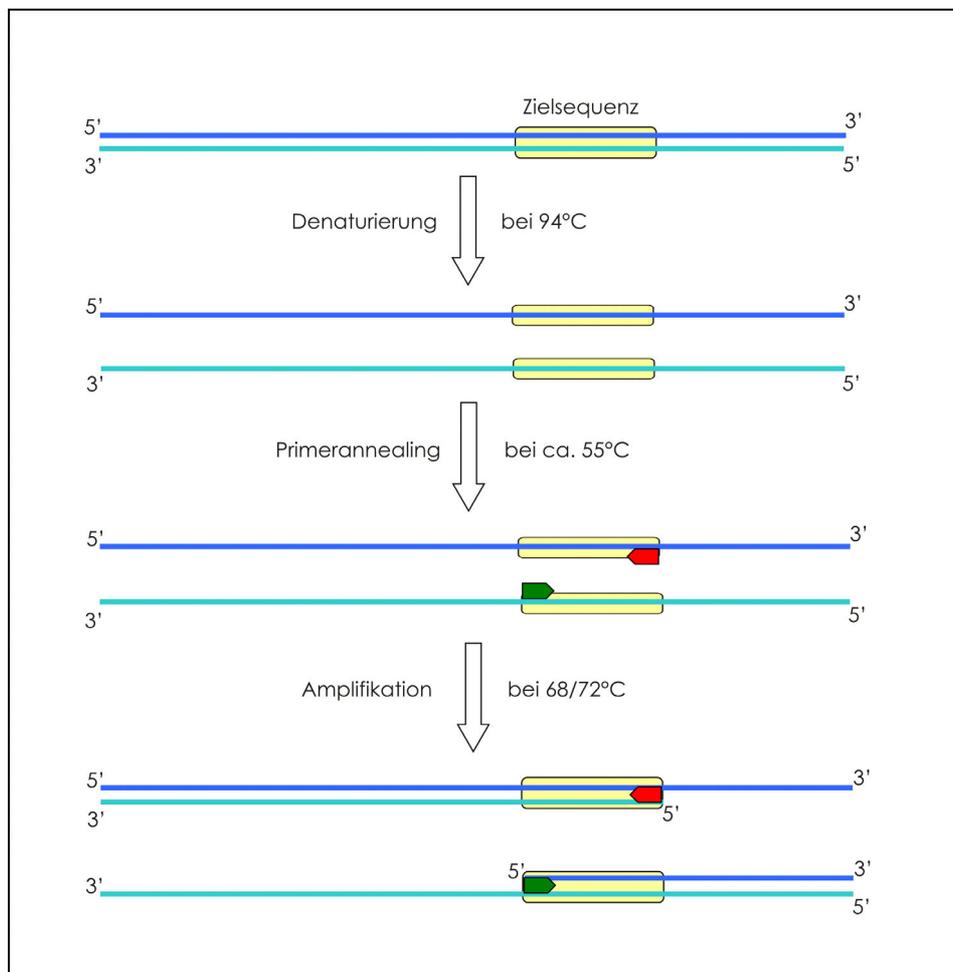


Abbildung 9: Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Bei einer klassischen PCR wird die DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Dies lässt sich durch UV-Licht sichtbar machen.

Bei der TaqMan<sup>®</sup>- und bei der LightCycler<sup>®</sup>-PCR werden bei der Amplifikation in die „minor groove“ der DNA-Doppelhelix SYBR Green<sup>®</sup>-Moleküle eingelagert. So gebundene SYBR Green<sup>®</sup>-Moleküle fluoreszieren, wenn sie dazu angeregt werden, ungebundene hingegen kaum (Abbildung 10). Kommt es zur Synthese eines DNA-Fragmentes, werden im Laufe der Zyklen immer mehr SYBR Green<sup>®</sup>-Moleküle in das PCR-Produkt eingebaut, und damit steigt die Fluoreszenz an. Diese wird nach jedem Zyklus gemessen und graphisch dargestellt. Ab

einer gewissen Zykluszahl kommt es auch bei Fehlen des gewünschten Produkts zu einer Fluoreszenz, vor allem durch Primer-Dimere. Dies kann die Auswertung der Fluoreszenz-Graphen erschweren, wenn sehr wenig Ausgangskopien vorhanden sind und es daher auch erst sehr spät zu einem Anstieg der Fluoreszenz kommt. Diese lässt sich möglicherweise nicht von einer unspezifischen Fluoreszenz abgrenzen. Um dies zu unterscheiden wird die Fluoreszenz bei der Dissoziation der DNA-Stränge bei dem finalen Denaturierungsschritt gemessen. Die so erstellte Schmelzkurve ist typisch für jedes Produkt und so kann unspezifische Fluoreszenz von spät einsetzender, aber spezifischer Fluoreszenz unterschieden werden. Ebenso können in diesem Schritt Produkte einer unspezifischen Amplifikation bei einem „mis-priming“ von dem gesuchten Produkt unterschieden werden.

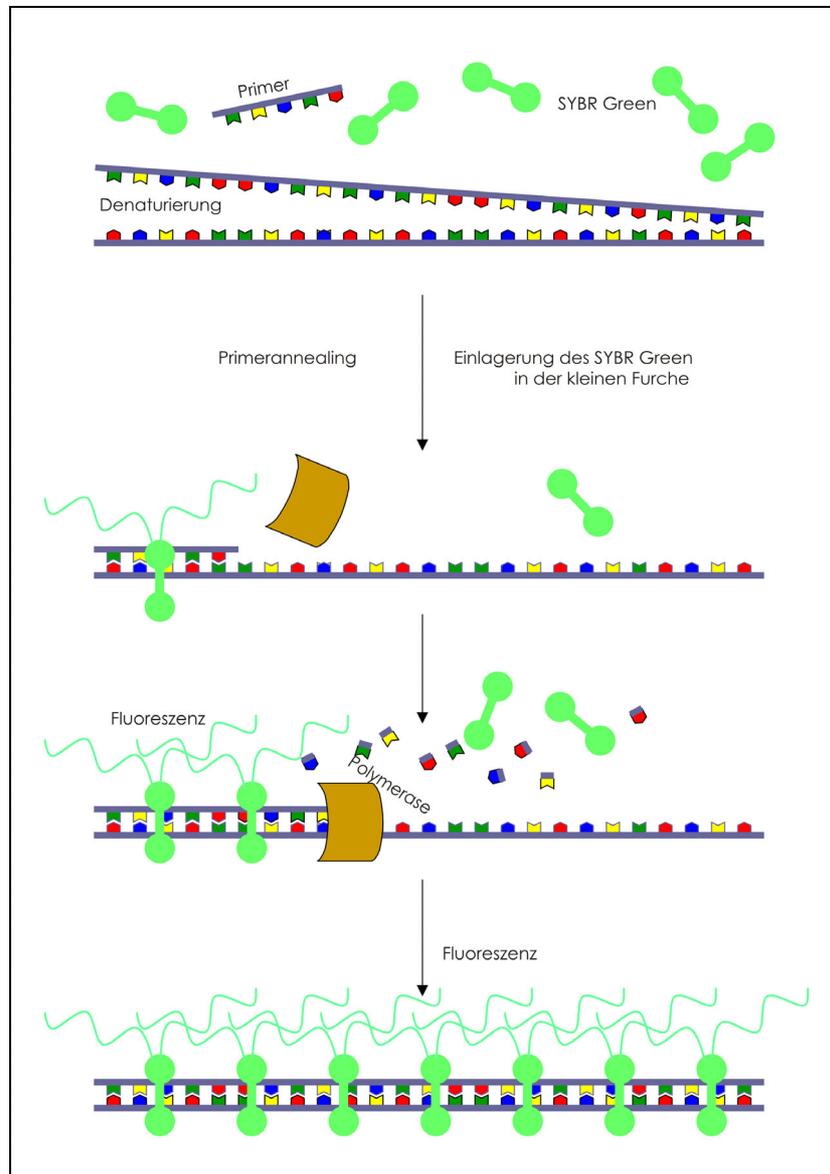


Abbildung 10: Prinzip einer mit Hilfe von Fluoreszenz gemessenen PCR (TaqMan<sup>®</sup>, LightCycler<sup>®</sup>), nur in der "minor-groove" gebundenes SYBR Green

Nachteilig an dieser mit Hilfe von SYBR Green<sup>®</sup> gemessenen PCR-Reaktion ist, dass das Amplifikat in einem hochkonservierten Bereich liegen muss, da sonst die Schmelzkurve nicht zum Abgrenzen von unspezifischen Amplifikaten geeignet ist. Vorteile dieses Systems sind wenige Arbeitsschritte, eine höhere Sensitivität, gute Dokumentation und schnellere Ergebnisse, da eine Gelelektrophorese unnötig ist. Kontaminationsrisiken durch PCR-Produkte werden vermindert, da die Reaktionsgefäße nicht mehr geöffnet werden müssen. Der Thermocycler des LightCycler<sup>®</sup> arbeitet mit Luftheizung und -kühlung, so ist ein schnellerer Ablauf der PCR möglich. Der Thermocycler des TaqMan<sup>®</sup> hat den Vorteil, dass ein großes Probenvolumen gleichzeitig gefahren werden kann (bis 96 Stück).

### Auswahl der Primer:

Zur Auswahl der Primer wurden zwei verschiedene Primerdesignprogramme verwendet. Einerseits wurde das Programm OLIGO (Version 4.0) verwendet. Anhand des Referenzstammes NADL-2 Casal wurden zwölf sich in ihrem Amplifikat überlappende Primerpaare (D2s-as bis D7s-as, D213s-D486as, D534s-D745as, D1411s-D1810as, D2593s-D3571as, D4021s-D4870as) herausgesucht und mit weiteren bekannten Isolaten (NADL-2 Compans, NADL-2 Casal, NADL-2 Bergeron, Kresse) abgeglichen. Längere Abschnitte komplementärer Basenpaare innerhalb der Primersequenzen wurden streng vermieden und die Schmelztemperatur der kombiniert eingesetzten Primer eines Paares weist keine Variationen auf.

Um das Kapsid der Feldisolate zu erhalten, wurde vor allem mit dem „hotshot“-Verfahren von SeqLab, Göttingen sequenziert. Bei diesen Verfahren werden PCR-Produkte der Größe 300 bp bzw. bei extended „hotshot“ bis 550 bp sequenziert, so dass neue Primer für den Kapsidbereich ausgewählt und synthetisiert wurden. Dies geschah mit Hilfe des Programms Jellyfish, (Version 1.5, F. Biowire). Dabei wurden fünf überlappende Primerpaare (PPV I s-as bis PPV V s-as, herausgesucht. Um den kompletten Kapsidbereich optimal abzudecken wurden die Primer mit denen für die Sequenzierung des IDT-Virus ergänzt.

Nach Auswahl der entsprechenden Sequenzbereiche wurden die Primer von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert, HPSF gereinigt und lyophilisiert. Sie wurden mit Wasser (Ultrapur<sup>®</sup>, Merck) gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

Position der Primer und Größe der Amplifikate:

Primer	Primersequenz	Position (bezogen auf PARPOVNAD)
D2s	5'-AAA AGC TAC CAA CTG GCT TCA AGA T-3'	301-325
D2as	5'-CCA TGT TCA TGC TGT ATG AAC CAG TAG C-3'	603-630
D3s	5'-TCT CTT TGA AGG TAT ATT GCA AAA GAA CCT-3'	559-588
D3as	5'-AAA TTT TCT CCT CCG GTT TGA GCC ATC ATT-3'	1197-1227
D4s	5'-TGG ATG ATG ACA GAT CCA GAC AGT T-3'	1166-1190
D4as	5'-CCC CAA TGA TGC ATA TAG CTA GCC A-3'	1902-1927
D5s	5'-GGC CAC TAA TAT GTG CTT GGT T-3'	1854-1875
D5as	5'-TTG GAG CAG GTC TTT TTC CTG G-3'	2697-2718
D6s	5'-AAG ATC GCC GAG AAA ACA CCC A-3'	2663-2684
D6as	5'-TTG TCC AGT GTA TGT TGG TGG ATT-3'	3438-3461
D7s	5'-CCA TGG TTA CCT ACA AAA CCA ACT C-3'	3378-3401
D7as	5'-ACA GGT GCA GTA TTG TTT AGT GCT GTT-3'	4135-4159
D213s	5'-CCT TTC TGC TTC AGA CTG C-3'	200-218
D486as	5'-ATT CCA TGT CTG TTG CCT G-3'	483-491
D534s	5'-CGG CAA GTA CTG ATT TTT GA-3'	521-540
D745as	5'-TGC ATT GCA TTA TTA ACC ATC-3'	732-552
D1411s	5'-AAC TCC AAT CCA GGA GGA C-3'	2050-2069
D1810as	5'-TAG GCT TCG TCG TGT TCT T-3'	2432-2454
D2593s	5'-TAC TTC TTC AGA GCA AAG CG-3'	2580-2599
D3571as	5'-CCT GTG GAG AAT TCA TCT CC-3'	3558-3577
D4021s	5'-CAA TTT AAT CAA CAG GCA CC-3'	4008-4027
D4870as	5'-ACC ACC ACC CTA AAG ACA TAA-3'	4856-4880
PPV I s	5'-ATG CAT CAT TGG GGA AAT GT-3'	1913-1932
PPV I as	5'-TTC GTC GTG TTC TTT TGC TG-3'	2443-2462
PPV II s	5'-CAG CAA AAG AAC ACG ACG AA-3'	2443-2462
PPV II as	5'-CCC CAT GCG TTA GCA TCT AT-3'	3117-3136
PPV III s	5'-GGG AGG GCT TGG TTA GAA TC-3'	2950-2969
PPV III as	5'-TCC TAC CTG AGC TGG CCT AA-3'	3772-3791
PPV IV s	5'-TTA GGC CAG CTC AGG TAG GA-3'	3772-3791
PPV IV as	5'-TTT CTG CTG TTG TTG TGT GTT G-3'	4417-4437
PPV V s	5'-TCA AAC TTT TGG TGG AAA GGA-3'	4341-4361
PPV V as	5'-GGG CGA CCA ACT AAC TCA AA-3'	4899-4918

Tabelle 1: Alle für die Sequenzierung benützten Primern mit Sequenz und Position auf Bezugssequenz NADL-2 Bergeron (Tabelle 11)

### Grundsätzliches zur Durchführung der PCR:

Bei jeder PCR wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde zunächst Zellkulturüberstand des Impfstammes NADL-2 verwendet. Später eine 1:1000 Verdünnung einer Gewebeaufreinigung des Feldisolates 27a mit dem Qiagen QIAamp DNA Mini Kit. Als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet.

Für jeden PCR-Ansatz wurde ein Mastermix hergestellt. Hierbei wurden die PCR-Komponenten (Taq-Polymerase, Puffer, MgCl<sub>2</sub>, Primer) in einem Reaktionsgefäß für alle Ansätze vermischt und anschließend in die Gefäße für die Polymerasekettenreaktion pipettiert. Auf diese Weise konnte das Kontaminationsrisiko durch Reduzierung der Pipettierschritte vermindert werden. Zusätzlich hat dies den Vorteil, dass alle Komponenten gut vermischt werden und in jedem Gefäß für die PCR die gleiche Zusammensetzung von Komponenten vorhanden ist. Anschließend wurde die Probe hinzupipettiert. Alle Schritte wurden, bevor die Ansätze in den Thermocycler gegeben wurden, auf Eis durchgeführt.

Der Mastermix wurde räumlich getrennt von der Probenzugabe angesetzt. Die weitere Bearbeitung der PCR wurde in einem getrennten Raum durchgeführt. So konnte die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse durch Kontaminationen gemindert werden.

### **3.1.2 Nachweis von PPV**

Um Feldisolate zu detektieren wurden Gewebeproben mit Hilfe verschiedener diagnostischer Polymerasekettenreaktionen auf porcines Parvovirus untersucht.

#### **3.1.2.1 TaqMan<sup>®</sup>-PCR**

Im Zeitraum April 2001 bis September 2001 wurde der PPV-Nachweis mit Hilfe des TaqMan<sup>®</sup> GeneAmp<sup>®</sup> 5700 durchgeführt. Die Auswahl der spezifischen Primer erfolgte mit Hilfe der TaqMan<sup>®</sup> Primerexpresssoftware (Version 1.0, PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert, HPSF gereinigt und lyophilisiert. Sie wurden mit reinst Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Größe des Amplifikats: 68 Basen

Primer PPV sense: 5'-AAG AAC CTA AGT CCA AGT CAC TGC TAC-3'

Primer PPV antisense : 5'-GTG ATA GCC AGT ATC TTG ACC ATG TT-3'

TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Ansatz

Verwendeter PCR-Kit: AppliedBiosystems SYBR Green<sup>®</sup> PCR Core Reagents

Reaktionskomponenten	Konzentration in 50µl Reaktionsansatz	Volumen
10x Sybr PCR Buffer		5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	6 µl
DNTP Mix	10 mM	4 µl
AmpliTaq Gold	1,25 units	0,25 µl
Primer PPV sense	100 pmol	1 µl
Primer PPV antisense	100 pmol	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	27,75 µl
Probe		5 µl

Tabelle 2 Reaktionskomponenten des TaqMan<sup>®</sup>-Ansatzes

Thermocyclerprogramm:

95°C für 10 Minuten

95°C für 15 Sekunden

60°C für 1 Minute

} 40 Wiederholungen

**3.1.2.2 LightCycler<sup>®</sup>-PCR**

Ab Oktober 2001 stand der LightCycler<sup>®</sup> zur Verfügung. Die Primer vom TaqMan<sup>®</sup> konnten jedoch nicht übernommen werden, da das Amplifikat zu klein ist. Es ließ sich leider kein Primerpaar mit der geeigneten Amplifikatgröße finden, dass keine Mutationen auf einem Feldvirus aufwies, so dass es nicht zuverlässig zu einem Amplifikat kam, das mit Hilfe des LightCycler<sup>®</sup> nachzuweisen war.

LightCycler<sup>®</sup>-PCR-Ansatz:

Verwendeter PCR-Kit: LightCycler<sup>®</sup> - Faststart DNA Master SYBR Green<sup>®</sup> I

Reaktionskomponenten	Konzentration in 20µl Reaktionsansatz	Volumen
PCR-grade H <sub>2</sub> O		11,6 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 mM	2,4 µl
Primer Mix	je 0,5 µM	2 µl
LightCycler – DNA Master SYBR Green I	1x	2 µl
Probe		2 µl

Tabelle 3: Reaktionskomponenten für LightCycler<sup>®</sup>-Ansatz

Thermocyclerprogramm:

*Programm 1:* Denaturation: 95°C für 30 Sekunden

*Programm 2:* Amplifikation: 95°C für 0 Sekunden  
55°C für 10 Sekunden  
72°C für 20 Sekunden } 45 Wiederholungen

Fluoreszenzmessung: einmalig, bei 72°C

*Programm 3* Dissoziationskurve: 95°C für 0 Sekunden  
65°C für 15 Sekunden

Erhöhen der Temperatur um 0,1°C/sek bis 95°C

Fluoreszenzmessung: kontinuierliche

*Programm 4:* Kühlen: 40°C für 30 Sekunden

### 3.1.2.3 Klassische PCR

Der Nachweis von PPV ab Oktober 2001 erfolgte mit Hilfe einer klassischen Polymerase-Kettenreaktion. Das verwendete Primerpaar wurden aus den Primerpaaren zur Sequenzierung mit Hilfe von Verdünnungsreihen von MSV und dem Feldisolat 26b ausgesucht. Es handelt sich dabei um Primer, die spezifisch für PPV sind und keine Mutationen bei Feldisolaten aufwiesen. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert, HPSF gereinigt und lyophilisiert. Sie wurden mit reinst Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Eine geeignete MgCl<sub>2</sub>-Konzentration wurde mit Hilfe der ABgene<sup>®</sup> PCR Optimisation Plate ReddyMix<sup>™</sup>(Ab-09667LD) ermittelt. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit 1.1x ReddyMix<sup>™</sup> PCR Master Mix mit 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Dieses Produkt enthält schon Laufpuffer, so dass dieser nach der PCR nicht dazugegeben werden musste. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Das Amplifikat hat die Größe von 997 Basen.

Primer D2593s: 5'- TAC TTC TTC AGA GCA AAG CG -3'

Primer D3571as: 5'- CCT GTG GAG AAT TCA TCT CC- 3' (Tabelle 1)

Reaktionskomponenten	Konzentration in 50µl Reaktionsansatz	Volumen
PCR Master Mix		44 µl
Taq DNA Polymerase	1,25 units	
Tris-HCl	75 mM	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mM	
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	
Tween 20	0,01% (v/v)	
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,2 mM	
Präzipitant, roter Farbstoff für Elektrophorese		
Primer 2593s	50 pmol	0,5 µl
Primer 3571as	50 pmol	0,5 µl
Probe		5 µl

Tabelle 4 Reaktionskomponenten für klassische PCR-Ansatz

PCR-Programm:

1. initiale Denaturierung bei 94°C für 5 Minuten
  2. Denaturierung bei 94°C für 1 Minute
  3. Annealing bei 55°C für 2 Minuten
  4. Elongation bei 72°C für 3 Minuten
  5. finale Elongation bei 72°C für 5 Minuten
- } 35 Wiederholungen

### 3.2 Gelelektrophorese

Die Auswertung der PCR erfolgte in 1%igen (w/v) Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlung auf ca. 50°C in die vorbereitete Form gegossen. Je nach Slotgröße wurden 7-15 µl der Polymerasenkettenreaktion in diesen eingefüllt. Als Längenstandard wurden eine 100kb ladder extended verwendet. Nach Auftrennung der Banden bei 140V wurde das Gel im Ethidiumbromidbad für 20 Minuten gefärbt und anschließend bei UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm mittels einer CCD-Kamera digital photographiert und archiviert. Über das Computerprogramm Multi-Analyst (Version 1.1, BioRad®) wurde die so erstellte Datei auf einem Thermodrucker ausgedruckt.

### 3.3 PCR-Reaktionsansätze zur Sequenzierung

#### 3.3.1 Sequenzierung des IDT-Viruses

verwendetes PCR-Kit: Clontech Advantage®-HF 2 PCR Kit

verwendete Primer: D2s-as, D3s-as, D4s-as, D5s-as, D6s-as, D7s-as, D213s-D486as, D534s-745as, D1411s-1810as, D2593s-3571as, D4021s-4870as (Tabelle 1)

Reaktionskomponenten	Konzentration in 50µl Reaktionsansatz	Volumen
10x HF 2 PCR Buffer Zusammensetzung unbekannt		5 µl
10x HF 2 dNTP Mix	je 10 mM	5 µl
Primer sense	100 pmol	1 µl
Primer antisense	100 pmol	1 µl
50x Advantage-HF 2 Polymerase Mix: Glycerol Tris HCl KCl EDTA	1.0% 0,3 mM 1,5 mM 20 µM	1 µl
Probe		5 µl
PCR-Grade H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	32 µl

Tabelle 5: Reaktionskomponenten für die klassische PCR mit dem Impfstamm von IDT

#### Thermocyclerprogramm:

94°C für 2 Minuten  
 94°C für 15 Sekunden  
 55°C für 30 Sekunden  
 68°C für 1,5 Minuten  
 68°C für 10 Minuten  
 4°C bis zur weiteren Verwendung

} 35 Wiederholungen

### 3.3.2 Sequenzierung des Kapsids der Feldisolate

Verwendetes PCR-Kit: ABgene® 1.1x ReddyMix™ PCR Master Mix with 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>

Verwendete Primer: PPV I-V s-as, D5s+as, D4021s-D4870as(Tabelle 1)

Reaktionskomponenten	Konzentration in 50µl Reaktionsansatz	Volumen
PCR Master Mix		44 µl
Taq DNA Polymerase	1,25 units	
Tris-HCl	75 mM	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mM	
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	
Tween 20	0,01% (v/v)	
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 0,2 mM	
Präzipitant, roter Farbstoff für Elektrophorese		
Primer sense	50 pmol	0,5 µl
Primer antisense	50 pmol	0,5 µl
Probe		5 µl

Tabelle 6: Reaktionskomponenten für klassische PCR für die Kapsidsequenzierung

#### Thermocyclerprogramm:

94°C für 5 Minuten

94°C für 1 Minute

55°C für 2 Minuten

} 35 Wiederholungen

72°C für 3 Minuten

72°C für 7 Minuten

4°C bis zur weiteren Verwendung

### 3.3.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach Nachweis des gewünschten PCR-Produkts wurde dieses mit Hilfe des Qiagen QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt. Dabei werden größere DNA-Fragmente an eine Membran gebunden und mit Hilfe eines Waschschrtes die restlichen Bestandteile der PCR herausgewaschen. Anschließend wurde das Produkt mit Wasser (pH-Wert ~ 7,5) eluiert und konnte weiterverwendet werden.

#### Gelextraktion:

War mit Hilfe der Gelelektrophorese mehr als ein PCR-Produkt zu erkennen, wurde das Produkt mit der richtigen Größe aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das gewünschte Produkt aus dem Gel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Dazu wurde das Gel aufgelöst und die DNA an eine Membran gebunden und nach zwei Waschschritten mit Wasser eluiert.

### **3.4 Klonierung viraler DNA**

Die Insertion von viralen DNA-Fragmenten in einen pCR<sup>®</sup>2.1-Vektor erfolgte durch Ligation der DNA-Stränge mit T4-DNA-Ligase mit dem TA-Cloning<sup>®</sup>-Kit von Invitrogen. Die Taq-DNA-Polymerase erzeugt bei der Amplifikation einen Adenosinüberhang am 3'-Ende. Dadurch ist es möglich das PCR-Produkt in den Plasmid-Vektor zu ligieren. Anschließend wurden die Plasmide in TOP10 (E.coli) – Bakterien transformiert.

Damit es zu keiner unerwünschten Vermehrung von Bakterien kommen kann, die kein Plasmid aufgenommen haben, enthält der Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 ein  $\beta$ -Lactamase-Gen, das eine Ampicillinresistenz bewirkt. Weiterhin enthält der Vektor das sogenannte  $\alpha$ -Peptid-Gen, das dem N-terminalen Ende des lacZ-Gens entspricht. TOP10-Bakterien fehlt genau dieser Bereich des lacZ-Gens. TOP10-Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, würden durch die  $\alpha$ -Komplementation somit ein komplettes lacZ-Gen erhalten. Das  $\alpha$ -Peptid-Gen wird jedoch, wenn ein PCR-Produkt (=“insert“) erfolgreich in die Einsetzstelle des pCR<sup>®</sup>2.1-Vektor (=“cloning site“) ligiert wird, zerstört. Das lacZ-Gen kodiert die  $\beta$ -Galaktosidase. Die Translation dieses Enzyms wird durch IPTG induziert und kann dann das farblose X-Gal in das entsprechende Indoxylderivat hydrolysieren, das an der Luft zum blauen 5,5'-dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird.

Wenn man folglich spezielle Nährböden verwendet, lassen sich leicht Bakterien mit Plasmid mit „insert“ von Bakterien ohne Plasmid, oder mit Plasmid aber ohne „insert“ unterscheiden. Mit einem Ampicillinzusatz lässt sich die Vermehrung von nicht transformierten Bakterien verhindern. Mit einem IPTG- und X-Gal-Zusatz lassen sich Klone mit und ohne „insert“ unterscheiden. Bakterien mit Plasmid aber ohne „insert“ translatieren die  $\beta$ -Galaktosidase und die Kolonie wird blau gefärbt. Bakterien mit Plasmid und mit „insert“ können das Enzym nicht translatieren und bleiben weiß.

Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht ist dies leicht zu erkennen und die weißen Bakterienkolonien konnten zur Plasmid-DNA-Isolierung weiterverarbeitet werden.

### 3.4.1 Ligation

Ligationsansatz:	10x Buffer T4	1 µl
	T4 Ligase	1 µl
	PCR 2.1 Vector	1 µl
	aufgereinigtes PCR-Produkt	7 µl

bei 14°C über Nacht

### 3.4.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Von einer frischen Übernachtskultur TOP10 wurden 1 ml in 100 ml LB-Bouillon gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden sie für 15 Minuten auf Eis gekühlt und bei 4°C und 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 30 ml eiskalten TFB-I resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C, 3000 rpm für 5 Minuten wurde das Bakterienpellet mit 4 ml TFB-II resuspendiert. Je 60 µl der Bakteriensuspension wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 3.4.3 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Amplifikation der Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien mit den rekombinanten Plasmiden transformiert. Dazu wurden 5 µl des Ligationsansatzes auf eisgekühlte TOP10-Bakterien gegeben und durch vorsichtiges Rühren mit diesen gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Plasmide durch einen Hitzeschock (2 Minuten bei 42°C) in die Bakterien geschleust und anschließend wurden 400 µl LB-Bouillon dazugegeben und für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden auf 3 LB-Z-Platten zu 50 µl, 100 µl und 200 µl ausgespatelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die auf den Nährbodenplatten gewachsenen weißen Bakterien wurden gepickt und in 4 ml LB-Bouillon mit 200 mg Ampicillin über Nacht bei 37°C aufgeschüttelt.

### 3.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

#### 3.4.4.1 Plasmidschnelltest (Minipräparation)

Um zu testen, ob die transformierten, rekombinanten Bakterien das richtige „insert“ tragen, wird Plasmid-DNA gebraucht.

Von den aufgeschüttelten Bakterien wurden circa 1,5 ml Suspension mit dem Qiagen QIAprep Miniprep Kit aufgereinigt. Dabei werden die Bakterien lysiert, Plasmid-DNA an

Affinitäts-Membrane gebunden, gewaschen und mit 50 µl Wasser eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### Restriktionsenzymverdau:

Das „insert“ ist bei dem verwendeten Vektor von EcoRI-Schnittstellen flankiert. Somit kann es mit Hilfe des Restriktionsenzym Eco RI aus dem Plasmid geschnitten werden.

Verdau:	Plasmid	10 µl
	Eco RI	0,5 µl
	Eco RI Buffer	2 µl
	Wasser	7,5 µl

bei 37°C für 2 Stunden inkubieren

Anschließend der Ansatz mit Hilfe von Gelelektrophorese auf die richtige Größe des „insert“ getestet.

#### **3.4.4.2 Plasmid-DNA Aufreinigung (Midipräparation)**

Um größere Mengen von Plasmid zu gewinnen wurden die Bakterien in größeren Volumen aufgeschüttelt. Dazu wurde 1 µl einer Übernachtskultur zu 100 ml LB-Bouillon mit 100 µl Ampicillin gegeben und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das Wizard<sup>®</sup> Plus Midipreps DNA Purification System nach Herstelleranleitung verwendet.

Die Plasmide wurden in 100 µl Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

### **3.5 DNA-Sequenzierung**

Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung:

Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem SmartSpect (BioRad). Dazu wurden die PCR-Produkte bzw. die Plasmide 1:20 verdünnt und die Dichte gemessen. Danach wurde die Plasmid-DNA auf die von Seqlab gewünschte Dichte, abhängig von der Länge der gewünschten Sequenzierung, eingestellt. PCR-Produkte wurden mit der SpeedVac Zentrifuge eingedampft und anschließend mit Wasser in die gewünschte Konzentration gelöst.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) mit Hilfe des PCR-Cycle-Sequencing-Verfahrens durchgeführt. Plasmid-DNA wurde mit den Primern M13 bzw. M13rev, analog zur Vektor-DNA, verwendet. Bei der Sequenzierung direkt aus dem PCR-Produkt wurde das sogenannte „Hot Shot Sequencing“-Verfahren angewendet, dabei werden 200 ng des PCR-Produkts in 7 µl Wasser mit 20 pmol eines Primers sense oder antisense in einem 0,2ml Reaktionsgefäß eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Chromas (Version 1.45, Conor McCarthy) überprüft und mit Jellyfish (Version 3.0, Fa. LabVelocity) und GeneJockeyII (Fa. Biosoft, UK) weiterbearbeitet, zusammengefügt und gespeichert.

#### Erstellung der Phylogramme:

Zum Erstellen von Stammbäumen auf Basis der erhaltenen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des VP1/VP2 wurde das Programm Paup (Version 3.1.1; Sofford Laboratory of Molecular Systematics, USA) verwendet. Ein "consensus" Stammbaum wurde erstellt. Dabei wurde mit der "search"-Option: "bootstraps" gearbeitet. "bootstraps"→"bootstrap-options" 100: "Number of replicates 100"; "Random of number seed: 1"; "Type of search": "branch-bound";→"branch-and-bound search options": "Initial upper bound" ("compute via stepwise"), "keep"("minimal trees only"), "Collapse zero-length branches", "save all minimal trees".

### **3.6 Zellkultur**

Es wurden STE-, PK15- und SPEV-Zellen verwendet.

Bei den STE-Zellen handelt es sich um eine Epithelzelllinie aus dem Hoden vom Schwein, bei den PK15- und SPEV-Zellen um Zellen aus Schweinenieren. STE steht für **S**wine-**T**esticular-**E**pithel, PK für **P**orzine-**K**idney, die SPEV-Zelllinie stammt aus Russland und die genaue Bedeutung der Abkürzung ist leider nicht bekannt.

Alle Zelllinien wurden von der Zellbank der Bundesforschungsanstalt (BFAV) zur Verfügung gestellt. Sie sind auf PPV, Bakterien, Mykoplasmen, Pilze und weitere 7 porzine (KSPV, TGEV, Adeno-Virus, Rota-Virus Typ A, HE-Virus, Enteroviren, BVDV) negativ getestet worden.

### 3.6.1 Kultivierung von STE-Zellen

STE-Zellen wurden in Minimal Essential Medium Modified with Hank's Salts and L-Glutamin, mit Zusatz von Natriumpyruvat, Non Essential Aminoacids, 10% FKS und mit 850mg/l Natriumbicarbonat gehalten. Beim Halten von STE-Zellen mussten folgende Behandlungsmaßnahmen (nach R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, 1988) eingehalten werden, da sonst das Wachstum unbefriedigend bis schlecht ist: Die Zelllinie wurde in einer geschlossenen Plastik-Zellkulturflasche gehalten, eine feuchte CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wie in CO<sub>2</sub>-Brutschränken ist für optimales Wachstum nicht geeignet. Für jede Passage musste eine neue Zellkulturflasche verwendet werden, da schon bei einer Passage in der gleichen Flasche die Zellen nicht mehr den Flaschenboden gleichmäßig bedecken. Das Medium musste Zimmertemperatur haben.

Zum Teilen wurde das Medium abgenommen, anschließend mit 4 ml PBS (ohne MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>) bei einer mittleren Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) gewaschen. Dann wurden 2 ml STV dazu gegeben, diese wirkten circa 15 Sekunden ein, wurden abgenommen und die Zellkulturflasche wurde für 2-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vom Boden abklopft und mit Medium vorsichtig, möglichst ohne Schaumbildung, resuspendiert, geteilt, umgesetzt und frisches Medium wurde dazu gegeben, bei einer mittleren Zellkulturflasche war ein Gesamtvolumen von 15 ml (1ml/5cm<sup>2</sup>) ideal. Um die Zellen gleichmäßig im Medium und damit in der Flasche zu verteilen, wurde die Flasche vorsichtig geschwenkt. Danach wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Ein gutes Wachstum erhält man, wenn 2-3 mal pro Woche die Zellen 1:4 geteilt werden.

#### Kryokonservierung von STE-Zellen:

Um ein erfolgreiches Auftauen zu gewährleisten wurden die Zellen mit STV, wie bei der Kultivierung beschrieben, abgelöst. Um das Trypsin zu entfernen wurden sie anschließend bei 1100 rpm, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium mit 10% FKS und 7,5% DMSO aufgenommen. Mit einer Zellsuspension aus einer großen Zellkulturflasche wurden 6 Kryoröhrchen befüllt. STE-Zellen sollen bis -60°C ein Grad Celsius pro Minute abkühlen. Dies wurde erreicht, indem man die Kryoröhrchen in Baumwollwatte einschlug, in eine Styroporbox mit circa 1cm Wanddicke legte und die Box für 1 Stunde in eine -60°C (oder kühlere) Gefriertruhe lagerte. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

### Auftauen von STE-Zellen:

Die Kryoröhrchen wurden in handwarmem Wasser aufgetaut. Die Zellen wurden schrittweise und langsam mit Medium verdünnt. Um das DMSO vollständig zu entfernen wird bei 1100rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet vorsichtig mit 5ml Medium resuspendiert, dabei wurde Schaumbildung vermieden. Die Zellen eines Kryoröhrchen wurden in eine kleine Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen angeheftet hatten, wurde das Medium gewechselt, um die sich nicht anheftenden Zellen zu entfernen.

### **3.6.2 Kultivierung von PK15-Zellen**

Die Zellen wurden in Minimal Essential Medium with Earle's Salts mit 10% FKS gehalten und regelmäßig 1:3 bis 1:5 passagiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS (ohne MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>) wurden 2 ml STV auf eine mittlere Zellkulturflasche gegeben, nach circa 15 Sekunden abgenommen, für 10-20 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend die Zellen vom Boden abgeklopft. Die Zellen wurden dann mit frischem Medium resuspendiert, geteilt und Medium wurde auf ein Gesamtvolumen von circa 25 ml eingestellt. Die Zellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen mit Filterdeckel im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C und feuchter 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

### **3.6.3 Kultivierung von SPEV-Zellen**

Als Zellkulturmedium wurde Minimal Essential Medium with Hank's Salts und L-Glutamin mit einem Zusatz von 5-10% FKS verwendet. Die Zellen wurden 1-2 mal pro Woche 1:5 bis 1:10 geteilt. Zuerst wurde mit PBS gewaschen und anschließend wurden 2 ml STV für 15 Sekunden auf den Zellen gelassen, abgenommen und für 20-30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden vom Boden abgeklopft und mit frischem Medium resuspendiert und geteilt. Das Gesamtvolumen sollte circa 20 ml betragen. Die Zellen wurden in Plastik-Zellkulturflaschen mit Filterdeckel im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C und feuchter 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

### Kryokonservierung von PK15- und SPEV-Zellen:

Die Zellen wurden mit STV abgelöst und bei 1100 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Medium mit einem Zusatz von 10%

FKS und 7,5% DMSO vorsichtig resuspendiert, eine große Zellkulturflasche wurde auf 6 Kryoröhrchen verteilt. Sie wurden in einer  $-60^{\circ}\text{C}$ -Gefriertruhe für eine Stunde gekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung gegeben.

#### Auftauen von PK15- und SPEV-Zellen:

Die Zellen wurden in handwarmem Wasser aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Falcon-Röhrchen gegeben und mit 6-8 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden bei 1100 rpm  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 7 ml Medium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche mit Filterdeckel gegeben. Die Inkubation erfolgte bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem  $\text{CO}_2$ -Brutschrank.

### **3.7 Virusisolierung**

#### **3.7.1 Virusanzucht**

Aus Gewebeproben, die in der PCR PPV positiv getestet wurden, wurden Feldisolate auf Zellkultur angezüchtet. Dazu wurde 1 g Gewebe mit sterilem Seesand im Mörser zerrieben und in 5ml Minimal Essential Medium with Hank's Salts resuspendiert. Die Suspensionen wurden 10 Minuten bei 2000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, um die groben Bestandteile entfernen zu können. Anschließend wurde der Überstand in einem sterilen Falcon<sup>®</sup> Röhrchen mit gleicher Menge Chloroform versetzt, gut gemischt und ebenfalls 10 Minuten bei 2000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Durch das Chloroform wurden Bakterien abgetötet, Parvoviren sind dagegen chloroformstabil. Die obere, wässrige, virushaltige Phase dieses 2-Phasen-Gemisches wurde abgenommen. Mit 500  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurde eine kleine Plastikzellkulturflasche beimpft, die etwa 500.000 frisch eingesäte, jedoch bereits am Gefäßboden anhaftende STE-, PK15- oder SPEV-Zellen enthielt. Die Zellen wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Nach 2 Stunden (sogenannte Nullprobe) und 2 Tagen Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  und bei 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre (bei PK15- und SPEV-Zellen) wurden 300-400  $\mu\text{l}$  Zellkulturüberstand abgenommen und mit Hilfe der Diagnostik-PCR auf PPV untersucht. Bei positivem Ergebnis, bei STE-Zellen meist einhergehend mit einem cytopathischen Effekt, wurden die Zellen zur Virussetzung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefroren und wieder aufgetaut.

Es wurde für die Virusanzucht das gleiche Medium verwendet wie für die Haltung der entsprechenden Zellen, nur mit reduziertem FKS-Gehalt (2,5%) und einem Zusatz von Antibiotikum (Penicillin und Streptomycin, je 100.000 IE/l).

### **3.7.2 Verwendete Virusisolate**

In den vorliegenden Untersuchungen sind folgende porcine Parvoviren verwendet worden:

- NADL-2 (PARPVTRA), isoliert 1975 in den USA (Mengeling & Cutlip, 1975)
- IDT, Isolat des Impfstoffes Porciparvac, isoliert 1964 in München (Mayr & Mahnel, 1964)
- Challenge-Virus, 1986 in England isoliert. Batch Nr. (PPV-strain) 1243, Central veterinary Laboratory, UK

### **3.7.3 Virustitration und Bestimmung der KID<sub>50</sub>**

Um den Titer einer Virussuspension zu bestimmen wurden STE-, SPEV- und PK15-Zellen mit einer konstanten Dosis logarithmisch abgestufter Virusverdünnungen (-log<sub>10</sub>) beimpft. Der Virustiter wird als KID<sub>50</sub> (Kultur-infektiöse Dosis, bei 50% der Zellkulturen infiziert werden) angegeben.

Nach dem Beschicken von 96-Loch-Platten mit 100 µl Zellsuspension (100.000 Zellen/ml), wurden die Platten für 2h bis zum Anheften bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert.

Die Virussuspension wurde logarithmisch verdünnt und 100 µl dieser Verdünnung wurden auf die Zellen gegeben. Auf die 12. Reihe der 96-Loch-Platte wurde auf Reihe A-D als Positivkontrolle unverdünntes IDT-Virus gegeben und auf Reihe E-H als Zellkontrolle nur Medium gegeben. Die Reihe A-D und E-H wurden jeweils für je eine Virussuspension verwendet. Die 96-Loch-Platten wurden bei 37°C und 5%iger, feuchter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und täglich auf das Auftreten eines cpE kontrolliert. Nach 3-4 Tagen erfolgte die Fixation der Platten und die Auswertung im IFT.

#### Immunfluoreszenztest:

Nach genannter Inkubationszeit wurde das Medium abpipettiert und die Zellen vorsichtig mit PBS zweimalig gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Azeton/Methanol (50:50 v/v) fixiert und 10 Minuten inkubiert. Danach wurde die Fixationslösung dekantiert, die Platte

auf Zellstoff ausgeklopft und die Reste der Fixationslösung unter dem Abzug abgedampft. In dieser Form ließen sich die Platten über Wochen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern.

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit  $100\ \mu\text{l}$  PBS-T für 10 Minuten rehydriert. Um unspezifische Epitope zu blocken wurde auf die Zellen eine PBS-T-Lösung mit 10%FKS gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS-T für jeweils 15 Minuten gewaschen. Danach wurden die Platten mit  $50\ \mu\text{l}$  FITC-konjugiertem PPV-Antiserum (BFAV, Riems) pro Kavität überschichtet und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Das Konjugat wurde dafür 1:10 mit PBS verdünnt. Nach Ablauf dieser Zeit musste das Konjugat vorsichtig abgenommen und die Wells 3x mit PBS-T für 15 Minuten gewaschen werden. Nun konnte die Platten unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt und digital abphotographiert werden.

### Auswertung der Zellkulturtitration:

Der Test war auswertbar, wenn in den positiven Kontrollen eine für das Parvovirus charakteristische Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, während die negativen Kontrollen keine fluoreszierenden Zellen aufwiesen. Die Titerangaben erfolgten als  $\text{KID}_{50}$  pro  $100\ \mu\text{l}$ , die nach dem Verfahren von SPEARMAN u. KAERBER berechnet werden können (Mayr *et al.*, 1974).

$$\log_{10}\text{KID}_{50}\text{-Endpunkt-Verdünnung} = - (x_0 - \frac{d}{2} + \frac{d \sum r}{n})$$

$x_0$  =  $\log_{10}$  des reziproken Wertes der niedrigsten Verdünnung, bei der alle Reagenten positiv sind (z.B. für  $10^{-6} \rightarrow 6$ )

$d$  =  $\log_{10}$  des Verdünnungsfaktors (1,0 bei 1:10 Verdünnung)

$n$  = Zahl der Reagenten, die für jede Verdünnung eingesetzt wurden

$r$  = Anzahl der positiven Reagenten ab Verdünnungsstufe  $x_0$

### Nachweisgrenze von PPV aus Zellkultur mit der PCR:

Um die Sensitivität einer Virustitration mit anschließenden Nachweis des Virus mit Immunfluoreszenz zu bestimmen, wurde gleichzeitig  $100\ \mu\text{l}$  Zellkulturüberstand aufgereinigt, logarithmisch verdünnt und mit der diagnostischen PCR getestet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Probenvorbereitung

In der von April 2001 bis März 2003 durchgeführten Studie wurden aus insgesamt 500 Feten und Totgeburten von Schweinen aus Süddeutschland, Lungengewebe, Lebergewebe und Lymphknoten entnommen und mittels PCR auf porcines Parvovirus getestet. Darüber hinaus wurden erstmalig Rektumtupfer hinsichtlich ihrer Eignung als Ausgangsmaterial für die molekularbiologische Detektion dieses Virus mittels PCR untersucht.

Die hier vorgestellte Studie begann April 2001 und endete im März 2003.

Die Tabelle stellt eine Zusammenfassung ein der in Abschnitt 4.1.1. bis 4.1.3. beschriebenen Ergebnisse dar.

Untersuchungszeitraum	Nachweismethode	Einsender	Selektion	Probenanzahl	Positive Proben
April - September '01	TaqMan <sup>®</sup> -PCR	II. MTK München	nur PPV-Verdachtsfälle	116	43 (37,1%)
Oktober '01 – Februar '02	LightCycler <sup>®</sup> -PCR	II. MTK München SGD Bayern prakt. Tierärzte	Keine: Aborte, Totgeburten, lebensschwache Ferkel	-----	-----
Oktober '01 – März '03	klassische PCR	II. MTK München SGD Bayern prakt. Tierärzte	Keine: Aborte, Totgeburten, lebensschwache Ferkel	403	39 (9,7%)

Tabelle 7: Übersicht der verschiedenen Untersuchungszeiträume, Nachweismethoden, Probeneinsender, Selektion, Probenanzahl und PPV-positiv getestete Proben.

#### 4.1.1 Nachweis von PPV mit der TaqMan<sup>®</sup>-PCR

Im Zeitraum von April bis September 2001 wurden die Proben fast ausschließlich von der II. Medizinischen Tierklinik, München, dem Institut für medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Sueschenmedizin, München, freundlicherweise zur weiteren Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Zur Einsendung kamen vorwiegend Feten mit Verdacht auf PPV.

Der Nachweis für das PPV wurde mit einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) geführt (Systems Applied Biosystems, TaqMan<sup>®</sup> GeneAmp<sup>®</sup> 5700). Dabei wird die Quantität des entstehenden Amplifikats mit Hilfe von Fluoreszenz gemessen (vgl. Abschnitt 3.1.2). Die Zielsequenz der hier verwendeten Primer liegt auf dem Nichtstrukturprotein NS-1. Als positiv wurden bei der qPCR diejenigen aufgereinigten Nukleinsäureisolate der eingegangenen Proben gewertet, die einen  $C_T$  von  $\geq 34$ <sup>1</sup> hatten (Abbildung 11).

In diesem Zeitraum wurden 116 Proben zur PPV-Diagnostik eingeschickt. Durch den häufig mumifizierten und verwesenen Zustand des Materials ist es nicht immer möglich gewesen alle Organe zu identifizieren. Zusammengefasst wurden insgesamt 100 Lungen, 90 Lebern, 64 Lymphknoten, 6 Därme als Gewebematerial entnommen und nachfolgend die Gesamtnukleinsäure präpariert. Die analysierten Proben stammten von 54 Würfen und Sauen. Insgesamt wurden 27 unterschiedliche Betriebe erfasst. Die durchschnittlich untersuchte Probengröße pro Wurf war nur sehr klein (2,3 Feten bzw. Totgeburten).

In den aufgeführten 116 Proben gelang in insgesamt 43 Fällen der Nachweis von porzinem Parvovirus (Tabelle 8). Die quantitative Analyse wurde mit Hilfe der Amplifikationskurve geführt und die Spezifität der Reaktion über die Dissoziationskurve des Amplifikats bestätigt. Der Schmelzpunkt der Dissoziationskurve lag bei ca. 76°C. Unspezifische Amplifikate und Primer-Dimere hingegen zeigten deutlich niedrigere Kurven und hatten außerhalb dieses Spezifikationskriteriums ihre Maxima (ca. 73°C) (Abbildung 11).

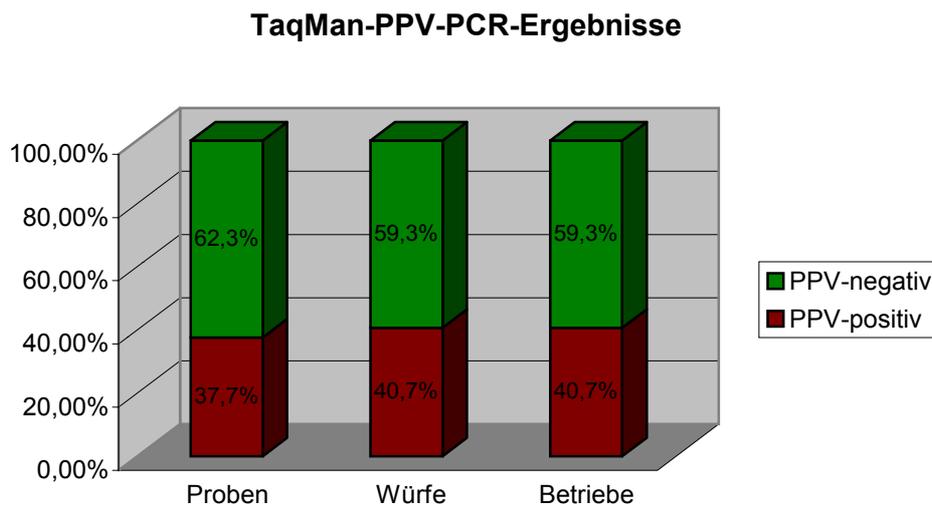
Prozentual waren demnach 37,1% der untersuchten Proben als positiv zu bewerten. Analysiert man hingegen den Anteil der betroffenen Würfe, waren 22 (40,7%) der 54 Würfe und Sauen betroffen. Gleiches gilt für die Betriebe, in 11 (40,7%) der getesteten Betriebe wurde porzines Parvovirus nachgewiesen (Tabelle 8).

---

<sup>1</sup> threshold cycle: hierbei überschreitet die jeweilige zu messende Amplifikationsreaktion einen bestimmten Basiswert, der individuell über die entsprechende Softwareauswertung festgelegt wird. Da in dieser Phase der Amplifikation keine der beteiligten Reaktionskomponenten bereits limitiert ist, gilt der Threshold als allgemeines Signal für eine positive Amplifikationsreaktion. Der  $C_T$ -Wert von 34 stellt jedoch nur einen ungefähren durchschnittlichen Wert dar. Er wurde über eine Negativkontrolle in jedem Lauf verifiziert.

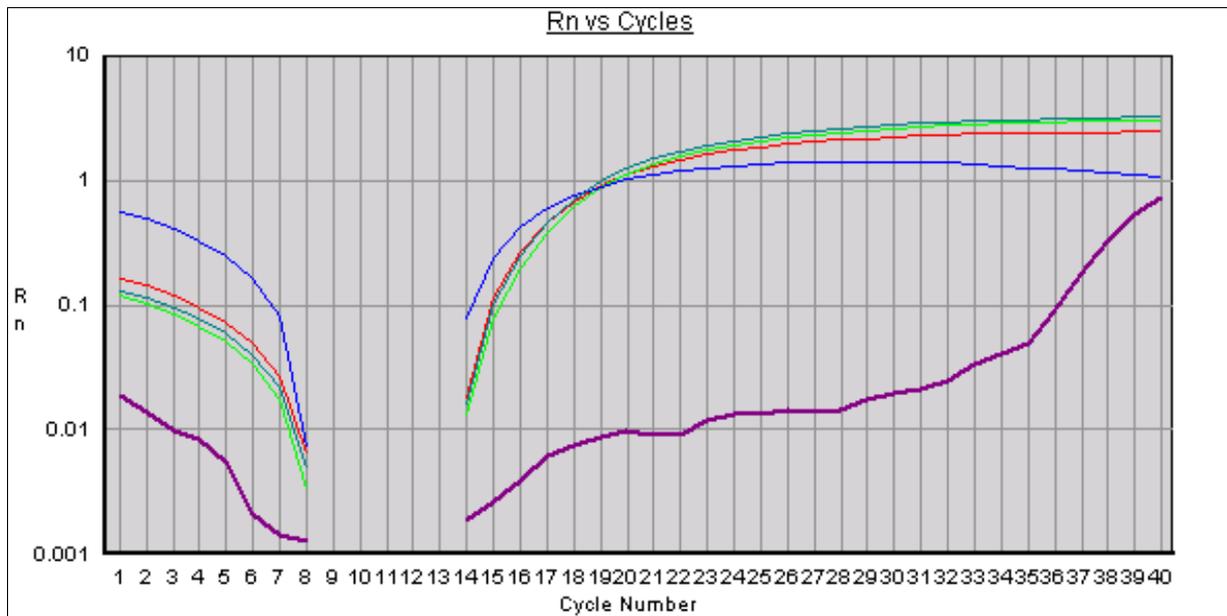
Interessanterweise erwies sich in dieser Studie ferner nicht jeder analysierte Wurf mit mehreren abortierten Feten oder Ferkeln als einheitlich positiv. Bei 13 Einsendungen stand mehr als ein Fetus/Ferkel des Wurfes zur Untersuchung auf PPV zur Verfügung (7 davon wurden als "negativ" beurteilt). Bei insgesamt 8 gelang der Virusnachweis, wobei in zwei Fällen für alle Feten ein positiver Nachweis geführt wurde und sich bei den verbleibenden 6 Würfen nur in einem Teil der Feten porcines Parvovirus-Genom nachweisen ließ.

Desweiteren wurde ein *in vivo* Nachweis des porcinen Parvovirus an Rektumtupfer von 6 Sauen durchgeführt. Vergleichend wurde von drei dieser Sauen Blut abgenommen, die Lymphozyten präpariert und die Gesamtnukleinsäure aufgereinigt. Hierbei gelang ein Virusnachweis bzw. Virus-spezifischer Nukleinsäurenachweis mittels qPCR aus allen Tupfern. Dagegen ließen sich aus den präparierten Lymphozyten nur in einer der drei Sauen PPV-spezifische Amplifikate nachweisen.



**Tabelle 8:** Prozentualer Anteil von PPV-positiven und negativen Ergebnissen an allen untersuchten Proben, Würfen und Betrieben im Zeitraum April bis September 2001 (TaqMan<sup>®</sup>-PCR)

A:



B:

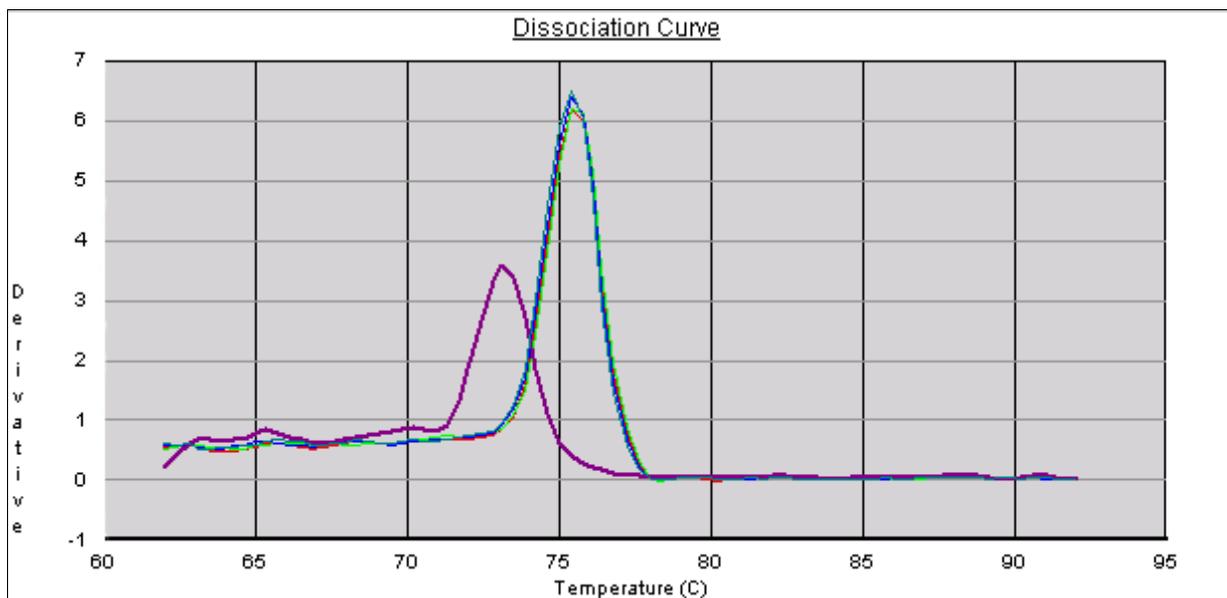


Abbildung 11: quantitative PCR: A: Amplifikationskurve: 4 positive Feldisolaten (Feldisolate 27a (vgl. Abschnitt 4.2) und drei Wurfgeschwister, Verdünnung: 1:100) mit deutlichen Anstieg bei Zyklus 14, lila: Die Negativkontrolle mit einem späten Anstieg der Fluoreszenz. Ein früher Anstieg von Fluoreszenz bedeutet hohe Ausgangskopienzahl. Im Bereich Zyklus 1-9 ist die Eigenfluoreszenz zu erkennen, die sogenannte "baseline", sie hat keinen Einfluss auf das Ergebnis. Die Fluoreszenz wird logarithmisch dargestellt.

B: Dissoziationskurve: Die positiven Proben haben eine einheitliches Maxima bei ca. 76°C, das Maxima der Negativkontrolle liegt bei ca. 73°C. Die Fluoreszenz ist abgeleitet dargestellt.

#### **4.1.2 Nachweis des porcinen Parvovirus mit dem LightCycler® (Etablierungsversuch)**

Ab Oktober 2001 bis zum Ende dieser Studie März 2001 wurden die Proben zur Diagnose auf PPV von der II. Medizinischen Tierklinik, von Mitarbeitern des Schweinegesundheitsdienstes Bayern und von praktizierenden Tierärzten eingeschickt. Als Verdachtsdiagnose des einsendenden Tierarztes wurden in den meisten Fällen noch andere infektiöse Ursachen für Fruchtbarkeitsstörungen, wie PCV-2 (Porzines Circovirus Typ 2, Post-Weaning-Multisystemic-Wasting-Syndrome) und PRRSV (Porzine Respiratory and Reproductive Syndrome-Virus), genannt.

Um einen PPV-Nachweis zu führen stand ab Oktober 2001 der LightCycler® zur Verfügung. Dabei handelt es sich ebenfalls wie beim TaqMan® um einen Thermocycler, der nach dem analogen Prinzip die entstehenden Amplifikate durch die emittierte Fluoreszenz misst. Es zeigte sich, dass ein unmittelbarer Transfer der schon etablierten quantitativen PCR auf den LightCycler®, trotz Variation der unterschiedlichen Komponenten des Reaktionsansatzes, nicht möglich war. Die entstehenden Primer-Dimere ließen sich in der Dissoziationskurve nicht von einem spezifischen Amplifikat unterscheiden.

Es wurden daher neue Primer anhand der publizierten Nukleotidsequenzen der Isolate NADL-2 und der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten PPV-Isolate 27a und IDT (vgl. 4.3.1. und 4.3.3.) auf dem Strukturprotein VP1 ausgewählt und synthetisiert. Mit diesen drei Isolaten konnte erfolgreich der Nachweis geführt werden. Auch hier erfolgte die Analyse über die Amplifikations- und Dissoziationskurve. Unspezifische Amplifikate, insbesondere Primer-Dimere konnten bei diesen drei Isolaten klar von deren Schmelzkurve, die bei 80°C lag, abgegrenzt werden.

Jedoch erwiesen sich die zuvor im TaqMan® als positiv getesteten Proben als negativ bzw. nicht auswertbar, da die Maxima der Dissoziationskurve in der Höhe (Amplitude) und Lage (Temperatur) uneinheitlich waren.

Wie im nächsten Abschnitt (vgl. Abschnitt 4.4.1.) dargestellt, konnte nach Sequenzierung des entsprechenden Genomabschnitts von Feldisolaten gezeigt werden, dass bei dem verwendeten Primerpaar Punktmutationen auf der Zielsequenz im Strukturprotein VP1 vorhanden sind. Es zeigte sich, dass sich kein geeignetes Primerpaar finden ließ, das ein Amplifikat im Bereich

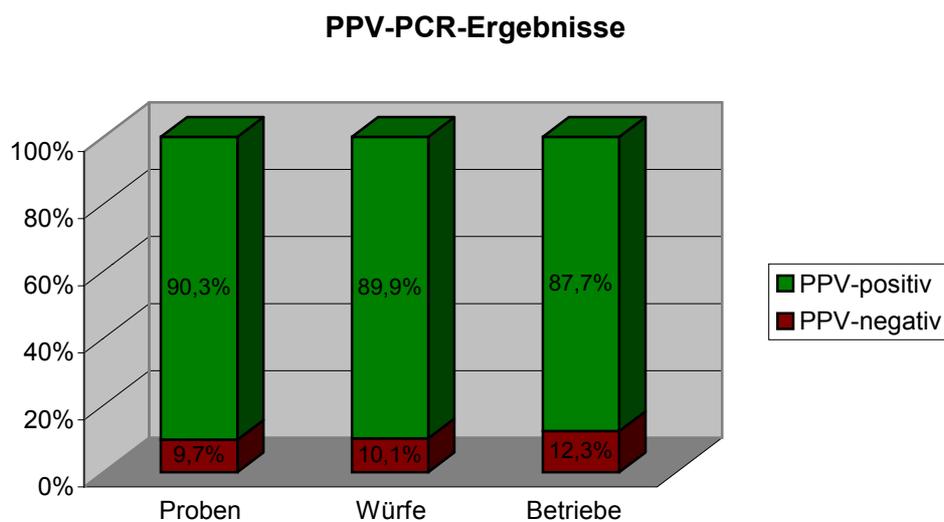
des Strukturproteingens erzeugte und keine Mutationen in diesem Bereich aufwies. Es wurde versucht mit einer Kombination aus verschiedenen Primerpaaren, zu arbeiten, jedoch war die Dissoziationskurve durch die entstehenden Primer-Dimere schon im Testlauf nicht auswertbar, so dass der Versuch, die porcine Parvovirus-Diagnostik auf dem LightCycler® zu etablieren, aufgegeben wurde.

### 4.1.3 Qualitative PCR

Nachdem der Versuch die PPV-Diagnostik auf dem LightCycler zu etablieren nicht erfolgreich war, wurde von Oktober 2001 bis März 2003 die Diagnostik auf PPV mit einer klassischen PCR durchgeführt. Die Zielsequenz des verwendeten Primerpaares liegt auf dem Strukturprotein VP1.

Insgesamt wurden 403 Proben eingeschickt und auch hier wurden Organe zur PPV-Diagnostik entnommen (381 Lungen, 90 Lebern, 21 Lymphknoten) und anschließend wurde die Gesamtnukleinsäure aufgereinigt. Die untersuchten Proben stammten von 218 Würfen und Sauen und kamen aus 155 unterschiedlichen Betrieben. Auch hier war die durchschnittliche Anzahl an Proben pro Wurf klein, nur 1,9 Feten/Ferkel.

Von den 403 Proben konnte nur bei 39 Proben PPV festgestellt werden (9,7%). Insgesamt waren 22 (10,1%) der 218 Würfe und Sauen positiv im Virusnachweis. Abortmaterial von 19 (12,3%) der 155 untersuchten Betriebe war PPV-positiv. Bei zwei der positiven Betriebe wurde schon im Zeitraum April bis September 2001 in Abortmaterial PPV detektiert (**Tabelle 9**).



**Tabelle 9:** Prozentualer Anteil von PPV-positiven und -negativen Ergebnissen an allen untersuchten Proben, Würfen und Betrieben im Zeitraum September 2001 bis März 2003, durchgeführt mit der klassischen PCR.

Ebenso wie bei der PPV-Diagnostik mit Hilfe des TaqMan<sup>®</sup> zeigte es sich auch bei diesen Untersuchungen mehrfach, dass nur ein Teil des Wurfs, bei dem mehr als ein Fetus/Ferkel untersucht wurde, sich in der PCR als positiv erwies. Von 8 Würfen, bei denen mehr als ein Fetus/Ferkel zur PCR-Analyse zur Verfügung standen, konnte bei 2 kein Virus nachgewiesen werden, bei 6 wurde PPV detektiert. Bei 3 von diesen gelang jedoch nur in einem Teil der Ferkel ein Virusnachweis.

Auch mit der klassischen PCR ließ sich aus Rektumtupfern porcines Parvovirus nachweisen. Es wurden insgesamt 13 Tupferproben untersucht und 6 erwiesen sich als PPV-positiv.

#### **4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen auf porcines Parvovirus**

Im Zeitraum von April bis September 2001 wurden vorwiegend Proben mit Verdacht auf porcines Parvovirus, wie mumifizierte Feten, Ferkel aus Betrieben mit gehäuft kleinen Würfen und Aborte aus Betrieben, die nicht oder unregelmäßig gegen PPV impfen, untersucht. In 37,1% der analysierten Proben konnte porcines Parvovirus nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil erhöht sich noch, betrachtet man die betroffenen Würfe und Sauen (40,7%) und die betroffenen Betriebe (40,7%) (Tabelle 8).

Von Oktober 2001 bis März 2003 wurde nicht auf PPV-Verdacht vorselektiert. Eingeschickt wurden allgemein abortierte Feten, totgeborene und lebensschwache Ferkel. Dies sind Verdachtsfälle, die seltener mit PPV in Verbindung gebracht werden. Eine porcine Parvovirus-Infektion konnte in 9,7% der untersuchten Proben festgestellt werden. Auch hier erhöht sich der prozentuale Anteil, wenn man die Ergebnisse auf die Würfe und Sauen (10,1%) oder die erfassten Betriebe (12,3%) bezieht (Tabelle 9).

Insgesamt wurden von 519 untersuchten Proben 82 (15,8%) positiv auf porcines Parvovirus getestet. Die Proben stammten von 44 (16,2%) der 272 untersuchten Würfe bzw. Sauen. Betroffen waren 28 (16,3%) von 172 Betrieben.

Für die verbleibenden 84,2% gelang der PPV-Nachweis nicht. Es müssen daher für diese Abortfälle andere infektiöse (z.B. PCV-2, PRRSV) oder nicht-infektiöse (z.B. Mykotoxine) Ursachen angenommen werden.

## 4.2 Anzucht von Feldisolaten des porzinen Parvovirus

Das derzeitige Wissen über PPV beruht meist auf Untersuchungen des 1975 isolierten Stammes NADL-2. Bisher sind aus Deutschland keine Daten über PPV bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, neuere Isolate aus Deutschland auf Zellkultur anzuzüchten, um gegebenenfalls weiterführende Untersuchungen durchführen zu können.

Um Virus zu isolieren wurden zunächst drei verschiedene Zellkulturen verwendet: Zellen von Schweinehoden (STE-Zellen, Abbildung B) und Zellen von fetalen Schweinenieren (PK15- und SPEV-Zellen). Auf allen drei Zelllinien ließen sich der Impfstamm von IDT und das Feldisolat 27a gut anzüchten.

Um mögliche Unterschiede in der Eignung der Zelllinien zur Feldvirusisolierung auszugleichen, wurde entschieden, eine Nierenzelllinie und die STE-Zelllinie für die Virusisolierung zu halten. STE-Zellen gelten als sehr empfänglich für porzines Parvovirus. Bei den Zelllinien der Niere wurden die SPEV-Zellen weiterverwendet. Mit PK15-Zellen wurde nicht weitergearbeitet, da nach Aussage von Dr. Roland Riebe (BFAV, Riems), die Empfänglichkeit dieser Zellen für porzines Parvovirus abhängig vom Stamm ist, jedoch sind keine Details über diese Stämme zu erhalten.

Mit 22 der in der qualitativen und quantitativen PCR positiv getesteten Gewebeproben aus unterschiedlichen Betrieben wurde eine Virusanzucht versucht. Die Nullprobe (2 Stunden p.i.) und der Zellkulturüberstand nach 3 Tagen Infektionsversuch wurden mittels qualitativen PCR (vgl. Abschnitt 3.2) auf PPV getestet. Wurde Virus-DNA nachgewiesen, wurde anschließend der Virustiter des Zellkulturüberstandes bestimmt. Gleichzeitig wurde mit einer Verdünnungsreihe des aufgereinigten Zellkulturüberstands die Nachweisgrenze mit einer diagnostischen PCR bestimmt (Tabelle 10).

Nachdem sich zunächst kein Feldisolat des porzinen Parvovirus auf Zellkultur anzüchten ließ, wurde getestet, ob eine mehrfache Passagierung einer Zellkultur, die mit einer PPV-PCR-positiven Gewebeverreibung beschickt wurde, einen PCR-Nachweis von PPV in höheren Passagen ermöglichen würde. Es wurden 10 verschiedene Gewebeverreibungen bis zu fünfmal auf Zellkultur passagiert. Dabei wurden die Zellen nach Standardmethode geteilt (Abschnitt 3.6), aber 1/3 des Ursprungsmediums für die Weiterpassagierung wiederverwendet. Auch mit dieser modifizierten Methode gelang es nicht zusätzliche Isolate

zu gewinnen. Die Zellkultur war entweder gleich nach der Erstinfizierung mit Hilfe der PPV-PCR nachweisbar infiziert oder sie blieb auch nach fünf Blindpassagen PPV-negativ.

In allen Fällen der versuchten Virusisolierung konnte in der PCR der Nullprobe kein porcines Parvovirus nachgewiesen werden. Nur bei 5 von 25 mit PPV-PCR-positiven Gewebeproben inokulierten Zellkulturen konnte nach 3 Tagen Infektion wiederum mittels der PPV-spezifischen PCR virale DNA detektiert werden. Mit acht Gewebeverreibungen wurde mehrfach erfolglos versucht Zellkulturen zu infizieren.

Im folgendem werden die Ergebnisse der Isolate, die anzüchtbar waren, dargestellt. Die erhaltenen Isolate 21a, 27a, 106b, 143a und 225b stammen aus verschiedenen Betrieben in Süddeutschland. Da der Virusnachweis mittels Titration der angezüchteten Isolate mit anschließende Immunfluoreszenz und die PCR-Ergebnisse sehr unterschiedlich waren, werden sie hier im einzelnen aufgeführt.

Probe 21a:

Bei der Probe handelt es sich um eine Lebergewebeverreibung. Sowohl die STE- als auch die SPEV-Zelllinien zeigten keinen cytopathischen Effekt und replizierten sich auf den Zellkulturen mit einem Virustiter von  $10^{0,1}$ KID<sub>50</sub>. In der diagnostischen PCR waren die infizierten Zellkulturen nur in der unverdünnten Probe positiv (Tabelle 10).

Probe 27a:

Bei der Organprobe handelt es sich um ein Lebergewebe, dass schon bei der TaqMan<sup>®</sup>-PCR aus dem Gewebe bis in die Verdünnungsstufe  $10^{-9}$  positiv getestet wurde. Die infizierte STE-Zelllinie zeigte schon nach 2 Tagen einen cytopathischen Effekt (100% Lysis), die SPEV-Zellen nach 5 Tagen (40% Lysis) (Tabelle 10).

Probe 106b:

Mit diesem porcinem Parvovirus aus einer Lungengewebverreibung gelang eine Anzucht auf den STE-Zellen, nicht aber auf den SPEV-Zellen. Interessanterweise konnte in der Anzucht und in 2 weiteren Passagen virales Genom im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden ohne dass ein sichtbarer cytopathischer Effekt vorhanden war (Tabelle 10, Abbildung 12).

Probe 143a:

## Ergebnisse

---

Bei der Erstisolierung von PPV aus der Leberprobe 143a zeigten die STE-Zellen einen cytopathischen Effekt (30-40% Lysis) am 3. Tag (Tabelle 10).

Probe 225b:

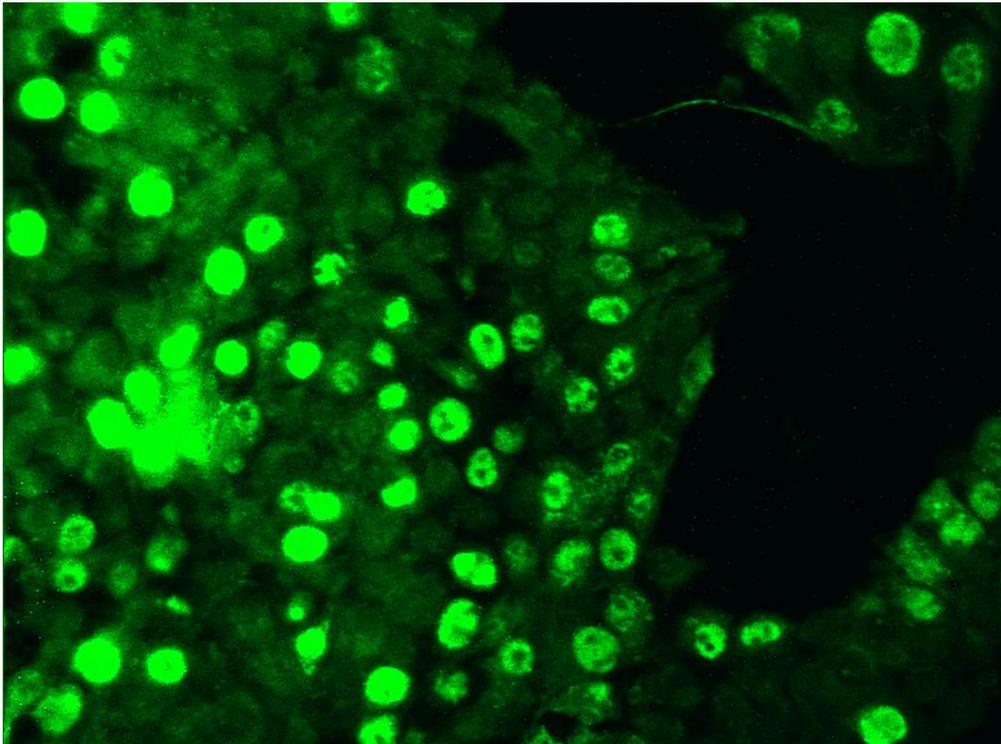
Diese Probe wurde aus Lungengewebe isoliert. Auf den Zellkulturen wurde auch am 3. Tag kein cytopathischer Effekt beobachtet (Tabelle 10).

Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der oben detailliert beschriebenen Anzuchtversuche der Isolate 21a, 27a, 106b, 143 und 225b.

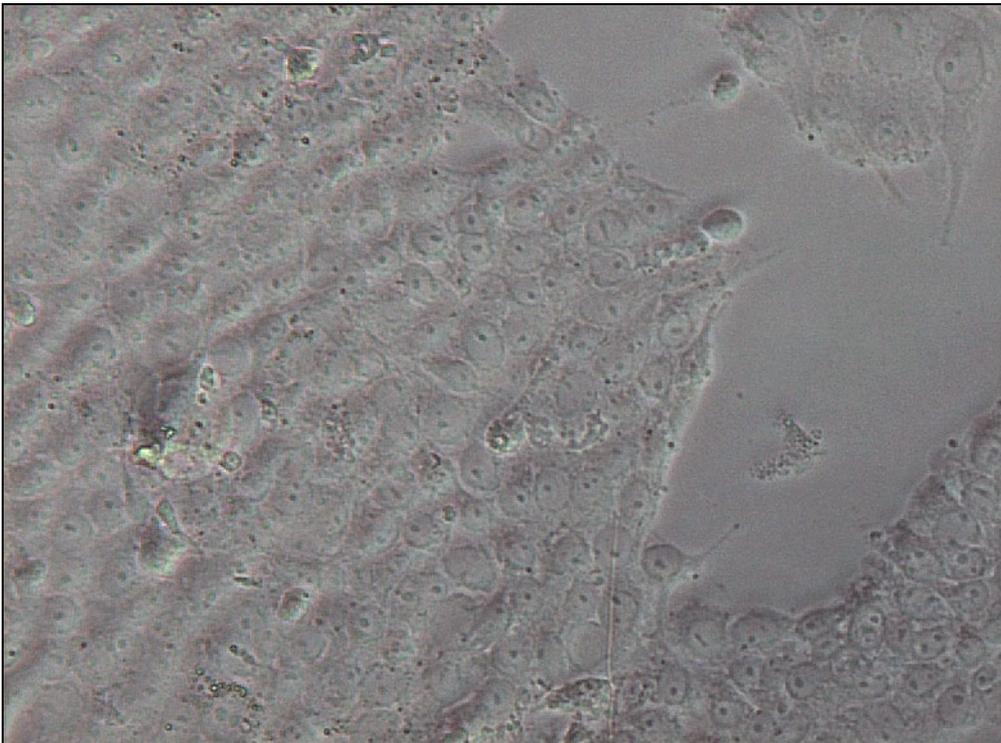
Isolat	KID <sub>50</sub> /100µl auf STE-Zellen	KID <sub>50</sub> /100µl auf SPEV-Zellen	PPV-positiv in der PCR bis Verdünnungsstufe:
21a	10 <sup>0,1</sup>	kein Wachstum	unverdünnt
27a	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4,25</sup>	10 <sup>-8</sup>
106b	10 <sup>3,875</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>-4</sup>
143a	10 <sup>6,125</sup>	10 <sup>5,125</sup>	10 <sup>-7</sup>
225b	10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	unverdünnt

Tabelle 10: Zusammenfassung der Virustiter der angezüchteten Feldisolate, angegeben als Kultur-infektiöse Dosis auf STE- und PK15-Zelllinien, gemessen mit Immunfluoreszenz-Technik und Ergebnis der klassischen PCR mit einer Verdünnungsreihe des isolierten DNA.

**A:**



**B:**



**Abbildung 12:** Mit Feldisolat 106b infizierte STE-Zellen, Verdünnungsstufe des Virus  $10^{-2}$ , 200x Vergrößerung **A:** Darstellung von porziner Parvovirus-DNA im Nucleus durch Immunfluoreszenzfärbung, **B:** Lichtmikroskopische Aufnahme Zellen, kein cytopathischer Effekt erkennbar

## 4.3 Sequenzierung

### 4.3.1 Impfstamm

Das Masterseed-Virus (MSV) des Impfstoffs Porciparvac wurde von dem Impfstoffwerken Dessau-Tornau (IDT) zum Sequenzieren zur Verfügung gestellt. Dieses Isolat wurde 1964 von MAYR & MAHNEL (1964) in München als Verunreinigung von Schweinezellkulturen detektiert, und vier Jahre später als Parvovirus erkannt (Mayr *et al.*, 1968).

Die zur Sequenzierung ausgewählten 11 Primerpaare (Abschnitt 3.3.1, Abbildung 13, Tabelle 1) sind so gewählt worden, dass sie gemeinsam fast das komplette Genom von PPV abdecken. Die Amplifikate wurden in den Vektor pCR 2.1<sup>®</sup> kloniert und die "inserts" der Plasmide (pD2–pD7, pD213, pD534, pD1411, pD2593 und pD4021) sequenziert. Die Ergebnisse wurden überprüft und die überlappenden Amplifikate wurden zusammengefügt. Alle zweideutigen Nukleotide wurden durch Sequenzierung des komplementären DNA-Strangs bestätigt. Der Bereich der "hairpins" am 5'- und 3'-Ende ließ sich nicht amplifizieren. In diesen Bereichen werden keine Proteine kodiert.

Der erhaltene Sequenzbereich von Impfstamm MSV von IDT reicht von Base 223 bis Base 4760 und beinhaltet die kodierenden Sequenzen der Nichtstrukturproteine und der Strukturproteine (Abbildung 13).

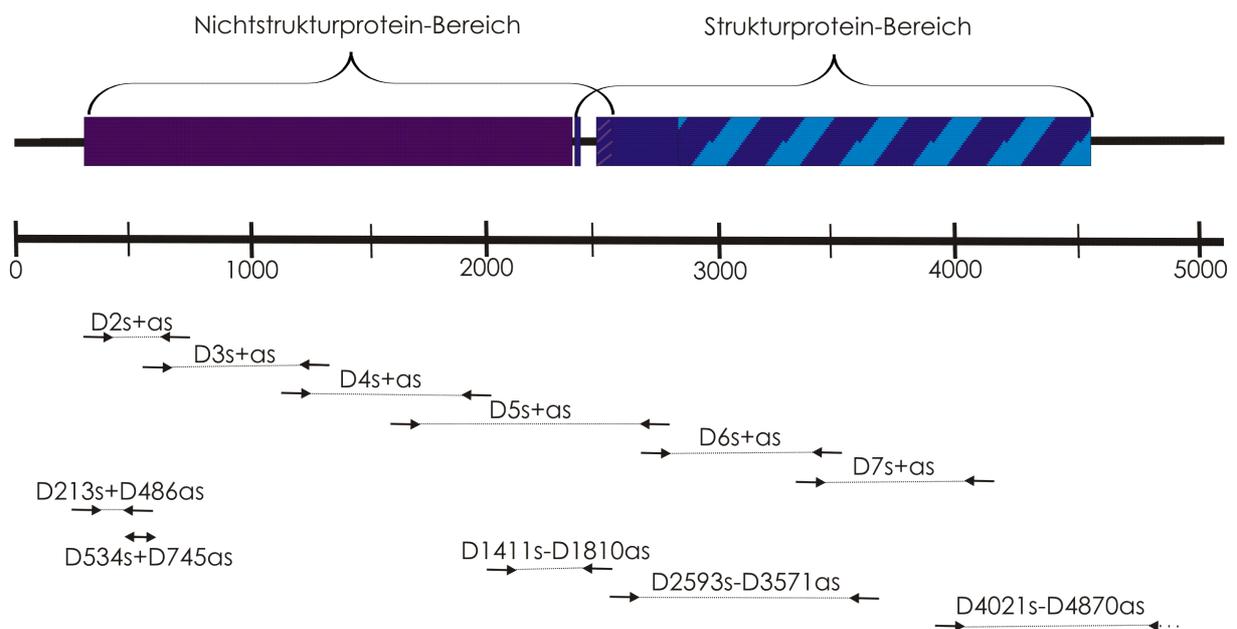


Abbildung 13: Darstellung der Positionen der verwendeten Primern zur Sequenzierung des Struktur- und Nichtstrukturgenoms.

### 4.3.2 Zwei Isolate aus England

Um weitere Informationen über Sequenzdaten von PPV zu erhalten, wurden zusätzlich zwei Feldisolate nahezu komplett sequenziert. Dabei handelte es sich zu einem um ein Challenge-Virus, das 1986 in England isoliert und seitdem in der Europäischen Zellbank (CVL, UK) gelagert wurde. Dieses wurde uns in aufgereinigter Form zugeschickt. Das zweite Isolat konnte aus einem abortierten Fetus aus dem Jahr 2002 aus Mecklenburg-Vorpommern zunächst detektiert, danach aufgereinigt und sequenziert werden und wurde PPV/Tornau/1/02 genannt.

Das jeweilige Virusisolat wurde durch 11 unterschiedlich lange PCR-Amplikons dargestellt (Abbildung 13, Tabelle 1), deren Sequenz an den jeweiligen Enden einen überlappenden Sequenzabschnitt beinhaltet. Das Amplifikat wurde aufgereinigt und mit den sogenannten "Hotshot"-Verfahren mit dem entsprechenden Primer direkt sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden geprüft und die Sequenzabschnitte zusammengefügt. Auch hier ließ sich der Bereich der "hairpins" nicht darstellen.

Der Genomabschnitt der Nichtstruktur- und der Strukturproteine wurde bei beiden Isolaten sequenziert. Der erhaltene Bereich reicht bei dem Challenge-Virus von Base 128 bis Base 4894, bei dem Isolat PPV/Tornau/1/02 von Base 91 bis 4890. Es werden in beiden Fällen alle Struktur- und Nichtstrukturbereiche abgedeckt (Abbildung 13).

### 4.3.3 Kapsidbereich der Feldisolate

Um die Sequenzen des Strukturprotein-Bereichs zu erhalten, wurden mit den als positiv getesteten Proben weitere Polymerasekettenreaktionen mit den ABgene® 1.1x ReddyMix™ PCR Master Mix und einer Kombination verschiedener Primer, die gemeinsam den gesamten Genombereich des Kapsids abdecken, durchgeführt (Abbildung 15, vgl. Abschnitt 3.3.1).

Problematisch bei der Amplifikation war die geringe Anzahl an Virusgenomkopien in den Proben. Nur in wenigen Fällen konnte dabei genügend Amplikons erzeugt werden, um es in der Gelelektrophorese gut darzustellen und um aus dem aufgereinigten PCR-Ansatz mit den "Hotshot"-Verfahren die amplifizierte DNA direkt sequenzieren lassen zu können. Durch die ebenfalls enthaltene genomische DNA im Eluat der aufgereinigten Gewebe ließ sich die Probe nur sehr begrenzt konzentrieren. Ist die absolute Menge an DNA in einem PCR-Ansatz zu hoch, wird die Amplifikation behindert. Viele erhaltene Sequenzen enthielten Doppelsignale und waren nur beschränkt oder nicht auswertbar. Die Sequenzierung wurde erheblich erleichtert, als es gelang, Feldisolate auf Zellkultur anzuzüchten. Der erhaltene Zellkulturüberstand beinhaltet eine größere Anzahl von Virionen und nur wenig genomische

DNA. Aus der so erhaltenen aufgereinigten Virus-DNA konnten mit Hilfe der PCR ausreichend Amplifikate erzeugt werden, die bei der Sequenzierung keine oder sehr wenige Doppelsignale ergaben. Alle Sequenzen wurden überprüft und zusammengefügt.

Insgesamt konnte bei 6 Feldisolaten unterschiedlicher Herkunft der gesamte Kapsidbereich sequenziert werden. Die Proben 15a und 27a wurden direkt aus dem Gewebe sequenziert, Proben 21a, 106b, 225b zu anfangs aus dem Gewebe, nach Anzucht aus den Zellkulturüberständen (Tabelle 11).

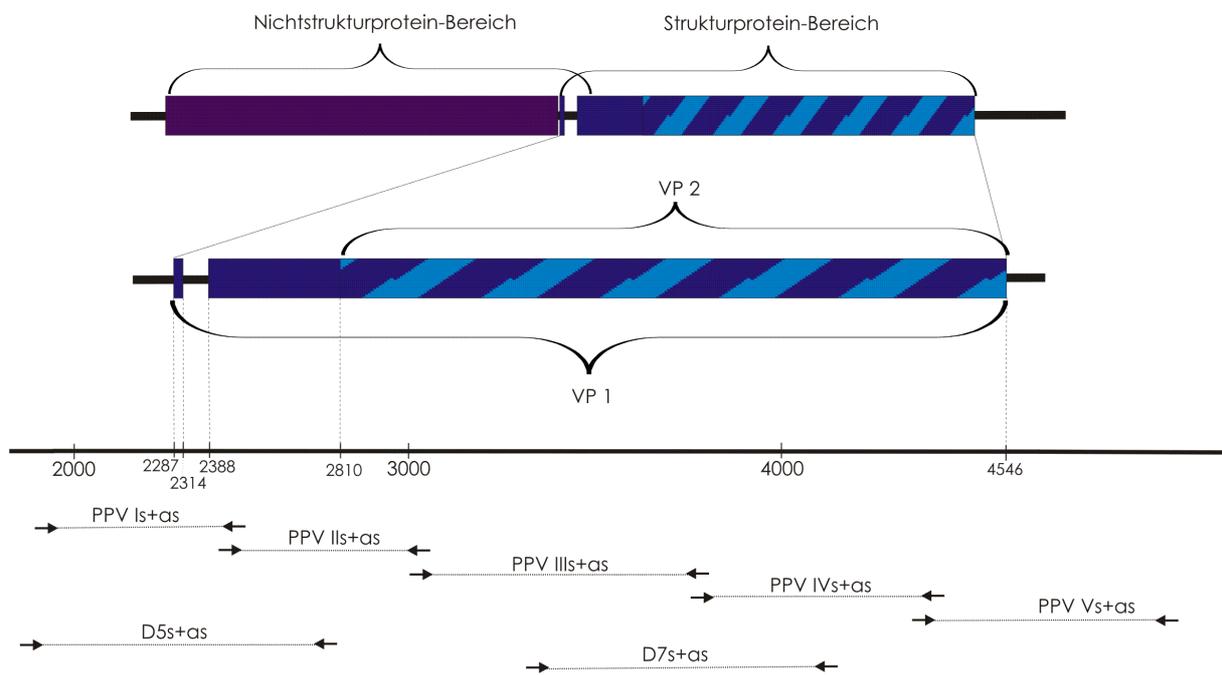


Abbildung 14: Darstellung der Positionen der verwendeten Primern für die Sequenzierung des Strukturgenoms.

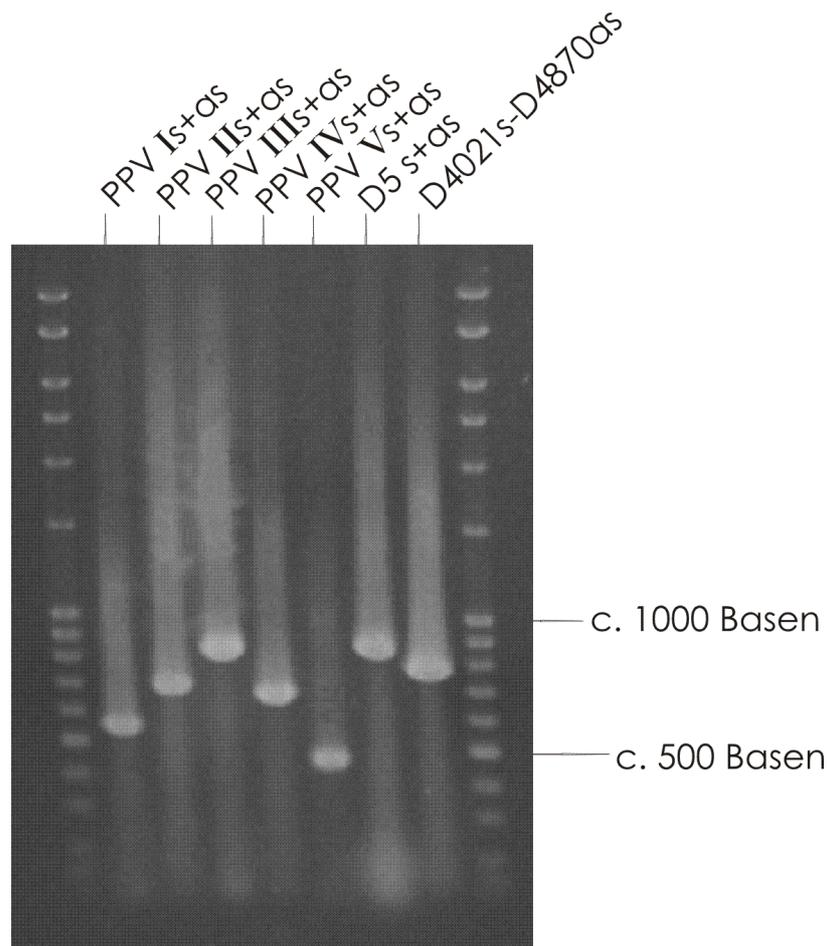


Abbildung 15: PCR des Feldisolats 27a mit den 7 verschiedenen Primerpaaren zum Sequenzieren des Kapsids.

## 4.4 Sequenzanalyse

### 4.4.1 Nukleinsäuresequenzen der Strukturproteine VP1/VP2

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob es mögliche neue antigene Varianten auf Ebene der Nukleinsäuren gibt. Dazu wurde von 7 Feldisolaten aus den letzten 2 Jahren das Kapsidgen komplett sequenziert und mit 3 publizierten Sequenzen von älteren Isolaten auf Nukleinsäureebene verglichen. Zusätzlich wurden in den Vergleich das Virus des Impfstoffs Porciparvac und das Feldisolat aus England von 1986, das für Challenge-Versuche genützt wird, mit einbezogen. Da das Kapsid für die Antigenität verantwortlich

gemacht wird, wurde nur die Varianz des Genombereichs der Strukturproteine VP1/VP2 beurteilt.

Insgesamt wurden 12 Sequenzen zum Vergleich herangezogen: 2 NADL-2-Isolaten, der virulente Stamm Kresse, der Impfstamm des Impfstoffes Porcivarvac, der Challenge-Virus und 7 Feldisolate aus Deutschland (Tabelle 11).

Die Abkürzungen und die publizierten Sequenzen sind der Datenbank European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK entnommen.

EBI-Abkürzung	Autor	Isolat	hier verwendeter Name
PARPVTRA	Bergeron <i>et al.</i> , 1993	NADL-2	Bergeron
PARPVNAD	Vasudevacharya <i>et al.</i> , 1990	NADL-2	Compans
PP44978	Bergeron <i>et al.</i> , 1996	Kresse	Kresse
-----	*	Masterseed-Virus von IDT	IDT
-----	*	Challenge-Virus aus England	Challenge
-----	*	Ferkel aus Mecklenburg-Vorpommern	PPV/Tornau/1/02
-----	*	Feldisolat 15a	15a
-----	*	Feldisolat 21a	21a
-----	*	Feldisolat 27a	27a
-----	*	Feldisolat 106b	106b
-----	*	Feldisolat 143a	143a
-----	*	Feldisolat 225b	225b

Tabelle 11: Verzeichnis aller hier verwendete Abkürzungen der verglichenen Isolate: Abkürzung der Datenbank European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK für die veröffentlichten PPV-Sequenzen; Autor der Publikation, \* im Rahmen dieser Dissertation erarbeitet; Isolat /Stamm; hier verwendeter Name.

Mit dem Programm Genejockey wurde von diesen Isolaten ein Alignment des Genomabschnitts der Strukturproteine VP1/VP2 erstellt. Dabei ist der Genomabschnitt des Strukturproteins VP2 vollständig im Genomabschnitt des VP1 enthalten (Abbildung 14). Insgesamt ist der Bereich bei den publizierten Sequenzen NADL-2 und Kresse 2190 Nukleotide lang.

## Ergebnisse

Beim Vergleich wurde als Bezugssequenz NADL-2 (Bergeron) ausgewählt, die auch als Bezug bei einer Veröffentlichung über die Genomorganisation von Kresse und einem Vergleich mit Feldisolaten aus Kanada verwendet wurde (Bergeron *et al.*, 1996).

Der Vergleich der Nukleinsäuren von VP1/VP2 verschiedener Isolate zeigt (Abbildung 19), dass bei allen Isolaten der Kapsidbereich 2190 Nukleotide groß und homolog (98,6 – 100%) ist. Die bisher veröffentlichten Sequenzen von NADL-2 Bergeron und Compans sind in diesem Bereich 100% gleich. Das Isolat Kresse weist zu NADL-2 nur 0,4% heterologe Nukleotide auf. Das in dieser Studie bestimmte Kapsidgenom der anderen Isolate ist weniger homolog zu NADL-2 und Kresse, zwischen 0,5 und 1,3% der Nukleinsäuren sind verändert. Die Feldisolate weisen jedoch eine ähnliche Varianz untereinander wie zu NADL-2 auf (0,1 bis 1,4%). Eine Ausnahme bildet das Challenge-Virus von 1986, dieses ist mit 99,8% Homologien Kresse sehr ähnlich, und zu NADL-2 nur in 0,4% verändert. Die Varianzen des Impfstamm-Virus von IDT liegen zwischen 1,4% zu NADL-2, 1,1% zu Kresse und zwischen 0,3 und 1,4% zu den Feldisolaten (Tabelle 12).

	Comp.	Berg.	Kres.	Chal.	Torn.	IDT	15a	21a	27a	106b	143a	225b
Comp.		100,0	99,6	99,6	98,8	98,6	99,3	99,5	99,5	98,7	98,9	98,7
Berg.	100,0		99,6	99,6	98,8	98,6	99,3	99,5	99,5	98,7	98,9	98,7
Kres.	99,6	99,6		99,8	99,0	98,9	99,4	99,6	99,6	99,0	99,2	99,0
Chal.	99,6	99,6	99,8		99,0	98,9	99,3	99,5	99,5	98,9	99,1	98,9
Torn.	98,8	98,8	99,0	99,0		99,3	98,8	98,7	98,7	99,5	99,5	99,5
IDT	98,6	98,6	98,9	98,9	99,3		98,6	98,6	98,6	99,7	99,5	99,7
15a	99,3	99,3	99,4	99,3	98,8	98,6		99,7	99,8	98,6	98,9	98,6
21a	99,5	99,5	99,6	99,5	98,7	98,6	99,7		99,9	98,7	98,9	98,7
27a	99,5	99,5	99,6	99,5	98,7	98,6	99,8	99,9		98,7	98,9	98,7
106b	98,7	98,7	99,0	98,9	99,5	99,7	98,6	98,7	98,7		99,6	100,0
143a	98,9	98,9	99,2	99,1	99,5	99,5	98,9	98,9	98,9	99,6		99,6
225b	98,7	98,7	99,0	98,9	99,5	99,7	98,6	98,7	98,7	100,0	99,6	

Tabelle 12: Homologien der 12 Isolate auf Nukleotidebene, Abkürzungen: Comp.=NADL-2 Compans; Berg.=NADL-2 Bergeron; Kres.=Kresse; Chal.=Challenge-Virus; Torn.=PPV/Tornau/1/02; IDT=Impfstamm IDT; Feldisolate 15a, 21a, 27a, 106b, 143a, 225b

Insgesamt wurden 45 Austausche der untersuchten 2190 Nukleinsäuren bei allen Isolaten festgestellt. 11 Punktmutationen kommen je nur in einem Isolat vor. Auf dem Genomabschnitt von Nukleotid 2287 bis 2810, der allein für VP1 kodiert, finden sich nur 5 Mutationen (Tabelle 13). Ob VP1 antigenetisch eine Rolle spielt, ist nicht geklärt.

Sieht man sich die Verteilung der Veränderungen auf dem Genombereich an, dann wird deutlich, dass diese gleichmäßig auf dem gesamten Bereich verteilt sind, circa alle 60 Nukleotide. Eine Ausnahme bildet der Bereich von Nukleotid 3037 bis 3181, in diesem tritt eine Häufung auf. Auf circa 150 Basen sind allein 10 Nukleotide verändert. Konservierte Bereiche gibt es hingegen kaum, nur kleine Bereiche von maximal circa 150 Basen sind hochkonserviert.

Um die Verwandtschaftsbeziehungen der einzelnen Isolate zu bestimmen, wurden die 12 Sequenzen der unterschiedlichen Isolate mit dem "branch-and-bound"-Algorithmus analysiert. Dazu wurde das Programm Paup 3.1.1. verwendet und die Analyse aller Sequenzen wurde für 100 "bootstrap-values" wiederholt, um zu beurteilen, wie sicher einzelne Aufzweigungen eines phylogenetischen Baums sind. Es konnte nur ein Stammbaum generiert werden. Dieser wies je Verzweigung 50-100 "bootstrap-values" auf, so das anzunehmen ist, dass die gezeigten Verwandtschaftsbeziehungen zuverlässig sind. Anhand des Stammbaums lassen sich die Isolate in vier Gruppen einteilen (Abbildung 16). Eine Gruppe für sich besitzt im Bereich der Mutationen weitgehend das gleiche Nukleinsäurenmuster.

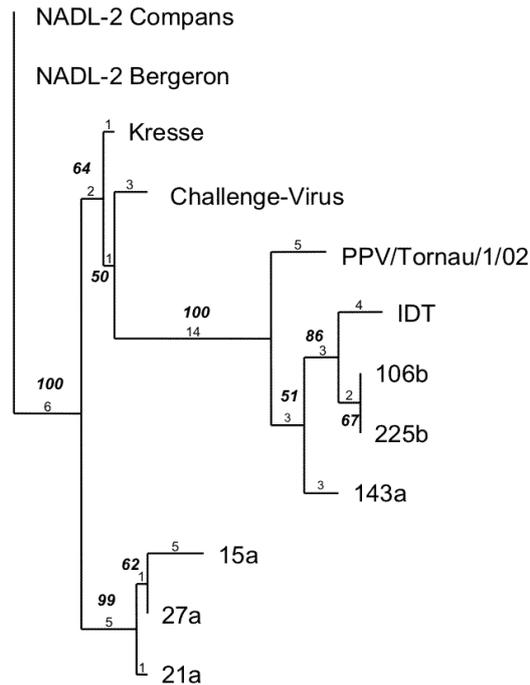


Abbildung 16: Stammbaum des porzinen Parvovirus, basierend auf der DNA-Sequenz des VP1-Gens. Die Zahlen geben die absolute Zahl an Nukleotidunterschieden an, kursiv sind die "bootstrap-values" in % angegeben.

Gruppe 1: NADL-2: Die veröffentlichten Sequenzen im Bereich der Strukturproteine stimmen bei NADL-2 Bergeron und NADL-2 Compans vollkommen überein.

Gruppe 2: Das Kresse-Virus und das Challenge-Virus unterscheiden sich nur in 5 Nukleinsäuren. Im Vergleich zu den NADL-2-Stämmen sind nur 7 bzw. 8 Nukleinsäuren verändert.

Gruppe 3: In dieser Gruppe können die drei Feldisolate 15a, 21a und 27a eingeordnet werden. Sie unterscheiden sich untereinander in maximal 4 Nukleinsäuren, jedoch in 11 von den NADL-2-Stämmen.

Gruppe 4: Diese Gruppe ist am häufigsten in ihren Nukleinsäuresequenzen im Vergleich zu NADL-2 verändert, zwischen 21 und 27 Basen. Diese Gruppe ist die größte und umfasst die Feldisolate 106b, 143a, 225b, PPV/Tornau/1/02 und dem Impfstamm IDT. Untereinander unterscheiden sie sich nur in wenigen (zwischen 4 und 8) Nukleinsäuren.

Die einzelnen Nukleotidsequenzunterschiede der verschiedenen Isolate sind in Tabelle 13 gezeigt.

In der Studie von BERGERON *et al.* (1996) wird eine Wiederholung von 127 Basen direkt nach dem Kapsidbereich von NADL-2 und NADL-2-ähnlichen Isolaten, jedoch ein Fehlen dieses sogenannten "repeat" bei Kresse und Kresse-ähnlichen Isolaten beschrieben. Bedingt durch die Zielsequenz des Primers PPV V as (auf NADL-2 Bergeron, Nukleotid 4899-4918) wurde auch der Bereich nach dem Strukturproteinbereich in Richtung 3'-Ende sequenziert. Es zeigte sich, dass keines der in Deutschland gefundenen Isolate den für NADL-2 beschriebenen "repeat" aufweist. Um Fehler bei der Sequenzierung auszuschließen wurde das Fehlen der 127-Basen-Wiederholung mit Hilfe einer PCR überprüft. Dazu wurden die Primer D4021s-D4870as verwendet, deren Amplifikat genau diesen Bereich abdeckt, und als Positiv-Kontrolle NADL-2. Das Fehlen des "repeat" wurde bei allen Isolaten verifiziert (Abbildung 17).

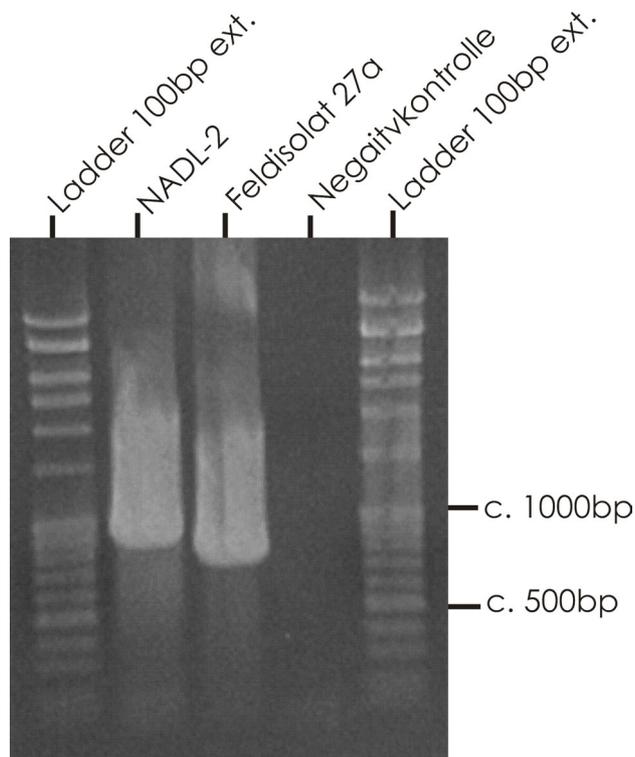


Abbildung 17: PCR mit dem Primerpaar D4021s-D4870as, das den "repeat" abdeckt, Amplifikatgröße: 872bp, das Amplifikat von NADL-2 ist deutlich größer als das Amplifikat von Feldisolat 27a

# Ergebnisse

		Nukleotidposition auf NADL-2 Bergeron											Aminosäureposition auf Vp1 von NADL-2 Bergeron												
		NADL-2 Bergeron	NADL-2 Compans	Kresse	Challenge-Virus England	PPV/Tornau/1/02	Impfstamm IDT	15a	21a	27a	106b	143a	225b	NADL-2 Bergeron	NADL-2 Compans	Kresse	Challenge-Virus England	PPV/Tornau/1/02	Impfstamm IDT	15a	21a	27a	106b	143a	225b
2496	GAC	---	---	---	--G	---	--G	---	---	---	---	---	46	D	-	-	-	E	-	E	-	-	-	-	-
2530	TTC	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	57	F	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-
2551	GAA	---	---	--G	--G	--G	--G	---	---	--G	--G	--G	64	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2664	ACT	---	---	---	-G-	-G-	-G-	---	---	-G-	-G-	-G-	102	T	-	-	-	S	S	S	-	-	S	S	S
2794	ACA	---	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	146	T	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-
2867	ACA	---	---	---	G--	G--	---	---	---	G--	G--	G--	170	T	-	-	-	A	A	-	-	-	A	A	A
2943	ACT	---	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	195	T	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2983	GCG	---	---	---	--G	--G	---	---	---	--G	---	--G	208	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3037	GAA	---	---	---	--G	--G	---	---	---	--G	--G	--G	226	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3040	CAC	---	---	---	--T	--T	---	---	---	--T	--T	--T	227	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3054	AGA	---	---	---	-A-	-A-	---	---	---	-A-	-A-	-A-	232	R	-	-	-	K	K	-	-	-	K	K	K
3070	AAT	---	---	---	---	---	--C	--C	--C	---	---	---	237	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3087	GCG	---	---	---	---	-AA	---	---	---	-AA	-AA	-AA	243	A	-	-	-	-	E	-	-	-	E	E	E
3088	GCG	---	---	---	---	-AA	---	---	---	-AA	-AA	-AA	243	A	-	-	-	-	E	-	-	-	E	E	E
3121	CAA	---	---	---	--G	--G	---	---	---	--G	--G	--G	254	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3163	GGA	---	--G	--G	--G	--G	---	---	---	--G	--G	--G	268	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3166	GTG	---	---	---	-A-	-A-	---	---	---	-A-	-A-	-A-	269	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3181	GCG	---	---	---	-A-	-A-	---	---	---	-A-	-A-	-A-	274	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3256	GTA	---	---	---	---	---	--G	--G	--G	---	---	---	299	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3259	CTT	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	300	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3403	TAT	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	348	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3453	ATC	---	-C-	---	-C-	-C-	-C-	-C-	-C-	-C-	-C-	-C-	365	I	-	T	-	T	T	T	T	T	T	T	T
3491	CAA	---	---	---	---	---	G--	G--	G--	---	---	---	378	Q	-	-	-	-	E	E	E	-	-	-	-
3506	TCA	---	---	---	A--	---	---	---	---	A--	A--	A--	383	S	-	-	-	T	-	-	-	-	T	T	T
3664	TCT	---	---	---	---	--C	---	---	---	--C	---	--C	435	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3692	GAA	---	---	---	---	C--	---	---	---	---	C--	---	445	E	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	Q	-
3719	CCA	---	---	---	A--	A--	---	---	---	A--	A--	A--	454	P	-	-	-	T	T	-	-	-	T	T	T
3768	ATT	---	---	---	-C-	-C-	---	---	---	-C-	-C-	-C-	470	I	-	-	-	T	T	-	-	-	T	T	T
3777	AGC	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---	-A-	473	S	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	N
3906	GAT	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	---	---	516	D	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-
3942	GAT	---	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	-G-	528	D	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3958	CAC	---	--A	--A	--A	--T	--G	--A	--A	--A	--A	--A	533	H	-	Q	Q	Q	-	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4015	TGT	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	552	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4030	AAG	---	---	---	--T	--T	---	---	---	--T	--T	--T	557	K	-	-	-	N	N	-	-	-	N	N	N
4049	GCA	---	---	---	---	---	T--	---	---	T--	---	---	564	A	-	-	-	-	-	S	-	S	-	-	-
4064	GAA	---	---	---	---	---	C--	C--	C--	---	---	---	569	E	-	-	-	-	-	Q	Q	Q	-	-	-
4115	TCT	---	C--	C--	C--	C--	A--	A--	A--	C--	A--	C--	586	S	-	P	P	P	P	T	T	T	P	T	P
4183	CCT	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	608	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4210	GAT	---	---	---	---	---	--C	--C	--C	---	---	---	617	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4239	AGA	---	---	-T-	---	---	---	---	---	---	---	---	627	R	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-
4423	AAT	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	688	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4441	CAA	---	---	---	--G	--G	---	---	---	--G	---	--G	694	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4474	AAC	---	---	---	--A	---	---	---	---	--A	---	--A	705	N	-	-	-	-	K	-	-	-	K	-	K
4491	ATT	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	---	711	I	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-
4501	ATA	---	---	---	--G	---	---	---	---	--G	---	--G	714	I	-	-	-	-	M	-	-	-	M	-	M
4538	AAA	---	---	---	C--	---	---	---	---	---	---	---	727	K	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-

Tabelle 13: Übersicht über die veränderten Nukleotide und Aminosäuren aller verglichenen Isolate. Die angegebene Position der veränderten Nukleinsäuren bezieht sich auf das gesamte Genom von NADL-2 Bergeron, das als Bezugssequenz gewählt wurde. Die Position der entsprechenden Aminosäure bezieht sich auf VP1. Es sind kodierende und nichtkodierende Veränderungen der Nukleotidsequenz in dieser Tabelle erfasst.

#### 4.4.2 Aminosäuresequenz der Strukturproteine VP1/VP2

Um mögliche neue antigene Varianten zu erkennen, mussten die einzelnen Isolate auf Aminosäureebene verglichen werden. Mit dem universellen genetischen Code wurden die Nukleinsäuresequenzen in korrespondierenden Aminosäuren translatiert. Die Variationen auf Nukleinsäureebene sind aufgrund des degenerierten genetischen Codes nicht vollständig auf der Proteinebene wiedergegeben. Es zeigte sich, dass von den 45 veränderten Nukleotiden 18 nicht kodierend sind, das heißt, es kam zu keiner Veränderung der Aminosäuren. Von den 27 kodierenden Nukleotidänderungen waren 6 Mutationen einzelner Isolate. Mit 21 konstanten Nukleinsäureveränderungen sind damit wesentlich mehr gefunden, als von BERGERON *et al.* (1996) beschrieben, dieser fand nur fünf konstante Nukleinsäureveränderungen bei 15 Isolaten des porcinen Parvovirus.

Wie beim Vergleich der Sequenzen auf Nukleinsäureebene ist auch auf Aminosäureebene NADL-2 als Bezugssequenz gewählt (Tabelle 13, Abbildung 19).

Als Konsequenz des genetischen Codes (3 Nukleotide  $\rightarrow$  1 Aminosäure) zeigte das Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen einen noch höheren Grad an Divergenz als auf der Nukleotidebene. So ist die Heterologie von Kresse zu NADL-2 doppelt so hoch, 0,8%. Auch bei den Feldisolaten lässt sich diese erhöhte Variabilität im Vergleich zu NADL-2 beobachten, der Anteil der veränderten Aminosäuren liegt bei 1,2 bis 2,3%. Zu Kresse fällt sie hingegen geringer aus, zwischen 0,5 und 1,5%. Unter den Feldisolaten finden sich jedoch auch zwischen 0,3 und 2,1% Heterologe. Der Impfstamm unterscheidet sich deutlich von NADL-2 (2,4%) und Kresse (1,8%) und besitzt weniger Varianz zu den Feldisolaten, die jedoch auch zwischen 0,8 und 2,3% liegen (Tabelle 14).

Ergebnisse

	Comp.	Berg.	Kreis.	Chal.	Ferk.	IDT	15a	21a	27a	106b	143a	225b
Comp.		100,0 (100,0)	99,2 (99,5)	99,2 (99,5)	97,8 (98,8)	97,7 (98,1)	98,5 (99,2)	98,8 (99,2)	98,8 (99,2)	97,7 (98,5)	97,9 (98,8)	97,7 (98,5)
Berg.	100,0 (100,0)		99,2 (99,5)	99,2 (99,5)	97,8 (98,8)	97,7 (98,1)	98,5 (99,2)	98,8 (99,2)	98,8 (99,2)	97,7 (98,5)	97,9 (98,8)	97,7 (98,5)
Kreis	99,2 (99,5)	99,2 (99,5)		99,7 (99,7)	98,6 (99,3)	98,2 (98,5)	99,2 (99,6)	99,5 (99,6)	99,5 (99,6)	98,5 (99,0)	98,6 (99,2)	98,5 (99,0)
Chal.	99,2 (99,5)	99,2 (99,5)	99,7 (99,7)		98,4 (99,0)	97,9 (98,1)	98,9 (99,3)	99,2 (99,0)	99,2 (99,2)	98,2 (98,8)	98,4 (98,8)	98,2 (98,8)
Ferk	97,8 (98,5)	97,8 (98,5)	98,6 (99,3)	98,4 (99,0)		98,5 (98,8)	98,4 (98,8)	98,1 (98,8)	98,1 (98,8)	99,0 (99,5)	99,2 (99,5)	99,0 (99,5)
IDT	97,7 (98,1)	97,7 (98,1)	98,2 (98,5)	97,9 (98,1)	98,5 (98,8)		97,7 (97,8)	97,7 (97,8)	97,7 (97,8)	99,2 (99,3)	99,0 (99,0)	99,2 (99,3)
15a	98,5 (99,2)	98,5 (99,2)	99,2 (99,6)	98,9 (99,3)	98,4 (98,8)	97,7 (97,8)		99,5 (99,7)	99,7 (100,0)	97,9 (98,5)	98,4 (98,8)	97,9 (98,5)
21a	98,8 (99,2)	98,8 (99,2)	99,5 (99,6)	99,2 (99,0)	98,1 (98,8)	97,7 (97,8)	99,5 (99,7)		99,7 (99,7)	97,9 (98,5)	98,4 (98,8)	97,9 (98,5)
27a	98,8 (99,2)	98,8 (99,2)	99,5 (99,2)	99,2 (99,2)	98,1 (98,8)	97,7 (97,8)	99,7 (100,0)	99,7 (99,7)		97,9 (98,5)	98,4 (98,8)	97,9 (98,59)
106b	97,7 (98,5)	97,7 (98,5)	98,5 (99,0)	98,2 (98,8)	99,0 (99,5)	99,2 (99,3)	97,9 (98,5)	97,9 (98,5)	97,9 (98,5)		99,3 (98,8)	100,0 (100,0)
143a	97,9 (98,8)	97,9 (98,8)	98,6 (99,2)	98,4 (98,8)	99,2 (99,5)	99,0 (99,0)	98,4 (98,8)	98,4 (98,8)	98,4 (98,8)	99,3 (99,5)		99,3 (99,5)
225b	97,7 (98,5)	97,7 (98,5)	98,5 (99,0)	98,2 (98,8)	99,0 (99,5)	99,2 (99,3)	97,9 (98,5)	97,9 (98,5)	97,9 (98,5)	100,0 (100,0)	99,3 (99,5)	

Tabelle 14: Die Identität (Homology) aller Isolate auf Aminosäurenebene: In Klammern ist die Ähnlichkeit (Similarity) angegeben, d. h. Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften werden mit berücksichtigt, Abkürzungen: Comp.=NADL-2 Compans; Berg.=NADL-2 Bergeron; Kres.=Kresse; Chal.=Challenge-Virus; Torn.=PPV/Tornau/1/02; IDT=Impfstamm IDT; Feldisolate 15a, 21a, 27a, 106b, 143a, 225b

Betrachtet man die Verteilung aller kodierenden Veränderungen auf dem gesamten Strukturproteinbereich, dann erscheint die Verteilung relativ homogen. Schließt man jedoch die Mutationen, die nur bei einem Isolat auftraten, von der Betrachtung aus, dann ergeben sich drei Bereiche, die eine leicht erhöhte Rate an Veränderungen bei einem Großteil der Isolate aufweisen. Im Bereich der Aminosäuren 365 bis 383 und im Bereich von 445 bis 473 sind drei Aminosäuren verändert, im Bereich 557 bis 586 vier (Abbildung 19, Tabelle 13). Interessanterweise zeigt der Bereich, der auf Nukleinsäurenebene gehäufte Mutationen (10 Nukleotide) aufwies, nur noch zwei Veränderungen der Primärstruktur des Proteins.

Sofern nicht nur ein Isolat von der Veränderung betroffen war, waren meist 3-5 der 11 Isolate von der Mutation betroffen. Vier Aminosäurenaustausche zwischen NADL-2 Bergeron und Compans fanden sich in allen Isolate wieder (T-195→S, D-528→G, H-533→Q, S-586→P/T). Ferner fällt auf, dass bei 21 Aminosäurenaustausche von den publizierten Sequenzen von NADL-2 zu einer Änderung der Ladung und Größe der Aminosäure kommt. Nur bei 6 dieser Mutationen ist nur ein Isolat betroffen.

Im folgenden werden einige Veränderungen aufgrund nachgewiesener relevanter Aminosäurereste aufgeführt. Alle weiteren 18 Veränderungen sind in der Tabelle 13 detailliert aufgeführt.

Aminosäure 170 (Nukleotid 2867):

Bei fünf Isolaten ist die Aminosäure an dieser Position verändert. Die Nukleotidänderung bewirkt eine Aminosäurenänderung von Threonin (polar, neutral) zu Alanin (nicht polar, aliphatisch) (T-170→A). Interessanterweise befindet sich diese Nukleotidveränderung im Bereich eines linearen Epitops, das Virus-neutralisierende Antikörper erzeugt (Kamstrup *et al.*, 1998).

Aminosäure 528 (Nukleotid 3942):

Die Aminosäure Asparaginsäure (polar, negativ) ist nur bei NADL-2-Isolaten vorhanden. Bei allen anderen befindet sich hier Glycin (nicht polar, aromatisch) (D-528→G). Diese Aminosäurenänderung wird als mitverantwortlich für die Pathogenität von Kresse beschrieben (Bergeron *et al.*, 1996).

Aminosäure 533 (Nukleotid 3958):

An dieser Position ist bei allen Isolaten außer bei den NADL-2-Isolaten und bei dem Impfstamm von IDT Histidin (polar, positiv) zu Glutamin (polar, neutral) (H-533→Q) verändert. Auch diese Basenänderung wird für die Pathogenität von Kresse verantwortlich gemacht (Bergeron *et al.*, 1996).

Aminosäure 586 (Nukleotid 4115):

Die Veränderung von Serin (polar, neutral) bei NADL-2 zu Prolin (nicht polar, aromatisch) (S-586→P) bei Kresse ist möglicherweise als dritte Aminosäurenänderung für die Pathogenität dieses Stammes verantwortlich (Bergeron *et al.*, 1996), jedoch zeigen neuere Untersuchungen, diese Mutation wahrscheinlich keine Auswirkungen auf die Kapsidstruktur

hat (Simpson *et al.*, 2002). Sechs Isolate besitzen ebenfalls diese Veränderung, jedoch haben vier Feldisolate hier ein Threonin (polar, neutral) (S-586→T).

Alle Aminosäurenveränderungen der untersuchten Isolate sind in der Tabelle 14 gezeigt.

Mit den Aminosäuresequenzen wurde ebenfalls ein Stammbaum nach dem gleichen Prinzip wie bei den Nukleotidsequenzen erstellt (Abbildung 18). Dabei wurden die Primärstrukturen der VP1-Strukturproteine mit dem "branch-and-bound"-Algorithmus analysiert und die "bootstrap-values" ermittelt. Mit der Proteinsequenz konnte ebenfalls nur ein Stammbaum ermittelt werden und es ist möglich die Aufzweigungen als zuverlässig zu werten. Die Einteilung der Isolate in vier Gruppen wie bei der Analyse der Nukleotidsequenzen lässt sich nur bedingt aufrechterhalten, denn das Challenge-Virus wird nun deutlich entfernt von Kresse dargestellt. Jedoch lässt sich die restliche Gruppeneinteilung, in Gruppe 1 mit den NADL-2 Isolaten, Gruppe 3 mit den Isolaten 15a, 21a, 27a und Gruppe 4 mit den Isolaten 106b, 143a, 225b, PPV/Tornau/1/02 und den IDT-Impfstamm beibehalten.

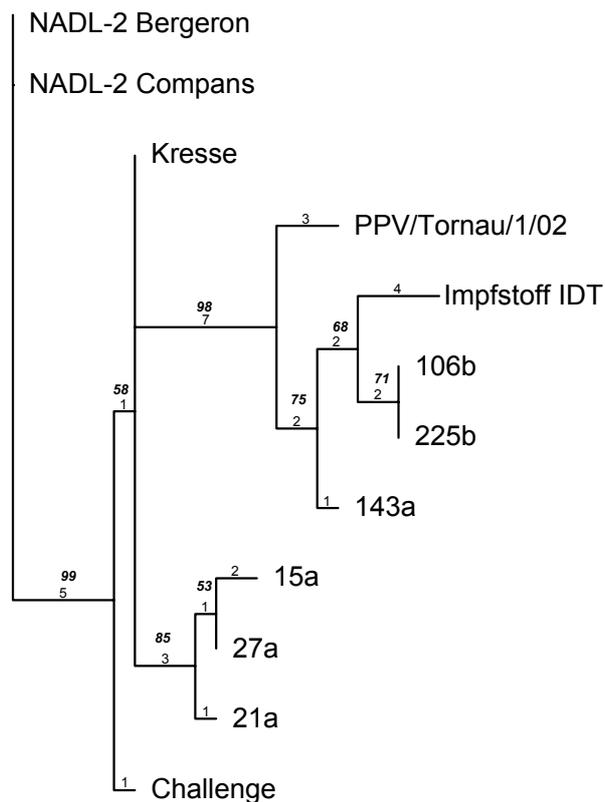


Abbildung 18: Stammbaum des porcinen Parvovirus, basierend auf der Aminosäuresequenz des VP1-Gens. Die Zahlen geben die absolute Zahl an Nukleotidunterschieden an, in Klammern und kursiv sind die "bootstrap-values" in % angegeben



# Ergebnisse

Fortsetzung der Abbildung 19

	280	290	300	310	320	330	340
Begeron	QLISNNMTEINLVSFEQE	IFNVVLKTTITESATS	PPPTKIYNNDLTASLM	VALDTNNTLPYTPA	APRSETL		
Compans	.....						
Kresse	.....						
Challenge	.....						
IDT	.....						
PPV/Tornau	.....						
15a	.....						
21a	.....						
27a	.....						
106b	.....						
143a	.....						
225b	.....						

	350	360	370	380	390	400	410
Begeron	GFYPWLPKPTQYRYL	SCIRN	LNPPTYTGQS	QQITDS	SIQTGLHSDIMFY	TIENAVPIHLLRT	GDEFST
Compans	.....						
Kresse	.....						
Challenge	.....						
IDT	.....						
PPV/Tornau	.....						
15a	.....						
21a	.....						
27a	.....						
106b	.....						
143a	.....						
225b	.....						

	420	430	440	450	460	470	480
Begeron	GIYHFDTKPLKLT	HSWQTNRS	LGPPKLLTE	PTEGDQH	PGTLPAA	NRKGYHQT	INN
Compans	.....						
Kresse	.....						
Challenge	.....						
IDT	.....						
PPV/Tornau	.....						
15a	.....						
21a	.....						
27a	.....						
106b	.....						
143a	.....						
225b	.....						

	490	500	510	520	530	540	550
Begeron	QVGYNTPYMNFEYS	NGGPF	LTPIVPTAD	TQYND	DEPN	GAIRFTMD	YQHGHLTTSSQ
Compans	.....						
Kresse	.....						
Challenge	.....						
IDT	.....						
PPV/Tornau	.....						
15a	.....						
21a	.....						
27a	.....						
106b	.....						
143a	.....						
225b	.....						

# Ergebnisse

Fortsetzung der Abbildung 19

	560	570	580	590	600	610	620
Begeron	GRAPKQQFNQQA	PLNLENTN	NGTLLPSD	PIGGKSN	MHFMTL	NTYGPL	TALNNTAPVFPNGQIWDKELD
Compans	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Kresse	.....	.....	.....	P	.....	.....	.....
Challenge	.....	.....	.....	P	.....	.....	.....
IDT	N	.....	.....	P	.....	.....	.....
PPV/Tornau	N	.....	.....	P	.....	.....	.....
15a	.....	S	Q	.....	T	.....	.....
21a	.....	.....	Q	.....	T	.....	.....
27a	.....	S	Q	.....	T	.....	.....
106b	N	.....	.....	P	.....	.....	.....
143a	N	.....	.....	T	.....	.....	.....
225b	N	.....	.....	P	.....	.....	.....

	630	640	650	660	670	680	690
Begeron	TDLKPR	LHVTAPFV	CKNNPPGQ	LFVKIAPNL	TDDFNADSP	QQPRIITYS	NFWWKGTLLTF
Compans	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Kresse	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Challenge	I	.....	.....	.....	.....	.....	.....
IDT	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PPV/Tornau	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
15a	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
21a	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
27a	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
106b	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
143a	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
225b	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	700	710	720
Begeron	NPIQQHTTTAENIGN	NYIPTNIGG	IRMFPEYSQLIPRKLY
Compans	.....	.....	.....
Kresse	.....	.....	.....
Challenge	.....	.....	.....
IDT	.....	K	T MK Q
PPV/Tornau	.....	.....	.....
15a	.....	.....	.....
21a	.....	.....	.....
27a	.....	.....	.....
106b	.....	K	MK
143a	.....	.....	.....
225b	.....	K	MK

## Ergebnisse

Abbildung 20: Alignment der Sequenzen der 12 Isolate; Nukleotidpositionen, an der ein oder mehrere Nukleotide verändert sind, sind gelb hervorgehoben.

	10	20	30	40	50	60	
Bergeron	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
Compans	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
Kresse	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
Challenge	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
PPV/Tornau	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
IDT	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
15a	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
21a	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
27a	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
106b	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
143a	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
225b	ATGGCGCCTCCTGCAAAAAGAGCAAGAGGACTAACTCTACCAGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAAAC						
	70	80	90	100	110	120	130
Bergeron	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
Compans	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
Kresse	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
Challenge	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
PPV/Tornau	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
IDT	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
15a	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
21a	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
27a	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
106b	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
143a	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
225b	TCTACTAGACCAAGGAGAACCAACTAATCCATCAGACGCCGAGCAAAAAGAACACGACGAAGCCTACGAC						
	140	150	160	170	180	190	200
Bergeron	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
Compans	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
Kresse	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
Challenge	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
PPV/Tornau	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
IDT	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
15a	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
21a	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
27a	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
106b	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
143a	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
225b	AAATACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAA						
	210	220	230	240	250	260	270
Bergeron	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
Compans	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
Kresse	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
Challenge	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
PPV/Tornau	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
IDT	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
15a	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
21a	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
27a	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
106b	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
143a	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						
225b	ACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAAATTTGGACATTACTTCTTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCT						

# Ergebnisse

Abbildung 20/2

	280	290	300	310	320	330	340	
Bergeron	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
Compans	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
Kresse	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
Challenge	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
PPV/Tornau	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
IDT	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
15a	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
21a	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
27a	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
106b	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
143a	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				
225b	CCAAA	ACTCTCAGAAACAGACTCACCA	ACTCACCA	ACTTACATCTCAACAACCAGAGGTAAGAAGATCGCCGAGAAAA				

	350	360	370	380	390	400	410	
Bergeron	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
Compans	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
Kresse	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
Challenge	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
PPV/Tornau	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
IDT	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
15a	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
21a	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
27a	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
106b	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
143a	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							
225b	CACCCAGGGTCTAAACCACCAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTTATAAACTTAGCTAAAAAA							

	420	430	440	450	460	470	480	
Bergeron	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
Compans	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
Kresse	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
Challenge	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
PPV/Tornau	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
IDT	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
15a	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
21a	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
27a	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
106b	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
143a	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							
225b	AAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAACTCTAACTCAATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAACCCTATT							

	490	500	510	520	530	540	550	
Bergeron	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
Compans	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
Kresse	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
Challenge	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
PPV/Tornau	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
IDT	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
15a	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
21a	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
27a	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
106b	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
143a	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							
225b	AATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTAGG							

# Ergebnisse

Abbildung 20/3

	560	570	580	590	600	610	620
Bergeron	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
Compans	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
Kresse	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
Challenge	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
PPV/Tornau	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
IDT	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
15a	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
21a	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
27a	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
106b	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
143a	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG
225b	GGT	GCT	GGGGGGG	TTGGT	GTGTCTACAGG	TACTTTCAATAATCAAAC	CAGAATTTCAACTTGGGGGAG

	630	640	650	660	670	680	690
Bergeron	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
Compans	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
Kresse	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
Challenge	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
PPV/Tornau	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
IDT	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
15a	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
21a	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
27a	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
106b	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
143a	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			
225b	GGCT	TGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATA	CATCTAAATATGCCAGAACAC	GAAACATAC			

	700	710	720	730	740	750
Bergeron	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
Compans	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
Kresse	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
Challenge	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
PPV/Tornau	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
IDT	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
15a	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
21a	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
27a	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
106b	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
143a	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			
225b	AAAA	GAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGG	CGGGACAAATGGTACAAGACGATGCACACACA			

	760	770	780	790	800	810	820
Bergeron	CAAA	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	AGTGTGGTTCAATCCAGCGGACTGG				
Compans	CAAA	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	AGTGTGGTTCAATCCAGCGGACTGG				
Kresse	CAAA	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	AGTGTGGTTCAATCCAGCGGACTGG				
Challenge	CAAA	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	AGTGTGGTTCAATCCAGCGGACTGG				
PPV/Tornau	CAG	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	GGTATGGTTCAATCCAGCAGACTGG				
IDT	CAG	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	GGTATGGTTCAATCCAGCAGACTGG				
15a	CAAA	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	AGTGTGGTTCAATCCAGCGGACTGG				
21a	CAAA	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	AGTGTGGTTCAATCCAGCGGACTGG				
27a	CAAA	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	AGTGTGGTTCAATCCAGCGGACTGG				
106b	CAG	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	GGTATGGTTCAATCCAGCAGACTGG				
143a	CAG	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	GGTATGGTTCAATCCAGCAGACTGG				
225b	CAG	TGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGG	GGTATGGTTCAATCCAGCAGACTGG				

# Ergebnisse

Abbildung 20/4

	830	840	850	860	870	880	890
Bergeron	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					
Compans	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					
Kresse	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					
Challenge	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					
PPV/Tornau	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					
IDT	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					
15a	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTG					
21a	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTG					
27a	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTG					
106b	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					
143a	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					
225b	CAGTTAATATCCAACAACATGACAGAAATAAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTC	CAATGTAGTA					

	900	910	920	930	940	950	960
Bergeron	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
Compans	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
Kresse	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
Challenge	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
PPV/Tornau	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
IDT	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
15a	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
21a	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
27a	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
106b	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
143a	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						
225b	CTTAAAAAATACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAATATATAATAATGATCTAACTGCAAGC						

	970	980	990	1000	1010	1020	1030
Bergeron	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
Compans	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
Kresse	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
Challenge	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
PPV/Tornau	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
IDT	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
15a	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
21a	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
27a	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
106b	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
143a	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						
225b	TTAATGGTTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTT						

	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
Bergeron	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
Compans	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
Kresse	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
Challenge	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
PPV/Tornau	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
IDT	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
15a	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
21a	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
27a	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
106b	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
143a	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						
225b	GGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCATCAGAAACCTA						

# Ergebnisse

Abbildung 20/5

	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
Bergeron	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
Compans	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
Kresse	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
Challenge	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
PPV/Tornau	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
IDT	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
15a	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
21a	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
27a	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
106b	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
143a	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				
225b	AATCCACCAACATACTGGACAATCACA	AACAAATAACAGACTCA	ATACAAACAGGACTTACACAGTGAC				

	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240
Bergeron	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
Compans	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
Kresse	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
Challenge	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
PPV/Tornau	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
IDT	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
15a	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
21a	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
27a	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
106b	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
143a	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						
225b	ATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCACA						

	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310
Bergeron	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
Compans	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
Kresse	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
Challenge	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
PPV/Tornau	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
IDT	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
15a	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
21a	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
27a	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
106b	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
143a	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						
225b	GGAATATATCACTTTGACACAAAACCCTAAAATTAACCTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGA						

	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380
Bergeron	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCT						
Compans	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCT						
Kresse	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCT						
Challenge	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCT						
PPV/Tornau	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACACAGGAACACTACCAGCAGCT						
IDT	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACACAGGAACACTACCAGCAGCT						
15a	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCT						
21a	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCT						
27a	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCT						
106b	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACACAGGAACACTACCAGCAGCT						
143a	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACACAGGAACACTACCAGCAGCT						
225b	CTGCCTCCAAAACCTACTAAGTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACACAGGAACACTACCAGCAGCT						

# Ergebnisse

Abbildung 20/6

	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Bergeron	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
Compans	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
Kresse	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
Challenge	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
PPV/Tornau	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
IDT	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
15a	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
21a	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
27a	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
106b	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
143a	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	
225b	AACACAAGAAAAGGTTATCACC	AAACAAT	TAATAATAG	CTACACAGAAGCAACAGCAAT	TAGGCCAGCT	

	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510
Bergeron	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
Compans	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
Kresse	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
Challenge	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
PPV/Tornau	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
IDT	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
15a	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
21a	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
27a	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
106b	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
143a	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				
225b	CAGGTAGGATATAATACACCATA	CATGAATTTTGAATACTCCAAT	GGTGGACCATTTCTAACTCCTATA				

	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580
Bergeron	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
Compans	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
Kresse	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
Challenge	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
PPV/Tornau	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
IDT	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
15a	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
21a	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
27a	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
106b	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
143a	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				
225b	GTACCAACAGCAGACACACAATATAAT	GATGATGAACCAAATGGTGC	TATAAGATTTACAATGGATTAC				

	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650
Bergeron	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
Compans	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
Kresse	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
Challenge	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
PPV/Tornau	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
IDT	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
15a	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
21a	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
27a	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
106b	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
143a	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				
225b	CAACATGGACACTTAACCACATCTT	CACAAGAGCTAGAAAAGATACACAT	TCAATCCACAAAAGTAAATGT				

# Ergebnisse

Abbildung 20/7

	1660	1670	1680	1690	1700	1710	1720
Bergeron	GGAAGAGCTCCAAAG	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
Compans	GGAAGAGCTCCAAAG	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
Kresse	GGAAGAGCTCCAAAG	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
Challenge	GGAAGAGCTCCAAAG	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
PPV/Tornau	GGAAGAGCTCCAAAT	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
IDT	GGAAGAGCTCCAAAT	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
15a	GGAAGAGCTCCAAAG	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
21a	GGAAGAGCTCCAAAG	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
27a	GGAAGAGCTCCAAAG	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
106b	GGAAGAGCTCCAAAT	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
143a	GGAAGAGCTCCAAAT	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		
225b	GGAAGAGCTCCAAAT	CAACAATTTAATCAACAG	G	CACCCTAAACCTAG	AAAAATACAAATAATGGAACA		

	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790
Bergeron	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAT	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
Compans	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAT	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
Kresse	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
Challenge	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
PPV/Tornau	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
IDT	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
15a	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
21a	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
27a	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
106b	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
143a	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				
225b	CTTTTACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAAAC	C	TAAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGA				

	1800	1810	1820	1830	1840	1850	1860
Bergeron	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
Compans	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
Kresse	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
Challenge	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
PPV/Tornau	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
IDT	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
15a	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
21a	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
27a	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
106b	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
143a	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		
225b	CCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCT	G	TATTTCCAAATGGTCAAATATGGGAT	AAAGA	AACTTGAT		

	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930
Bergeron	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
Compans	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
Kresse	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
Challenge	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
PPV/Tornau	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
IDT	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
15a	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
21a	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
27a	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
106b	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
143a	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				
225b	ACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTA	AAAAACAATCCACCAGGACA	AACTA				

# Ergebnisse

Abbildung 20/8

	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
Bergeron	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
Compans	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
Kresse	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
Challenge	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
PPV/Tornau	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
IDT	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
15a	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
21a	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
27a	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
106b	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
143a	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
225b	TTTGTAAAAATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATA						
	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070
Bergeron	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
Compans	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
Kresse	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
Challenge	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
PPV/Tornau	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
IDT	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
15a	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
21a	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
27a	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
106b	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
143a	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
225b	ACTTATTCAAACTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGG						
	2080	2090	2100	2110	2120	2130	
Bergeron	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
Compans	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
Kresse	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
Challenge	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
PPV/Tornau	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
IDT	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
15a	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
21a	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
27a	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
106b	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
143a	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
225b	AACCCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAATATTGGTGCC						
	2140	2150	2160	2170	2180		
Bergeron	ATAAGAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
Compans	ATAAGAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
Kresse	ATAAGAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
Challenge	ATAAGAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
PPV/Tornau	ATAAGAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
IDT	ATGAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
15a	ATGAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
21a	ATGAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
27a	ATGAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
106b	ATGAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
143a	ATGAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						
225b	ATGAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAG						

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, von Feldisolaten den Strukturprotein-Bereich des porzinen Parvovirus zu sequenzieren. Das Kapsid ist hauptsächlich für die Immunantwort verantwortlich und mit dieser Studie wurde versucht mögliche neue antigene Varianten zu finden. Zu diesen Zweck mussten zunächst Feldisolate detektiert werden. Dazu wurde eine diagnostische PCR durchgeführt. Es wurde über 2 Jahre eine große Anzahl von Proben auf porzines Parvovirus hin untersucht. Gleichzeitig erhielten wir Einblick über die Beteiligung von porzinen Parvovirus bei Fruchtbarkeitsstörungen.

### 5.1 Häufigkeit von porzinem Parvovirus bei Reproduktionsstörungen

Der Anteil an porzinem Parvovirus an Aborten wurde in verschiedenen Studien untersucht. Jedoch gab es bisher noch keine Untersuchungen über die Beteiligung von porzinen Parvovirus in Deutschland. Die bisher durchgeführten Studien beschränken sich auf wenige Länder: die USA, Niederlande, Dänemark und Schweiz. Vergleicht man die verschiedenen Studien, so sieht man eine starke Varianz der Häufigkeit des porzinen Parvovirus bei Fruchtbarkeitsstörungen. So ergaben zwei Studien in der USA nur eine Beteiligung von weniger als 5% (Kirkbride & McAdaragh, 1978; Nielsen *et al.*, 1989), in den Niederlanden um die 10% (Broll *et al.*, 1993), in der Schweiz hingegen zwischen fast 30 bis 48% (Zanoni *et al.*, 1984; Brunner *et al.*, 1987; Broll *et al.*, 1993) und in Dänemark 45% (Sørensen & Askaa, 1981). So stark differierende Angaben, der Umstand, dass die letzte durchgeführte Untersuchung vor 10 Jahren stattfand und dass es in Deutschland noch keine Untersuchungen gab, werfen natürlich die Frage nach der Beteiligung von porzinem Parvovirus an Fruchtbarkeitsstörungen in Deutschland auf.

Im Rahmen dieser Studie wurden in einem Zeitraum von 2 Jahren 519 Proben von 272 Würfen und Sauen aus 172 unterschiedlichen Betrieben in Süddeutschland mit Hilfe einer diagnostischen PCR auf porzines Parvovirus untersucht. Dies gibt einen guten Eindruck über die Beteiligung von porzinem Parvovirus an Reproduktionsstörungen im süddeutschen Raum. Da jedoch von April bis September 2001 fast nur streng nach PPV-Verdacht selektierte Tiere, im restlichen Zeitraum die Proben wesentlich weniger stark auf diesen Verdacht hin zur Untersuchung eingeschickt wurden, erscheint es sinnvoll, die Ergebnisse getrennt zu betrachten.

Von April bis September 2001 handelte es sich bei den zu untersuchenden Proben hauptsächlich um Proben von Tieren mit typischen Symptomen der porzinen Parvovirusinfektion, wie Mumifikation, kleine Würfe (zurückzuführen auf eine Resorption infizierter Früchte) und Umrauschen. Etliche dieser Proben stammten aus Betrieben, die nicht oder unregelmäßig impften. Die hohen Ergebnisse von 37,1% der Proben, bzw. 40,7% der Würfe war aufgrund dieser Vorselektion zu erwarten.

Von Oktober 2001 bis März 2003 wurden allgemein Proben von Tieren mit Fruchtbarkeitsstörungen untersucht. Neben Proben mit klassisch den porzinem Parvovirus zugeschriebenen Symptomen wurden viele abortierte Feten, totgeborene und lebensschwache Ferkel zur Untersuchung eingeschickt. Solche Symptome werden seltener mit porzinem Parvovirus in Verbindung gebracht. Häufig wurde von den einsendenden Tierärzten der Verdacht auch auf andere Erreger, wie z. B. PCV-2, geäußert. Die Untersuchungen in diesem Zeitraum spiegeln somit die Beteiligung von porzinem Parvovirus an Fruchtbarkeitsstörungen allgemein wieder und diese fällt damit deutlich niedriger aus, nur bei 9,7% der Proben, bzw. bei 10,1% der Würfe wurde porzines Parvovirus-Genom nachgewiesen.

Da bisher keine Untersuchungen über die Beteiligung von porzinem Parvovirus an Fruchtbarkeitsstörungen in Deutschland durchgeführt wurden, können nur die Ergebnisse der Studien aus den anderen Ländern zum Vergleich herangezogen werden. In den publizierten Studien wurden allgemein Aborte auf PPV untersucht, so dass die Ergebnisse des Zeitraums Oktober 2001 bis März 2003, in der ebenfalls keine spezifische Selektion durchgeführt wurde, zum Vergleich heran gezogen werden sollten. Dies gestaltet sich angesichts der großen Varianz der Ergebnisse als schwierig. Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch verschiedene Faktoren erklärt werden. So wurden einige Untersuchungen zu einem Zeitpunkt durchgeführt, wo eine Impfung gegen porzines Parvovirus noch nicht üblich, und damit eine höhere Beteiligung von PPV zu erwarten war. Zum anderen könnte die Haltungform eine Rolle spielen, so wurden in der Schweiz hauptsächlich Nebenerwerbsbetriebe (Broll *et al.*, 1993) von den Untersuchungen erfasst, in denen häufig auf Impfungen verzichtet wird, wohingegen in industrieller Haltung meist ein gutes Impfmanagement herrscht. Damit sind die untersuchten Proben indirekt vorselektiert. In der neuesten Studie aus den USA wurden darüber hinaus hauptsächlich Spätaborte und Totgeburten (Nielsen *et al.*, 1989), beides keine klassischen Symptome der PPV-Infektion, untersucht. Die Sensitivität der unterschiedlichen Nachweismethoden ist ein weiterer Faktor, der die sehr unterschiedlichen Ergebnisse erklären kann. So wurde bei den Studien in den USA der PPV-Nachweis nur mit Virusisolierung auf

Zellkultur geführt, in der Schweiz wurden zusätzlich die Proben auf Antikörper gegen PPV untersucht.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine diagnostische PCR durchgeführt, die als sensitivste Nachweismethode für porcines Parvovirus gilt. Ein direkter Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit denen anderen Studien ist aufgrund der sehr unterschiedlichen Voraussetzungen, wie Zeitpunkt, Impfstatus, Haltungsform und Nachweismethode, nicht möglich.

Betrachtet man die erhaltenen Ergebnisse von 9,7% der Proben bzw. 10,1% der Würfe in Relation zu dem Umstand, dass in Deutschland 90% der Schweinezuchtbetriebe gegen porcines Parvovirus impfen (Ritzmann, persönliche Mitteilung), und selbst in den Studien mit der höchsten Beteiligung von porcinem Parvovirus nicht mehr als in 48% der Fruchtbarkeitsstörungen auf PPV zurückgeführt werden, erscheint die in dieser Studie erhaltene Häufigkeit sogar relativ hoch.

In der Klinik wird häufig beklagt, dass es trotz Impfung zu Fruchtbarkeitsstörungen mit porziner Parvovirus-Symptomatik kommt. Die in Deutschland erhältlichen Impfstoffe sind inaktiviert, die Wirksamkeit von inaktivierten Parvovirus-Vakzinen bei anderen Tierarten (Hund und Katze) ist durchaus umstritten. Schweine entwickeln generell gegen Totimpfstoffe nur eine schwache Immunantwort. Gegen inaktivierte PPV-Impfstoffe werden niedrige Titer, die häufig wenige Monate nach der Impfung unter die Nachweisgrenze fallen, angegeben (Brown *et al.*, 1987; Castro *et al.* 1992). Jedoch sollen schon sehr niedrige Antikörpertiter vor einer Virämie, die Voraussetzung für eine transplazentare Übertragung ist, schützen (Mengeling *et al.*, 1979; Paul *et al.*, 1980). Da die Impfung gegen porcines Parvovirus zwei- bis dreimal im Jahr durchgeführt wird, sollten die Tiere geschützt sein, auch wenn der Antikörpertiter einige Monate nach der Impfung stark abfallen sollte. Es wird vorwiegend terminorientiert geimpft, so dass der ganze Bestand konstant geschützt sein sollte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Zeitraum April bis September 2001 27, im Zeitraum Oktober 2001 bis März 2003 155 verschiedene Bestände (davon einige ebenfalls im ersten Zeitraum) untersucht. Im ersten Zeitraum wurden 40,7% der Bestände PPV-positiv getestet, im zweiten 12,3%, insgesamt wurden 16,3% aller 172 untersuchten Betriebe positiv getestet. Bedenkt man, dass 90% aller Bestände impfen, ist diese Zahl durchaus höher als man erwarten würde. Mögliche Erklärungen sind, dass Sauen keine Antikörper nach einer Impfung entwickeln (Castro *et al.*, 1992), dass der Antikörpertiter schneller absinkt als erwartet, die Tiere dadurch nicht geschützt sind oder dass die geringe Immunantwort eine Virämie doch nicht verhindert. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es neue antigene Varianten gibt, gegen die eine Impfung

nicht schützt, denn mindestens drei der sechs in Deutschland erhältlichen Impfstoffe basieren auf älteren Isolaten. Eines dieser Isolate wurde 1964 in München (Mayr & Mahnel, 1964) als Kontamination aus Schweinezellkulturen entdeckt, ein anderes wurde laut Angaben des Herstellers vor circa 15 Jahren in den USA isoliert und das dritte Isolat gilt als Grundlage der meisten heute gebräuchlichen Impfstoffe gegen porcines Parvovirus. Es handelt sich dabei um den 1975 in den USA isolierten Stamm NADL-2 (Mengeling & Cutlip, 1975). Mit diesem Isolat wurden etliche Impfstoffe entwickelt und mit diesen zahlreiche Untersuchungen durchgeführt (Mengeling *et al.* 1979; Paul *et al.*, 1980, 1980; Edwards *et al.* 1986; Wrathall, 1988). Von den anderen in Deutschland zugelassenen Impfstoffen ließen sich nur bei einem Angaben über das Alter und Herkunft in Erfahrung bringen. Bei diesem Isolat handelt es sich laut Hersteller um ein circa 5 Jahre altes Isolat aus Europa. Dass es grundsätzlich möglich ist, dass seit der Isolierung der älteren Impfstoffstämme neue Varianten entstanden sein können und die Impfung gegen PPV, abhängig vom Impfstamm, möglicherweise nicht mehr wirkungsvoll genug sein könnte, zeigt die Entwicklung des caninen Parvovirus (CPV-2). 1978 wurde erstmals CPV-2 isoliert (Appel *et al.*, 1979), dieses wurde innerhalb von wenigen Jahren durch die antigenetisch neue Variante CPV-2a verdrängt und 1986 entstand eine weitere Variante, CPV-2b (Parrish *et al.*, 1988, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass eine Impfung mit CPV-2 niedrige Antikörpertiter gegen CPV-2b erzeugt (Pratelli *et al.*, 2001). Da eine Impfung gegen PPV grundsätzlich eine schwache Immunantwort erzeugt, wäre es denkbar, dass diese nicht mehr ausreicht, um vor möglichen neuen antigenen Varianten zu schützen.

Da jedoch keine Angaben über die Impfpraxis der einzelnen untersuchten Betriebe vorliegen, kann anhand der vorliegenden Daten keine Aussage über den Wirkungsgrad der kommerziell erhältlichen Impfstoffe im allgemeinen getroffen werden.

Es ist möglich, dass die hier erhaltenen Zahlen nicht den wirklichen Anteil der Beteiligung von porcinem Parvovirus an Fruchtbarkeitsstörungen wiedergibt. Es zeigte sich, dass nicht in jedem Fetus/Ferkel eines Wurfes ein Virusnachweis gelang. So wurden bei zwölf von 17 PPV-positiven Würfen, bei denen mindestens zwei Proben zur Untersuchung vorlagen, nur in einem Teil des Wurfes PPV nachgewiesen. Durch die intrauterine Verbreitung im Horn ist oft nicht der ganze Wurf von einer Infektion betroffen (Mengeling *et al.*, 1980; Mengeling & Paul, 1981), so dass bei Untersuchungen nur eines oder zweier Feten der Wurf falsch-negativ getestet werden könnte. Im gesamten Untersuchungszeitraum wurden durchschnittlich nur 2

Feten pro Wurf untersucht. Es ist also denkbar, dass die Beteiligung von porzinem Parvovirus an Fruchtbarkeitsstörungen höher liegen könnte.

Im Rahmen dieser Studie wurden verschiedene Ausgangsmaterialien untersucht, unter anderem Rektumtupfer. Interessanterweise ließ sich aus 12 der 19 Rektumtupfer porzines Parvovirus nachweisen. Bisher nahm man an, dass PPV nur für 14 Tage ausgeschieden wird (Paul *et al.*, 1980), jedoch ist bei einer Sau gesichert, dass die Infektion mit porzinem Parvovirus zum Zeitpunkt der Rektumtupfernahme weit zurücklag. So konnte anhand der Scheitel-Steiß-Länge der ungefähre Zeitpunkt des Todes der Feten festgestellt werden (Rüsse, 1991), bedenkt man die langsame transplazentare Infektion (Mengeling *et al.*, 1978, 1980), so musste die Infektion mindestens 45 Tage zurückliegen. Virus wird folglich wesentlich länger ausgeschieden als bisher angenommen. Die bisherige Annahme beruht auf Untersuchungen, bei der der Virusnachweis mit Isolierung auf Zellkultur geführt wurde und es ist möglich, dass die hier verwendete sensitivere PCR eine deutlich längere Virusausscheidung nachweisen könnte. GRADIL *et al.* (1990) diskutiert zusätzlich die Möglichkeit einer persistierenden Infektion und in diesen Fall wäre es denkbar, dass durch den Stress der Geburt eine erneute Ausscheidung ausgelöst worden ist. Da nur in einem Fall der Zeitpunkt der Infektion gesichert ist, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden um ein Aussage über die Dauer und Art der Ausscheidung zu treffen.

### **5.2 Virusisolierung**

Das Wissen, das man über das porzine Parvovirus besitzt, beruht hauptsächlich auf Untersuchungen mit dem 1975 isolierten NADL-2-Stamm (Cutlip & Mengeling, 1975). Auch die meisten anderen Studien wurden mit älteren, aus den USA und Kanada stammenden Isolaten durchgeführt. Über in Deutschland oder Europa vorkommende PPV-Isolate ist nichts bekannt. So war ein Ziel dieser Arbeit neuere Isolate aus Deutschland auf Zellkultur isolieren und zu untersuchen.

Aus PPV-positiven Proben aus 22 Betrieben wurde wiederholt versucht, porzines Parvovirus auf Zellkultur anzuzüchten. Jedoch konnten nur 5 Isolate auf Zellkultur isoliert werden. Zwei davon konnten zwar angezüchtet werden, jedoch replizierten sie nur in niedrigen Titern. Die Problematik der schwierigen Virusanzucht wurde mehrfach beschrieben (Forman *et al.*, 1977; Mengeling, 1978; Sørensen & Askaa, 1981, Choi *et al.*, 1989). Dies lässt sich einerseits durch eine progressive Abnahme von infektiösen Partikeln nach dem Tod des Fetus erklären

(Mengeling & Cutlip, 1975). Andererseits tendiert porcines Parvovirus dazu defekte interferierende Viruspartikel zu bilden. Diese enthalten ein fehlerhaftes Genom (Choi *et al.*, 1987; Ranz *et al.*, 1989), die vermutlich um Rezeptorstellen an der Zelle mit den infektiösen Virionen konkurrieren. In verschiedenen Studien wird von einer Virusanzüchtung nach mehreren Passagen berichtet (Forman *et al.*, 1977; Mengeling, 1978), jedoch konnten damit nicht mehr Isolate gewonnen werden. Zehn Gewebeverreibungen wurde bis zu fünfmal passagiert, dennoch konnte Virus nur isoliert werden, wenn die Zellkultur schon nach der ersten Passage positiv war. Es ist jedoch möglich dass die Passagezahl noch höher sein müsste, denn in einer Studie wird davon berichtet, dass selbst das Zellkultur-angepasste Isolat NADL-2 8x passagiert werden musste, bevor es erhalten wurde (Choi *et al.*, 1989). Das Kontaminationsrisiko steigt jedoch mit zunehmender Passagezahl deutlich an (Cartwright, 1976) und so wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet. Dass zwei der Isolate sich auf Zellkultur nur sehr gering replizieren ließen, ist eventuell damit zu erklären, dass sie eine höhere oder niedrigere Temperatur als die hier verwendeten 37°C für ihre Replikation benötigen. Eine Temperaturrestriktion konnte für den Stamm Kresse auf Zellkultur gezeigt werden (Choi *et al.*, 1989). Bei diesem Stamm konnte auch gezeigt werden, dass nach mehrfacher (10x) Passage auf Schweinehodenzellen sich das Spektrum, bei der sich dieser Stamm repliziert, erhöhen lässt (Choi *et al.*, 1990). Es ist folglich denkbar, dass sich diese zwei Isolate nach mehrfacher Passage deutlich besser auf Zellkultur anzüchten lassen. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass diesen Isolaten von den hier verwendeten Zelllinien aus der Niere und Hoden vom Schwein (PK-15- und STE-Zellen) nicht geeignete Enzyme zur Replikation zur Verfügung gestellt werden und andere Zelllinien geeigneter wären. Ob sich die Replikation dieser zwei Isolate optimieren lässt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

### **5.3 Mögliche Auswirkungen von Punktmutation in publizierten Primersequenzen**

Es wurden für die Untersuchung auf porcines Parvovirus 3 verschiedene PCR-Methoden anhand der veröffentlichten Sequenzen von NADL-2 entwickelt und publiziert. Zwei weisen virales Genom mit Hilfe einer PCR im Bereich des Kapsidgenoms nach, die dritte im Bereich des Nichtstrukturproteins. Die veröffentlichten Primersequenzen wurden mit denen im Rahmen dieser Untersuchung sequenzierten Isolaten verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei einer der Methoden, die ein Amplifikat im Bereich des VP1 erzeugt (Arnauld *et al.*, 1998),

sich auf der Zielsequenz des "revers" Primers eine konstante Mutation befindet. Bei der PCR-Methode, die ein Amplifikat im Bereich des Nichtstrukturproteins erzeugt (Soares *et al.*, 1998), handelt es sich um eine nested-PCR, das heißt, es wird zunächst mit einer ersten PCR ein größeres Amplifikat erzeugt und bei der anschließenden zweiten PCR liegt die Zielsequenz eines zweiten Primerpaares auf diesem Amplikon. Damit wird eine höhere Sensitivität und Spezifität erreicht. Die publizierten Sequenzen dieser zwei Primerpaare wurde mit den drei Sequenzen der fast vollständig sequenzierten Isolate IDT, PPV/Tornau/1/02 und dem Challenge-Virus verglichen. Dabei zeigte sich, dass der "revers" Primer der ersten PCR zwei und der "revers" Primer der zweiten PCR ebenfalls eine Mutation bei allen drei Isolaten aufwies. Die Sensitivität dieser zwei veröffentlichten Methoden könnte man aufgrund der Mutationen anzweifeln, da diese die zwischenmolekularen Kräfte, die eine Bindung des Primers an die Zielsequenz ermöglicht, herabsetzt. Ob es zu einer Minderung der Sensitivität bei den einzelnen Methoden kommt, muss mit Hilfe einer vergleichenden PCR mit unterschiedlichen Isolaten gezeigt werden.

#### **5.4 Besonderheit von NADL-2 am 5'-Ende des Genoms**

Bedingt durch die Lage der Primer für die Sequenzierung des Kapsidbereichs wurden bei allen Isolaten bis zu 400 Basen über das Ende dieses Bereichs hinaus amplifiziert. Wurden die erhaltenen Sequenzen mit NADL-2 verglichen, so zeigte sich, dass allen untersuchten Isolaten eine Wiederholung von 127 Basen, ein sogenannter "repeat", fehlt. Dies konnte schon bei Kresse und Kresse-ähnlichen Isolaten gezeigt werden (Bergeron *et al.*, 1996). Die Bedeutung dieses "repeats" ist nicht bekannt. Es könnte sein, dass diese Wiederholung Einfluss auf die Virulenz hat (Bergeron *et al.*, 1996) oder wie bei MVMi auf die Replikationsfähigkeit. So konnte für MVMi gezeigt werden, dass das Fehlen eines 65-Basen "repeats" die Replikationsrate um 10 bis 100fach senken kann (Salvino *et al.*, 1991). Die Bedeutung der 127-Basen Wiederholung beim porcinen Parvovirus muss jedoch noch geklärt werden.

#### **5.5 Sequenzanalyse des Strukturproteingenoms**

Dass schon wenige Nukleinsäureänderungen zu erheblichen Veränderungen der Eigenschaften von Parvoviren führen können, konnte sehr anschaulich bei dem caninen Parvovirus gezeigt werden. So entstand aus CPV-2 innerhalb weniger Jahre zwei neue antigene Typen, CPV-2a und CPV-2b und verdrängte diese (Parrish *et al.*, 1988, 1991). Die

Veränderung von nur zwei Aminosäuren erzeugte diese neuen antigenen Typen. Nicht nur die antigenen Eigenschaften des caninen Parvovirus, wie die Immunantwort (Pratelli *et al.*, 2001), wurde damit verändert, sondern auch ihr Wirtsspektrum um den Wirt Katze erweitert (Truyen *et al.*, 1995, 1996). Diese drei Veränderungen liegen auf der Kapsidoberfläche an der Schulter des "dimples", in einer Region, in der bereits ein neutralisierendes Epitop lokalisiert wurde.

Für das porcine Parvovirus ist ebenfalls gezeigt worden, dass nur 2 Aminosäureänderungen zur Erweiterung des Wirtsspektrum *in vitro* führt. So reicht die Änderung einer Aminosäure auf dem Nichtstrukturprotein NS1 (Nukleotid 1932+1934 = Isoleucin → Leucin) und einer Aminosäure auf den Strukturproteinen VP1/VP2 (Nukleotid 4051 = Asparagin → Histidin) aus, dass die PPV-Variante P2 auch auf caninen Zellen in Zellkultur wächst, ansonsten sind sie beschränkt auf Zellkulturen vom Schwein (Vasudevacharya & Compans, 1992).

Wenige Aminosäureänderungen können also erheblich die Eigenschaften einzelner Isolate verändern. Die Grundlage der Aminosäuren stellt die Desoxyribonukleinsäuren-Sequenz. In dieser Studie wurden 12 Isolate miteinander verglichen, zwei Sequenzen von NADL-2, eine Sequenz vom hochvirulenten Stamm Kresse aus dem Jahr 1985, eine Sequenz von dem Challenge-Isolat aus England von 1986, der 1964 isolierte Impfstamm des Impfstoffwerks Dessau-Tornau und sieben aktuelle Sequenzen von Feldisolaten aus Deutschland.

Vergleicht man die erhaltenen Nukleotidsequenzen der vorliegenden Arbeit miteinander, so zeigt sich, dass auf Nukleinsäureebene die verschiedenen Isolate nah miteinander verwandt sind. Die am weitesten voneinander entfernten Isolate unterscheiden sich nur in 1,3% ihrer Nukleotidsequenz. Betrachtet man den erstellten Stammbaum, so sieht man deutlich, dass die zwölf verglichenen Isolate in vier Gruppen eingeteilt werden können, in eine Gruppe mit den NADL-2-Sequenzen, eine Gruppe mit den beiden älteren Isolaten Kresse und Challenge, und zwei Gruppen mit den Feldisolaten, in einer ist der Impfstamm IDT enthalten. Die Gruppen der Feldisolate sind relativ stark zu NADL-2 verändert, bis zu 28 Nukleotide, und auch zu den beiden Isolaten von 1985 und 1986 besteht eine erhebliche Differenz, mit bis zu 20 Unterschieden jedoch nicht so ausgeprägt. Mehr Aussagekraft besitzt jedoch ein Vergleich der translatierten Aminosäuresequenz, da etliche der veränderten Nukleinsäuren keine Änderung der Aminosäuren bewirkt, dass heißt nicht kodierend ist.

Werden die Aminosäuresequenzen von dem Strukturprotein VP1 verglichen, entfernen sich die einzelnen Isolate weiter voneinander. So unterscheiden sich die am weitesten entfernten

Isolate nun um 2,3% in ihrer Proteinsequenz. Der anhand der Aminosäuresequenz erstellte Stammbaum zeigt, dass sich größtenteils die vorherige Einteilung in vier Gruppen aufrechterhalten lässt. Als einziges werden die Isolate Challenge und Kresse stammesgeschichtlich entfernter als im Phylogramm auf Basis der DNA-Sequenz dargestellt. Ebenso wie auf Nukleinsäureebene, sind die zwei Gruppen der Feldisolate relativ stark zu NADL-2 verändert, eine Gruppe mit 8 bis 10 Aminosäuren, die andere Gruppe sogar mit 14 bis 16 Aminosäuren. Angesichts der Tatsache, dass schon eine Änderung weniger Aminosäuren maßgebliche Eigenschaften der Parvoviren ändern können, ist es durchaus möglich, dass hier unterschiedliche antigene Varianten vorliegen.

In der bisher einzigen publizierten Studie über DNA- und Aminosäuren-Sequenzunterschiede des Strukturproteins VP2 verschiedener PPV-Isolate wurde NADL-2 mit Kresse und 15 Feldisolaten aus Kanada verglichen. In dieser werden nur fünf konstante Aminosäuren-Veränderungen von VP2 (AS: 195, 365, 528, 533 und 586) zwischen NADL-2, Kresse und den zwischen 1986 bis 1996 isolierten PPV-Isolaten beschrieben. Jedoch wurden nur drei davon für die Pathogenität von Kresse verantwortlich gemacht (AS: 528, 533 und 586) (Bergeron *et al.*, 1996).

In der hier geführten Studie finden sich diese Aminosäurenänderungen ebenfalls, so sind bei allen sequenzierten Isolaten die Aminosäuren 528 (D-528→G ) und 533 (H-533→Q) gegenüber NADL-2 verändert. Eine Ausnahme bildet das Isolat des Impfstoffes von IDT, es besitzt an Aminosäure 533 das Muster von NADL-2. Die These, die diese zwei Aminosäurenänderungen für die Pathogenität von Kresse mitverantwortlich macht, wird gestützt durch Untersuchungen über die räumliche Struktur des Kapsids. Diese zeigt, dass diese Aminosäurenänderungen vermutlich die dreidimensionale Struktur ändern und damit möglicherweise Rezeptorstellen umstrukturieren könnten. Dass alle sequenzierten virulenten Feldisolate von dieser Varianz betroffen sind, könnte eine Hinweis darauf sein, dass diese Veränderungen *in vivo* eine Rolle bei der Pathogenität spielen, nachdem keine virulenten Feldisolate mit dem Aminosäuremuster von NADL-2 an diesen Stellen gefunden wurden.

Die Aminosäure 586 (S-586→P), ist die dritte Veränderung, die für die Pathogenität von Kresse mitverantwortlich gemacht wird. Nur 3 virulente Feldisolaten besitzen an dieser Position die gleiche Aminosäure wie Kresse. Die anderen 4 besitzen anstelle von Serin bei NADL-2 hier Threonin. Durch die sehr ähnlichen Eigenschaften von Serin und Threonin erscheint es unwahrscheinlich, dass es durch eine Änderung von Serin zu Threonin zu einer Änderung der Tertiärstruktur von VP1/VP2 kommt. Die These, dass diese Aminosäurenposition mitverantwortlich ist, dass NADL-2 ein avirulentes Isolat ist, erscheint

dadurch unwahrscheinlicher. Diese Überlegung wird durch die Studie über die dreidimensionale Struktur von PPV unterstützt. In dieser wurde die Lage der Aminosäure in der Tertiärstruktur beschrieben und festgestellt, dass der Austausch von Serin zu Prolin bei Kresse keine Veränderung der dreidimensionalen Struktur bewirken dürfte, der Austausch der Aminosäuren an Position 528 und 533 hingegen schon (Simpson *et al.*, 2002).

In der Studie von BERGERON *et al.* (1996) wurden insgesamt 15 Feldisolate aus einem Zeitraum von 10 Jahren sequenziert. Nur die fünf Veränderungen wie von NADL-2 zu Kresse wurden als konstant beschrieben. Interessanterweise sind diese jedoch nicht die einzigen konstanten Aminosäurenänderungen, die im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden und die beschriebene Einteilung in NADL-2- oder Kresse-ähnlich lässt sich auch nicht anwenden. Noch weitere 12 Aminosäurenveränderungen wurden gefunden, bei denen die Aminosäure des NADL-2-Typs bzw. von Kresse gegen eine Aminosäure mit teilweise gravierend anderen Eigenschaften, wie Säure-Basen-Verhalten, Polarität und Größe, ausgetauscht wurde und damit eine Veränderung der räumlichen Struktur des Kapsids nach sich ziehen könnte. Da jedoch zum augenblicklichen Zeitpunkt die genaue Lage dieser Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur des VP2 bzw. des Kapsids nicht bekannt ist, lässt sich anhand der Arbeit von SIMPSON *et al.* (2002) nur vermuten, dass die Veränderungen an Aminosäurenposition 378, 454, 470 und 705, die bei mehreren Feldisolaten gefunden wurden, an oder in der Nähe der Oberfläche befinden. Es ist zu klären, ob diese Veränderungen die Tertiärstruktur und damit mögliche Rezeptorstellen beeinflussen.

Die Aminosäurenänderung an Position 170 ist eventuell von besonderer Bedeutung. Sie ist am aminoterminalen Ende des Strukturproteins VP2 lokalisiert. Dieses Ende ist bei Virionen wahrscheinlich durch die 5-fach Pore des Kapsids herausgefädelt und frei beweglich am Virion. An dieser Position ist bei vier Feldisolaten die Aminosäure Threonin gegen Alanin ausgetauscht. Die Aminosäurenveränderung von Threonin zu Alanin ist von besonderem Interesse, da sie im Bereich des Epitop 1 (Position 158-172) liegt, das als einziges von neun linearen Epitopen Virus-neutralisierende Antikörper induziert (Kamstrup *et al.*, 1998). Es ist durchaus möglich, dass die Änderung von Threonin, eine neutrale, polare Aminosäure, zu Alanin, eine unpolare, aliphatische Aminosäure, die dreidimensionale Struktur und damit die antigene Struktur verändert. Weitere Arbeiten über die antigenen Eigenschaften der einzelner virulenten Feldisolate müssen dies klären.

BERGERON *et al.* (1996) teilte die 15 untersuchten Isolate in NADL-2- oder Kresse-ähnlich ein, jedoch lässt sich dies hier nicht anwenden. Nur das Challenge-Virus kann als Kresse-ähnlich geführt werden, dieses stammt auch aus dieser Zeit. Interessant ist, dass in dieser Studie kein einziges Isolat gefunden wurde, das NADL-2 oder Kresse nah verwandt ist. Die hier sequenzierten Feldisolate lassen sich in zwei eigene Gruppen einteilen, die mit 8-16 Aminosäurenänderungen weit von NADL-2 und mit 5 bis 12 ebenfalls weit von Kresse entfernt sind. Eine mögliche Erklärung für den niedrigen Verwandtschaftsgrad ist, dass es sich bei NADL-2 und Kresse um Isolate handelt, die nur in USA und Kanada vorkommen oder vorkamen. Der Umstand, dass der Impfstamm des Impfstoffwerks Dessau-Tornau von 1964, isoliert in München, den aktuellen Feldisolaten aus Deutschland in seiner Nukleinsäuren- und Aminosäurenstruktur sehr ähnlich ist und phylogenetisch diesen auch nah verwandt dargestellt wird, könnte diese These stützen. Dagegen spricht jedoch, dass ein reger Zuchttieraustausch zwischen Europa und den USA und Kanada stattfindet. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass sich das porcine Parvovirus seit der Isolierung von Kresse und NADL-2 verändert hat und die Isolate aus dieser Zeit verdrängt hat, ähnlich wie beim caninen Parvovirus, bei dem CPV-2 völlig von CPV-2a und CPV-2b verdrängt wurde. Da jedoch die hier gesammelten Proben in, evolutionär gesehen, kurzer Zeit gesammelt wurden und keine älteren Daten über Isolate in Deutschland oder Europa vorliegen, lässt sich darüber leider keine Aussage treffen. Es ist weiterhin möglich, dass es sich um eine Kombination beider Faktoren handelt. Ob es sich bei den in Deutschland gefundenen Isolaten um neue antigene Varianten gegenüber NADL-2 und Kresse handelt, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Jedoch kann anhand der vorliegenden Sequenzen die Aussage getroffen werden, dass dies durchaus im Bereich des möglichen liegt.

## 6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beurteilung der antigenetischen Variabilität des porcinen Parvovirus (PPV). Gleichzeitig erfasst diese Studie den Anteil von porcinem Parvovirus an Fruchtbarkeitsstörungen in Süddeutschland.

Dazu wurde Gewebematerial von 500 Schweinen aus 172 Betrieben auf PPV untersucht. Aus den Gewebeproben wurde die Gesamtnukleinsäure isoliert und anschließend mittels quantitativer und qualitativer PCR amplifiziert. 82 Proben (15,8%) aus 28 Betrieben (16,3%) waren positiv.

Im Rahmen der diagnostischen PCR konnte gezeigt werden, dass Rektumtupfer geeignetes Untersuchungsmaterial sind, um PPV nachzuweisen. In 12 von 19 untersuchten Proben gelang der Virusnachweis. In einem untersuchten positiven Fall lag die Infektion gesichert mindestens 45 Tage zurück.

Aus 22 in der PCR PPV-positiv getesteten Gewebeproben verschiedener Herkunft, wurde eine Virusanzucht versucht. Dies gelang nur bei 5 Isolaten. Zwei dieser Isolate zeigten dabei nur eine sehr niedrige Replikationsrate. Auch durch mehrfache Passagierung ließen sich nicht mehr Isolate anzüchten.

Da das Kapsid für die Immunantwort verantwortlich gemacht wird, wurde aus positiven Gewebeproben das vollständige Gen des Kapsidproteins (VP1) von 7 Feldisolaten amplifiziert und sequenziert. Die gewonnenen Sequenzen wurden mit den Stämmen PPV-NADL-2, PPV-Kresse, einem PPV-Challenge-Virus von 1986 und mit dem PPV-Impfstamm von IDT verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass alle Isolate eine sehr hohe Homologie aufweisen (auf Nukleinsäureebene zu 98,7%, auf Aminosäureebene 97,7%). Eine phylogenetische Analyse erbrachte, dass die verwandtschaftliche Beziehung von NADL-2, Kresse und dem Challenge-Virus zu den 7 Feldisolaten relativ gering ist. Der Nukleinsäuresequenz-Vergleich zeigte, dass für 2 publizierten Methoden zum PPV-Nachweis mittels PCR, Punktmutationen auf der Zielsequenz einzelner Primer bei einzelnen Feldisolaten entstanden sind, und die Eignung dieser PCRs zum Nachweis eines breiten Isolatspektrums eingeschränkt sein könnte. Insgesamt implizieren die gewonnenen Daten, dass sich das porcine Parvovirus antigenetisch verändert haben könnte. Die gewonnenen Isolate erlauben nun die gezielte Untersuchung der Konsequenz dieser Evolution für die Entwicklung wirksamer Vakzine.

## 7. Summary

### **Studies on the genetic variability of recent isolates of porcine parvovirus**

The aim of this study was to review the antigenetic variability of porcine parvovirus and to examine the role of porcine parvovirus in reproductive failure.

Organ specimens of 500 fetuses and stillborn piglets from a total of 172 farms were analysed. Total DNA was isolated from the explants and quantitative as well as qualitative PCR was subsequently carried out. In 82 samples (15,8%) out of 28 farms (16,3%), PPV was diagnosed.

In this study, we were able to show that rectal swabs are suitable substrates from which to detect porcine parvovirus in sows using a PCR analysis. In 12 out of 19 rectal swabs PPV genome was amplified. In one PPV-positive sample the sow was infected a minimum of 45 days before the rectal swab was collected.

An attempt was made to cultivate porcine parvovirus out of 22 PPV-positive organ specimens of different origin. However, only 5 isolates could be cultivated and the production of progeny virus was very low in two of these isolates. Although multiple passages were performed, the virus yield did not increase.

As the viral capsid is the target of host protective immunity against PPV, the complete gene of the structural protein of 7 field isolates was amplified and sequenced. The obtained sequences were aligned with the porcine parvovirus-strains NADL-2, Kresse, one challenge-virus of the year 1986 and with the vaccine strain of IDT. The sequence homology among the isolates sequenced is very high (on the level of nucleotide acids minimum 98,7%, on the level of amino acids minimum 97,7). Phylogenetic analysis revealed that there is only a distant relationship between NADL-2, Kresse and the challenge-virus on the hand and the field isolates on the other hand. A comparison of the aligned PPV-sequences from field isolates with the published sequence of two primers recommended for diagnostic PCR revealed single nucleotide differences. Therefore, it appears possible that the primer sequences published may not be suitable for a diagnostic PPV-PCR in the field. Taken as a whole, these data suggest that the porcine parvovirus may have altered antigenetically. Furthermore, the obtained sequences from field isolates of PPV now permit the examination of the antigenetic consequence of this evolution to develop effective vaccines against the PPV strains now present in the field.

## 8. Materialliste

### 8.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

6-, 24-, 96-Well-Plates	(Nunc, Wiesbaden)
Abimed Pipetten	(Abimed, Langenfeld)
Bakterienschüttler	(Fa. Edmund Bühler)
Brutschrank Modell QNW 500TVBA	(Nunc, Wiesbaden)
Chromas 1.45	(School of Health Service, Griffith University, Australia)
Cryo Tube <sup>TM</sup>	(Nunc, Wiesbaden)
Elektrophoresekammern	(Peqlab, Erlangen)
Eppendorf Pipetten	(Eppendorf, Köln)
Eppendorf Zentrifuge	(Eppendorf, Köln)
Falcon® 15ml, 50ml	(Nunc, Wiesbaden)
Filter	(Roth, Karlsruhe)
Flow Herasafe	(Heraeus, Hanau)
Gefriertruhe	(Nunc, Wiesbaden)
GelDoc	(BioRad, München)
Gelelektrophoresekammern	(Peqlab, Erlangen)
GeneAmp 5700 Detection System	(PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
GeneAmp 5700 SDS Software	(PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
GeneJockeyII	(Fa. Biosoft, UK)
Glaswaren	(Biochrom, Berlin;Roth, Karlsruhe)
Heizradiator VELP type re	(Roth, Karlsruhe)
Jellyfish (Version 1.5)	(Labvelocity Inc, USA)

## Materialliste

---

Kühlschrank Hanseatic	(Otto, Hamburg)
Kühlzentrifuge 2K15	(Sigma, Taufkirchen)
Kühlzentrifuge Centrifuge 5810 R	(Eppendorf, Köln)
Labofuge	(Heraeus, Hanau)
Laborwaage 440-43	(Kern, Balingen-Frommern)
Leica DCTwain	(Leica, Microsystems, Heerbrugg, CH)
Leica IM50	(Leica, Microsystems, Heerbrugg, CH)
LightCycler	(Roche, Mannheim)
MicroAmp Optical Caps	(PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
MicroAmp Optical tubes	(PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
Mikroskop DMIL	(Leica, Bernsheim)
Mikrowelle Cookmate	(Daewoo, Butzbach)
MultiAnalyst (Version 1.1)	(BioRad, München)
Paup 3.1.1.	(Swofford, Laboratory of Molecular Systematics, Washington; USA)
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml	(ABgene, Hamburg)
PCR-Reaktionsgefäße 96-Wellplate	(ABgene, Hamburg)
pH-Meter Beckmann	(Roth, Karlsruhe)
Photometer	(BioRad, München)
Pipettenspitzen	(Roth, Karlsruhe)
Power-Supply PowerPac 300	(BioRad, München)
Primer Expresssoftware (Version 1.0)	(PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
Primer-Analysis Software OLIGO 4.1	(Biosciences, Annapolis)
Reaktionsgefäße 1,5ml	(Greiner, Nürtingen)
Schüttler Mini Rocking Platform	(Biometra, Göttingen)
Thermocycler GeneAmp	(Peqlab, Erlangen)

Thermocycler GeneAmp	(Perkin Elmer, München)
Thermomixer	(Eppendorf, Köln)
Tischzentrifuge MiniSpin	(Eppendorf, Köln)
UV-Transilluminator 302nm	(BioRad, München)
Vakuumpumpe	(KNF Neuberger, )
Vakuumzentrifuge SpeedVac	(Osvath, Geretsried)
Vortex-Gerät Heidolph	(Roth, Karlsruhe)
Wasserbad Memmert	(Roth, Karlsruhe)

## 8.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

100b-Ladder extended	(Roth, Karlsruhe)
Agarosegele	1%ige Agarose(w/v) in TAE-Elektrophorespuffer
Ampicillin	(Sigma, Taufkirchen)
Azeton	(Roth, Karlsruhe)
CaCl <sub>2</sub>	(Roth, Karlsruhe)
DMSO	(Sigma, Taufkirchen)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	(Roth, Karlsruhe)
Ethanol absolut	(Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromid 10mg/ml	(Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromidbad	500µl Ethidiumbromidlösung auf 1l Wasser (0,5µg/ml)
FITC-Anti-PPV-HIS	(FITC-markiertes Hyperimmunserum gegen Porzines Parvovirus) (BFAV, Riems)
FKS, fetales Kälberserum	(Sigma, Taufkirchen)
Glycerin	(Roth, Karlsruhe)
Isopropanol	(Roth, Karlsruhe)

## Materialliste

---

KCl	(Roth, Karlsruhe)
LB-Agar	(Sigma, Taufkirchen)
LB-Bouillon (Luria-Bertoni-Medium)	(Sigma, Taufkirchen)
LB-Agar	(Sigma, Taufkirchen )
LB-Z Platten	
LB-Agar	
100µg/ml Ampicillin	
LB-Z Platten	
80µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoy-b-D-Galactosid)	
240µg/ml IPTG (Isopopyl-b-D-thiogalactopyranosid)	
LightCycler® - Faststart DNA Master SYBR Green® I	(Roche, Mannheim)
LightCycler® Glaskapillaren	(Roche, Mannheim)
Methanol, absolut	(Roth, Karlsruhe)
MgCl <sub>2</sub>	(Roth, Karlsruhe)
Minimal Essential Medium with Earle's Salts and L-Glutamin	(Sigma, Taufkirchen)
Minimal Essential Medium with Hank's Salts and L-Glutamin	(Sigma, Taufkirchen)
MnCl <sub>2</sub>	(Merck, Darmstadt)
MOPS (4-Morpholinpropansulfonsäure 99,5%)	(Sigma, Taufkirchen)
NaCl	(Roth, Karlsruhe)
NaHCO <sub>3</sub> Natriumhydrogencarbonat	(Roth, Karlsruhe)
Natriumpyruvat	(Sigma, Taufkirchen)
Non-Essential Aminoacids	(Sigma, Taufkirchen)
PBS (Phosphate Buffered Saline) ohne MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub>	(Sigma, Taufkirchen)
PBS-T	
0,1% Tween 20 in PBS ohne MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub>	
Penicillin-Streptomycin	(Biochrom, Berlin)
peqGOLD Universal Agarose	(Peqlab, Erlangen)
Phenol	(Roth, Karlsruhe)
QiaAmp® DNA Mini Kit	(Qiagen, Hilden)

Qiagen QIAquick® PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAquick® Gel Extraction Kit	(Qiagen, Hilden)
RbCl <sub>2</sub>	(Sigma, Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	(New England Biolabs, GB)
Saline	
	80g NaCl 10g Glukose 4g KCl 3,5g NaHCO <sub>3</sub> ad 1l Aqua dest. sterilfiltrieren
STV-Lösung	
	Trypsin 50ml Versen 25ml Saline 100ml ad 1l Aqua dest. sterilfiltrieren
SYBR Green® PCR Core Reagents	(PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
T4-Ligase	(Invitrogen, Karlsruhe)
TAE-Elektrophorespuffer	
	242 g Tris 57,1 ml Eisessig (Essigsr. 100%) 37,2 g Na <sub>2</sub> ×EDTA×2H <sub>2</sub> O pH 8,5 autoklavieren
TfB-1-Puffer	
	30mM Kaliumacetat 50mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM RbCl <sub>2</sub> 10mM CaCl <sub>2</sub> 15% (v/v) Glycerin mit NaOH auf pH 5,8 eingestellt
TfB-2-Puffer	
	10mM MOPS, pH 7,0 75mM CaCl <sub>2</sub> 10mM RbCl <sub>2</sub> 15% (v/) Glycerin

## Materialliste

---

Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethan) (Roth, Karlsruhe)

Trypsin

12,5g Trypsin (Biochrom, Berlin)  
ad 1l Aqua dest.  
sterilfiltrieren

Tryptanblau 1% (Sigma, Taufkirchen)

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan) (Sigma, Taufkirchen)

Ultrapu® Wasser (Merck, Darmstadt)

Versen (Biochrom, Berlin)

Versen

10g Versen  
ad 1l Aqua dest  
sterilfiltrieren

X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoy-b-D-Galactosid) (Roth, Karlsruhe)

Zellkulturmedium:

STE-Medium

MEM with Hank's Salts and L-Glutamin  
850mg/l Natriumbicarbonat  
1% nichtess. Aminosäuren  
1% Natriumpyruvat  
10%FKS

STE-Medium zur Virusisoierung: STE-Medium mit 2,5% FKS, Penicillin und Streptomycin, je 100.000 IE/l

SPEV-Medium

MEM with Hank's Salts and L-Glutamin  
850mg/l NaHCO<sub>3</sub>  
10%FKS)

SPEV-Medium zur Virusisoierung: SPEV-Medium mit 2,5% FKS, Penicillin und Streptomycin, je 100.000 IE/l

PK15-Medium

MEM with Earle's Salts and L-Glutamin  
850mg/l NaHCO<sub>3</sub>  
1% nichtess. Aminosäuren  
120mg/l Natriumpyruvat  
10% FKS

PK15-Medium zur Virusisoierung: PK15-Medium mit 2,5% FKS, Penicillin und Streptomycin, je 100.000 IE/l

## 9. Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
A	Adenin, bei Aminosäuren: Alanin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin, bei Aminosäuren: Cystin
cpE	zythopathischer Effekt
CPV	canines Parvovirus
D	Asparaginsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Phenylalanin
FKS	fetales Kälberserum
FPV	felines Parvovirus
g	bei Zentrifugenangaben: Erdbeschleunigung; bei Gewichtsangaben: Gramm
G	Guanin, bei Aminosäuren: Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
IE	internationale Einheiten

## Abkürzungsverzeichnis

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KID50	Kulturinfektiöse Dosis, bei der 50% der Kulturen infiziert werden
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria-Bertoni
m	milli
M	Molar, bei Aminosäuren: Methionin
MEM	Minimal Essential Medium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
MVM	Minute-Virus of Mice
n	nano
N	normal, bei Aminosäuren: Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
p	pico
P	Prolin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline mit 0,1% Tween 20
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PH	potentia Hydrogenium

## Abkürzungsverzeichnis

---

PPV	porzines Parvovirus
Q	Glutamin
qPCR	qualitative PCR
R	Arginin
S	Serin
sec	Sekunde
STV	Saline-Trypsin-Versen-Lösung
T	Thymin, bei Aminosäuren: Threonin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur von Nucleinsäuren, entspricht der Temperatur, bei der 50% der Helices denaturiert sind
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt, bei Aminosäuren: Valin
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VLP	virus-like particle
W	Tryptophan
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galactopyranosid
Y	Tyrosin

## 10. Literaturverzeichnis

**Allan, G. M.; Kennedy, S.; McNeilly, F.; Foster, C.; Ellis, J. A.; Krakowka, S. J.; Meehan, B. M. Meehan, B. M.; Adair, B. M.: 1999**

"Experimental reproduction of wasting disease and death by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus"

*J. Comp. Pathol.* **121**, 1-11

**Appel, M. J. G.; Scott, W. F.; Carmichael, L. E.: 1979**

"Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis"

*Vet.Rec.* **105**(8), 156-159

**Alt, M.; Witte K. H.: 1986**

"Untersuchungen über den Einfluss maternaler Antikörper auf die Vakzination von Jungsauen gegen porcines Parvovirus"

*Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **99**, 257-262

**Arnauld, C.; Legeay, O.; Laurian, Y.; Thiery, R.; Denis, M.; Blanchard, P.; Jestin, A.: 1998**

"Development of a PCR-based method coupled with a microplate colorimetric assay for the detection of porcine parvovirus and application to diagnosis in piglet tissues and human plasma"

*Mol. Cell. Probes.* **12**(6), 407-416

**Astell, C. R.; Chow, M. B.; Ward, D. C.: 1985**

"Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus SNA replication"

*J. Virol.* **54**, 171-177

**Bachmann, P. A.: 1969**

"Vorkommen und Verbreitung von Picodna-(Parvo-)Virus beim Schwein"

*Zbl. Vet. Med. B* **16**, 341-345

**Bachmann, P. A.: 1970**

"Parvovirus beim Schwein"

*Zbl. Vet. Med. B* **17**, 192-194

**Bachmann, P. A.; Sheffy, B. E.; Vaughan, J. T.: 1975**

"Experimental in utero infection of fetal pigs with a porcine parvovirus"

*Infect. Immun.* **12**(3), 455-460

**Belak, D.; Rivera, E.; Ballagi-Pordany, A.; Hanzhong, W.; Widen, F.; Soos, T.: 1998**

"Detection of challenge virus in fetal tissues by nested PCR as a test of the potency of a porcine parvovirus vaccine"

*Vet. Res. Commun.* **22**(2), 139-146

**Bergeron, J.; Menezes, J.; Tijssen, P.: 1993**

"Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus"

*Virology*. **197**(1), 86-98

**Bergeron, J.; Hérbert, B.; Tijssen, P.: 1996**

"Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates"

*J. Virol.* **70**(4), 2508-2515

**Berns, K. I.: 1990**

"Parvovirus Replication"

*Microbiol. Rev.* **54**(3), 316-329

**Bonté, P.; Vandeplassche, M.; Biront, P.: 1984**

"Porcine parvovirus infection in boars"

*Zbl. Vet. Med. B* **31**, 391-395

**Broll, S.; Waldvogel, A. S.; Roskopf, M.; Corboz, L.; Pospischil, A.: 1993**

"Untersuchungen zu infektiösen Ursachen für Aborte und Totgeburten beim Schwein in der Schweiz"

*J. Vet. Med. B* **40**, 641-653

**Brown, T. T. Jr.; Paul, P. S.; Mengeling, W. L.: 1980**

"Response of conventionally raised weanling pigs to experimental infection with a virulent strain of porcine parvovirus"

*Am. J. Vet. Res.* **41**(8), 1221-1224

**Brown, T. T. Jr.; Whitacre, M. D.; Robinson, O. W.: 1987**

"Use of an inactivated vaccine for prevention of parvovirus-induced reproductive failure in gilts"

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **15**,190(2):179-181

**Brunner, D.; Henn, V.; Hasler, J.: 1987**

"Nachgewiesene Parvovirusinfektionen beim Schwein in den Jahren 1985/1986"

*Schweizer Arch. Tierheilk.* **129**, 259-263

**Cartwright, S. F.: 1970**

"Test available for the detection of some virus infection of pigs and their interpretation"

*Vet. Annu.* **11**, 77-82

**Cartwright, S. F., Huck, R. A.: 1967**

"Virus Isolated in Association with Herd Infertility, Abortions and Stillbirths in Pigs"

*Vet. Rec.* **81**, 196-197

**Cartwright, S. F., Lucas, M., Huck, R. A.: 1969**

"A small hemagglutinating porcine DNA virus. I. Isolation and properties"

*J. comp. Path.* **79**, 371-377

**Cartwright, S. F., Lucas, M., Huck, R. A.: 1971**

"A small hemagglutinating porcine DNA virus. II. Biological and serological studies"  
*J. Comp. Pathol.* **81**, 145-155

**Castro, A.; Nikoletti, G.; Cocuzza, G.: 1971**

"Characteristics of hemagglutinins of some picodnaviruses"  
*Arch. ges. Virusforsch.* **34**, 261-265

**Castro, J. M.; del Pozo, M.; Simarro, I.: 1992**

"Field trials of an inactivated virus vaccine against porcine Parvovirus"  
*J. Vet. Med. B* **39**, 337-344

**Choi, C. S.; Molitor, T. W.; Joo, H. S.; Gunther, R.: 1987**

"Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses"  
*Vet. Microbiol.* **15**(1-2), 19-29

**Choi, C. S.; Molitor, T. W.; Joo, H. S.: 1987**

"Inhibition of porcine parvovirus replication by empty virus particles"  
*Arch. Virol.* **96**, 75-87

**Choi, C. S.; Joo, H. S.; Molitor, T. W.: 1989**

"Temperature dependent replication of porcine parvovirus isolates"  
*Arch. Virol.* **108**, 121-129

**Choi, C. S.; Joo, H. S.; Molitor, T. W.: 1990**

"Replication of two porcine parvovirus isolates at non-permissive temperatures"  
*Arch. Virol.* **113**, 235-244

**Christensen, J.; Pedersen, M.; Aasted, B.; Alexandersen, S.: 1995**

"Purification and characterization of the major non-structural protein (NS 1) of the Aleutian mink disease parvovirus"  
*J. Viro.* **69**, 1802-1809

**Cotmore, S. F.; Tattersall, P.: 1987**

"The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates"  
*Advances of Virus Research* **33**, 91-174

**Cotmore, S. F.; Tattersall, P.: 1995**

"DNA replication in autonomous parvoviruses"  
*Seminars in Virology* **6**, 271-281

**Cotmore, S. F.; D'Aabramo, A. M., Jr.; Carbonell, L. R.; Bratton, J.; Tattersall, P.: 1997**

"The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells"  
*Virology* **231**, 267-280

**Croghan, D. L.; Matchett, A.; Koski, T. A.: 1973**

"Isolation of porcine parvovirus from commercial trypsin"  
*Appl Microbiol.* **26**(3):431-433

**Cropper, M.; Dunne, H. W.; Leman, A. D.; Starkey, A. L.; Hoefling, D. C.: 1976**

"Prevalence of antibodies to porcine enterovirus and porcine parvovirus in the body fluids of fetal pigs from small vs. large litters"

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **168**, 233-235

**Cutler, R. S.; Molitor, T. W.; Leman, A. D.; Werdin, R. E.: 1983**

"Farm studies of porcine parvovirus infection"

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182**(6), 592-594

**Cutlip, R. C.; Mengeling, W. L.: 1975**

"Experimentally induced infection of neonatal swine with porcine parvovirus"

*Am. J. Vet. Res.* **36**(08), 1179-1182

**Dea, S.; Elazhary, M. A.; Marineau, G.P; Vaillancourt, J.: 1985**

"Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets"

*Can. J. Comp. Med.* **53**(1), 343-345

**Donaldson-Wood, C. R.; Joo, H. S.; Johnson, R. H.: 1977**

"The effect on reproductive performance of porcine parvovirus infection in a susceptible pig herd"

*Vet. Rec.* **150**(5), 139-143

**Dorsch, S.; Liebisch, G.; Kaufmann, B.; von Landenberg, P.; Hoffmann, J. H.; Drobnik, W.; Modrow, S.: 2002**

"The VP1 unique region of Parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity"

*J. Virol.* **76**(4), 2014-2018

**Dunne, H. W., Crabbe, J. L., Hakanson, J. G., Kradel, D. C., Bubash, G. R.: 1965**

"Porcine reproductive failure associated with a newly identified „SMEDI“ group of Picorna viruses"

*Am. J. Vet. Res.* **26**, 1284–1297

**Edwards, K. R.; Emmerson, M. A.; Luff, P. R.; Wells, D. E.; Muskett, J. C.; Wrathall, A. E.; Richardson, C.; Parker, B. N. J.; Thornton, D. H.: 1986**

"Efficacy of porcine parvovirus vaccines"

*Vet. Rec.* **119**, 203-205

**Ellis, J.; Krakowka, S.; Lairmore, M.; Haines, D.; Bratanich, A.; Clark, E.; Allan, G.; Konoby, C.; Hassard, L.; Meehan, B.; Martin, K.; Harding, J.; Kennedy, S.; McNeilly, F.: 1999**

"Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs"

*J. Virol.* **72**, 5262-5267

**Forman, A. J.; Lenghaus, C.; Hogg, G. G.; Hale, C. J.: 1977**

"Association of a parvovirus with an outbreak of foetal death and mummification in pigs"

*Aust. Vet. J.* **53**, 326-329

**Freshney, R. I.; Liss, A.: 1988**

"Culture of animal cells. A manual of basic technique"

2nd edition Inc, New York,

**Fujisaki, Y.; Morimoto, T.; Sugimori, T.; Suzuki, H. :1975**

"Experimental infection of pigs with porcine parvovirus"

*Natl. Ins. Anim. Health* **22**, 36–37

**Fujisaki, Y.; Ichihara, T.; Sasaki, N.; Shimizu, F.; Murakami, Y.; Sueimori, T.;**

**Sasahara, J.: 1978**

"Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus induced reproductive failure"

*Bull. Natl. Inst. Anim. Health* **77**, 12-14

**Gardner, I. A.; Carpenter, T. E.; Leontides, L.; Parsons, T. D.: 1996**

"Financial evaluation of vaccination and testing alternatives for control of parvovirus-induced reproductive failure in swine"

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **208**(6), 863-869

**Gradil, C. M.; Joo, H. S.; Molitor, T. W.: 1990**

"Persistence of porcine parvovirus in swine infected *in utero* and followed through maturity"

*J. Vet. Med. B* **37**, 309-316

**Gradil, C. M.; Harding, M. J.; Lewis, K.: 1994**

"Use of polymerase chain reaction to detect porcine parvovirus associated with swine embryos"

*Am. J. Vet. Res.* **55**(3), 344-347

**Gualandi, G. L.; Ferrari, M.; Boldini, M.; Cardati, G.; Losio, M. N.; Muratori, G.: 1992**

"The response of pregnant gilts previously given an inactivated preparation of porcine parvovirus (PPV) to challenge infection with a fully virulent PPV"

*Microbiologica* **15**(4), 391-396

**Hallauer, C.; Siegl, G.; Kronauer, G.: 1972**

"Parvoviruses as contaminants of permanent human cell lines"

III. Biological properties of the isolated viruses.

*Arch. ges. Virusforsch.* **38**, 366-382

**Harding, M. J.; Molitor, T. W.: 1988**

"Porcine parvovirus: replication in and inhibition of selected cellular functions of swine alveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes"

*Arch. Virol.* **101**, 105-117

**Harding, M. J.; Molitor, T. W.: 1992**

"A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication"

*Arch. Virol.* **123**, 323-333

**Hinrichs U.; Ohlinger V.F.; Pesch, S.; Wang, L.; Tegeler, R.; Delbeck, F. E. J.; Wendt, M.: 1999**

"Erster Nachweis einer Infektion mit dem porcinen Circovirus Typ 2 in Deutschland"

*Tierärztliche Umschau* **54**: 255-258

**Hogg, G. G.; Lenghaus, C.; Forman, A.J.: 1977**

"Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation"

*J. Comp. Pathol.* **87**(4),539-549

**Hohdatsu, T.; Baba, K.; Ide, S.; Tsuchimoto, M.; Nagano, H.; Yamagami, T.; Ymagishi, H.; Fujisaki, Y.; Matumoto, M.: 1988**

"Detection of antibodies against porcine parvovirus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay"

*Vet. Microbiol.* **17**, 11-19

**Horner, G. W.; Buddle, J. R.: 1974**

"Serological evidence of porcine parvovirus in New Zealand"

*N. Z. Vet. J.* **22**(4):61

**Horzinek, M., Mussgay, M., Maess, J., Petzoldt, K.: 1967**

"Nachweis dreier Virusarten (Schweinepest-, Adeno-, Picodnavirus) in einem als cytopathogen bezeichneten Schweinepest-Virusstamm"

*Arch. ges. Virusforsch.* **21**, 98–112

**Huysman, C. N.; van Leengoed, L. A.; de Jong, M. C.; van Osta, A. L.: 1992**

"Reproductive failure associated with porcine parvovirus in an enzootically infected pig herd"

*Vet. Rec.* **131**(22),503-506

**Jenkins, C. E.: 1992**

"An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine parvovirus in fetal tissues"

*J. Virol. Methods.* **39**(1-2), 179-184

**Johnson, R. H.; Collings, D. F.: 1969**

"Experimental infection of piglets and pregnant gilts with a parvovirus"

*Vet. Rec.* **85**(16), 446–447

**Johnson, R. H.; Collings, D. F.: 1971**

"Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus"

*Res. Vet. Sci.* **12**(6), 570-572

**Johnson, R. H.: 1973**

"Isolation of swine parvovirus in Queensland"

*Aust. Vet. J.* **49**, 157–159

**Johnson, R. H.; Donaldson-Wood, C. R.; Joo, H. S.; Allender, U. : 1976**

"Observations on the epidemiology of porcine parvovirus"

*Aust. Vet. J.* **52**(2), 80–84

**Joo, H. S.; Donaldson-Wood, C. R.; Johnson, R. H.: 1976**

"Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection"

*Arch. Virol.* **51**(1-2), 123-129

**Joo, H. S.; Donaldson-Wood, C. R.; Johnson, R. H.: 1976**

"Rapid diagnostic techniques for the detection of porcine parvovirus in mummified fetuses"

*Aust. Vet. J.* **52**, 51-52

**Joo, H. S.; Donaldson-Wood, C. R.; Johnson, R. H.: 1976**

"A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody"

*Aust. Vet. J.* **52**, 422-424

**Joo, H. S.; Donaldson-Wood, C. R.; Johnson, R. H.: 1976**

"Pathogenesis of porcine parvovirus infection: pathology and immunofluorescence in the fetus"

*J. Comp. Pathol.* **87**, 383-391

**Joo, H. S.; Johnson, R. H.: 1977**

"Serological response in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus"

*Aust. Vet. J.* **53**, 550-552

**Joo, H. S.; Johnson, R. H.; Watson, D. L.: 1978**

"Serological procedures to determine time of infection of pigs with porcine parvovirus"

*Aust. Vet. J.* **54**, 125-127

**Kamstrup, S.; Langeveld, J.; Bøtner, A.; Nielsen, J.; Schaaper, W. M. M.; Boshuizen, R. S.; Casal, J. I.; Højrup, P.; Vela, C.; Meloen, R.; Dalsgaard, K.: 1998**

"Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides"

*Virus Res.* **53**(2), 163-173

**Kennedy, S.; Mofett, D.; McNeilly, F.; Meehan, B.; Ellis, J.; Krakowka, S.; Allan, G.M.: 2000**

"Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus"

*J. Comp. Pathol.* **122**, 9-24

**Kirkbride, C. A.; McAdaragh, J. P.: 1978**

"Infectious agents associated with fetal and early neonatal death and abortion in swine"

*J. Am. vet. med. Ass.* **172**, 480-483

**Krakowka, S.; Ellis J. A.; Meehan, B.; Kennedy, S.; McNeilly, F.; Allan, G.: 2000**

"Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus"

*Vet. Pathol.* **37**, 254-263

**Kresse, J. I.; Taylor, W. D.; Stewart, W. W.; Eernisse, K. A.: 1985**

"Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions"

*Vet. Microbiol.* **10**, 525-531

**Kuiper, A.: 1985**

"Epizootologie und Erfahrungen mit der Impfprophylaxe des parvovirusbedingten SMEDI-Syndroms"

*Prakt. Tierarzt* **66**, 420-422

**Lager, K. M.; Mengeling, W. L.: 1994**

"Procine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets"  
*J. Vet. Diagn. Invest.* **6**, 359-359

**Lenghaus, C.; Forman, A. J.; Hale, C. J.: 1978**

"Experimental infection of 35, 50 and 60 day old pig foetuses with porcine parvovirus"  
*Aus. Vet. J.* **54**, 418-422

**Lucas, M. H.; Cartwright, S. F.; Wrathall, A. E.: 1974**

"Genital infection of pigs with porcine parvovirus"  
*J. Comp. Path.* **85**, 347-350

**Madsen, E. S.; Madsen, K. G.; Nielsen, J.; Jensen, M. H.; Lei, J. C.; Have, P.: 1997**

"Detection of antibodies against porcine parvovirus nonstructural protein NS 1 may distinguish between vaccinated and infected pigs"  
*Vet. Microbiol.* **54**, 1-16

**Mahnel, H.: 1965**

"Virus-like particles from hog cholera infected tissue cultures and demonstrated in the electron microscope"  
*FAO/OIE Meeting on hog cholera and African swine fever, Rome, Italy, June*

**Mankertz, A.; Domingo, M.; Folch, J. M.; LeCann, P.; Jestin, A.; Segalés, J.; Chmielewicz, B.; Plana-Durán, J.; Soike, D.: 2000**

"Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France"  
*Virus Res.* **66**, 65-77

**Martinez, C.; Dalsgaard, K.; López de Turiso, J. A.; Cortés, E.; Vela, C.; Casal, J. I.: 1992**

"Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity"  
*Vaccine* **10**(10), 684-690

**Mayr, A., Mahnel, H.: 1964**

"Züchtung von Schweinepestvirus in Schweinenieren-Kulturen mit cytopathogenem Effekt"  
*Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **195**, 157-166

**Mayr, A., Mahnel, H.: 1966**

"Weitere Untersuchungen über die Züchtung von Schweinepestvirus in Zellkulturen mit cytopathogenem Effekt"  
*Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **199**, 399-407

**Mayr, A., Bachmann, P. A., Sheffy, B. E., Siegl, G.: 1968**

"Characterization of a small porcine DNA virus"  
*Arch. ges. Virusforsch.* **25**(1), 38-51

**Mayr, A. et al.: 1974**

Virologische Arbeitsmethoden. 1. Aufl.  
Bd. 1 Zellkulturen-Bebrütete Hühnereier-Versuchstiere  
*Gustav Fischer Verlag, Jena*, S. 311, 39

**Mengeling, W. L.: 1972**

"Porzine Parvovirus: Properties and prevalence of a strain isolated in the United States"  
*Am. J. Vet. Res.* **33**, 2239-2248

**Mengeling, W. L.: 1975**

"Porzine parvovirus: Frequency of naturally occurring transplacental infection and viral contamination of fetal porcine kidney cell cultures"  
*Am. J. Vet. Res.* **36**(1), 41-44

**Mengeling, W. L.: 1978**

"Prevalence of porcine parvovirus-induced reproductive failure: An abattoir study"  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **172**, 1291-1294

**Mengeling, W. L.: 1979**

"Prenatal infection following maternal exposure to porcine parvovirus on either the seventh or fourteenth day of gestation"  
*Can. J. Comp. Med.* **43**(1), 106-109

**Mengeling, W. L.: 1999**

"Porcine Parvovirus"  
in "Diseases of Swine" 8<sup>th</sup> Edition  
Straw, B. E.; D'Allaire, S.; Mengeling, W. L.; Taylor, D. J.  
Blackwell Science, Iowa State University Press, Ames Iowa 187-200

**Mengeling, W. L.; Cutlip, R. C.: 1975**

"Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus"  
*Am. J. Vet. Res.* **36**(08), 1173-1177

**Mengeling, W. L.; Cutlip, R. C.: 1975**

"Experimentally induced infection of neonatal swine with porcine parvovirus"  
*Am. J. Vet. Res.* **36**(08), 1179-1182

**Mengeling, W. L.; Cutlip, R. C.: 1976**

"Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus"  
*Am. J. Vet. Res.* **37**(12), 1393-1400

**Mengeling, W. L.; Paul, S.: 1981**

"Reproductive performance of gilts exposed to porcine parvovirus at 56 or 70 days of gestation"  
*Am. J. Vet. Res.* **12**(12), 2074-2076

**Mengeling, W. L.; Paul, S.: 1986**

"Interepizootic survival of porcine parvovirus"  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **188**, 1293-1295

**Mengeling, W. L.; Cutlip, R. C.; Barnett, D.: 1978**

"Porcine parvovirus: Pathogenesis, prevalence, and prophylaxis"  
*Proc. Int. Congr. Pig. Vet. Soc.* **5**, KA 15

- Mengeling, W. L.; Brown, T. T.; Paul, P. S.; Gutekunst, E. E.: 1979**  
"Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus induced reproductive failure"  
*Am. J. Vet. Res.* 40, 204-207
- Mengeling, W. L.; Paul, P. S.; Brown, T. T. Jr.: 1980**  
"Transplacental infection and embryonic death following maternal exposure to porcine parvovirus near the time of conception"  
*Arch. Virol.* 65, 55-62
- Mengeling, W. L., Paul, P. S.; Lager, K. M.: 1993**  
"Virus-induced maternal reproductive failure of swine"  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1, 203(9), 1268-1272
- Molitor, T. W.; Joo, H. S.; Collett, M. S.: 1983**  
"Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides"  
*J. Virol.* 45(2), 842-854
- Molitor, T. W.; Joo, H. S.; Collett, M. S.: 1983**  
"Porcine Parvovirus DNA: Characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates"  
*Virology* 137, 241-254
- Molitor T. W.; Joo, H. S.; Collett, M. S.: 1984**  
"Porcine parvovirus DNA: Characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates"  
*Virology* 137, 241-254
- Molitor T. W.; Joo, H. S.; Collett, M. S.: 1985**  
"Identification and characterization of a porcine parvovirus non-structural polypeptide"  
*J. Virol.* 55, 554-559
- Molitor, T. W.; Joo, H. S.: 1990**  
"Clinical features of porcine-parvovirus-related disease and its diagnosis"  
In *Handbook of Parvoviruses*, vol II. (Tjissen P., ed.) Pp. 135-150. Boca Raton: CRC Press
- Molitor, T. W.; Oraveerakul, K.; Zhang, Q. Q.; Choi, C. S.; Ludemann, L. R.: 1991**  
"Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus"  
*J. Virol. Methods.* 32(2), 201-211
- Morimoto, T.; Fujisaki, Y.; Ito, Y.; Tanaka, Y.: 1972**  
"Biological and physiochemical properties of porcine parvovirus recovered from stillborn piglets"  
*Nat. Ins. Anim. Health Quart. (Tokyo)* 12, 137-144
- Morimoto, T.; Kugori, H.; Miura, Y.; Sugimori, T.; Fujisaki, Y.: 1972**  
"Isolation of Japanese encephalitis virus and a hemagglutinating DNA Virus from the brain in swine fetuses naturally infected with porcine parvovirus"  
*Natl. Inst. Anim. Health. Q.(Tokyo)* 12, 137-144

**Morozov, I.; Sirinarumitr, T.; Sorden, D.; Halbur, P.; Morgan, M. K.; Yoon, K.-J.; Paul, P. S.: 1998**

"Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome"

*J. Clin. Microbiol.* **36**, 2535-2541

**Murphy, F. A.; Fauquet, C. M.; Bishop, D. H. L.; Ghabrial, S. S.; Jarvis, A. W.; Martelli, G. P.; Mayo, M. A.; Summers, M. D.: 1995**

"Virus taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses; Murphy FA, Fauquet SM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD, editors. Wien, Austria: Springer Verlag, 169-178

**Muzyczka, N; Berns, K.I.: 2001**

*Parvoviridae: The Viruses and Their Replication.*

in: *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> ed. Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2327-2359

**Naeger, L. K.; Salome, N.; Pintel, D. J.: 1993**

"NS 2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells"

*J. Virol.* **67**, 1034-1043

**Narita, M.; Inui, S.; Kawakami, Y.; Kitamura, K.; Maeda, A.: 1975**

"Histopathological changes of the brain in swine fetuses naturally infected with porcine parvovirus-induced reproductive disease in pigs"

*Natl. Inst. Anim. Health. Q.(Tokyo)* **15**, 24-28

**Nöckler, M.; Fichtner, D.; Klähn, J.; Leopoldt, D.: 1985**

"Zur Feststellung von porzinen Parvovirus-Infektionen in Schweinebeständen"

*Mh. Vet. Med.* **40**, 673-675

**Nielsen, J. N.; Armstrong, J. P.; Turek, J. J.; Nielsen, N. C.: 1989**

"Etiologic studies on late-term swine abortions"

*J. vet. Diagn. Invest.* **1**, 160-164

**Nielsen, J; Rønsholt, L.; Sørensen, K. J.:1991**

"Experimental in utero infection of pig foetuses with porcine parvovirus (PPV)"

*Vet. Microbiol.* **28**(1), 1-11

**Obaldia, N. 3rd: 1991**

"Outbreak of porcine parvovirus disease in Panama"

*Trop. Anim. Health Prod.* **23**(3), 181-185

**Oraveerakul, K.; Choi, C. S.; Molitor, T. W.: 1990**

"Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization"

*J. Vet. Diagn. Invest.* **2**(2), 85-91

**Oraveerakul, K.; Choi, C. S.; Molitor, T. W.: 1992**

"Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells"

*J. Virol.* **66**(2), 715-722

**Oraveerakul, K.; Choi, C. S.; Molitor, T. W.: 1993**

"Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine"

*Arch. Virol.* **130**, 377-389

**Parrish, C. R.; Have, P.; Foreyt, W. J.; Evermann, J. F.; Senda, M.; Carmichael, L. E.: 1988**

"The Global spread and replacement of canine parvovirus strains"

*J. Gen. Virol.* **69**, 1111-1116

**Parrish, C. R.; Aquadro, C. F.; Strassheim, M. L.; Evermann, J. F.; Sgro, J. Y.; Mohammed, H. O.: 1991**

"Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus"

*J. Virol.* **65**, 6544-6552

**Parke, C. R.; Burgess, G. W.: 1993**

"An economic assessment of porcine parvovirus vaccination"

*Austr. Vet. J.* **70**, 177-180

**Paul, P. S.; Mengeling, W. L., Brown, T. T.: 1979**

"Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages"

*Infect. Immun.* **25**(3), 1003-1007

**Paul, P. S.; Mengeling, W. L.: 1980**

"Evaluation of a modified live-virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine"

*Am. J. Vet. Res.* **41**(12), 2007-2011

**Paul, P. S.; Mengeling, W. L., Brown, T. T.: 1980**

"Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus"

*Am. J. Vet. Res.* **41**(9), 1368-1371

**Plonait, H.; Bachmann, P. A.; Werner, J.; Alt, M.: 1985**

"Untersuchungen über den Verlauf der Parvovirusinfektion in geschlossenen Schweinebeständen sowie das Infektionsrisiko durch künstliche Besamung"

*Tierärztl. Umsch.* **40**, 907-914

**Plonait, H.; Bickhardt, K.: 1997**

"Lehrbuch der Schweinekrankheiten"

*Paul Parey Verlag*, Berlin und Hamburg, S.450-460

**Pollock, R. V. H.; Carmichael, L. E.: 1982**

"Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline and interference with vaccination"

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **180**, 37-42

**Pratelli, A., Cavalli, A., Martella, V., Tempesta, M., Decaro, N., Carmichael, L. E., Buonavoglia, C.: 2001**

"Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine"

*Clin Diagn Lab Immunol* **8**(3),612-5

**Ranz, A. I.; Manclús, J. J.; Díaz-Aroca, E.; Casal, J. I.: 1989**

"Porzine parvovirus: DNA sequence and genome organisation"

*J. gen. Virol.* **70**, 2541-2553

**Reddy, V. S.; Natarajan, P.; Okerberg, B.; Damodaran, K. L.; Morteon R. T.; Brooks III, C. L.; Johnson, J. E.: (2001)**

"Virus Particle Explorer (VIPER), a Website for virus capsid structures and their computational analysis"

*J. Virol.* **75**,11943-11947

**Redman, D. R.; Bohl, E. H.; Ferguson, L. C.: 1974**

"Porzine parvovirus: natural and experimental infections of the porzine fetus and prevalence in mature swine"

*Infect. Immun.* **10**(4):718-723

**Ridpath, J. F.; Mengeling, W. L.: 1988**

"Uptake of porzine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors"

*Virus Res.* **10**, 17-28

**Rivera, E.; Concha, C.; Braganca, M.; Gunnarsson, A.; Karlsson, K. A.: 1995**

"Acute outbreak of porzine parvovirus infection in Mozambique"

*Trop. Anim. Health Prod.* **27**(4), 217-20

**Rivera, E.; Daggfeldt, A.; Hu, S.: 2003**

"Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porzine parvovirus and *Erysipelothrix rhusiopathiae*"

*Vet Immunol Immunopathol.* **91**, 19-27

**Rodeffer, H. E.; Leman, A. D.; Dunne, H. W.; Cropper, M.; Sprecher, D. J.: 1975**

"Reproductive failure in swine associated with maternal seroconversion for porzine parvovirus"

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* **166**(10), 991-992

**Rossmann, M. G.: 1989**

"The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance"

*J. Bio.. Chem.* **264**, 14587-14590

**Rott, R.: 1981**

"Parvoviren bei Haustieren"

*Prakt. Tierarzt* **1**, 9-20

**Ruckerbauer, G. M.; Dulac, G. C.; Boulanger, P.: 1978**

"Demonstration of parvovirus in Canadian swine and antigenic relationships with isolates from other countries"

*Can. J. Comp. Med.* **42**, 278-285

**Rüsse, I.: 1991**

"Frühgravidität, Implantation und Plazentation"  
in "Lehrbuch der Embryologie der Haustiere"

Rüsse, I.; Sinowatz, F.

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, 177-185

**Salvino, R.; Skiadopoulos, M.; Faust, E. A.; Tam, P.; Shade, R. O.; Astell, C.R.: 1991**

"Two spatially distinct genetic elements constitute a bipartite DNA replication origin in the minute virus of mice genome"

*J. Virol.* **65**, 1352-1363

**Schlehofer, J. R.: 1994**

"The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses"

*Mutat Res.* **305**(2):303-13

**Shahrabadi, M. S.; Lynch J.; Cho, H. J.; Marusyk, R. G.: 1982**

"Studies on the multiplication of a porcine parvovirus"

*Vet. Microbiol.* **7**(2), 117-125

**Siegl, G.: 1976**

In "The Parvoviruses", Springer Verlag, Wien New York, 47-52

**Simpson, A. A.; Hébert, B.; Sullivan, G. M.; Parrish, C. R.; Zadori, Z.; Tijssen, P.;  
Rossmann, M. G.: 2002**

"The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses"

*J. Mol. Biol.* **315**, 1189-1198

**Soares, R. M.; Durigon, E. L.; Bersano, J. G.; Richtzenhain, L. J.: 1998**

"Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved non-structural protein gene, NS-1"

*J. Virol. Methods* **78**, 191-198

**Sørensen, K. J.; Askaa, J.; Dalsgaard, K.: 1980**

"Assay for antibody in pig fetuses infected with porcine parvovirus"

*Acta. Vet. Scand.* **21**(3), 312-317

**Sørensen, K. J.; Askaa, J.: 1981**

"Fetal Infection with porcine parvovirus in herds with reproductive failure"

*Acta vet. scand.* **22**, 162-170

**Tattersall, P.: 1972**

"Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth"

*J. Virol.* **10**, 586-590

**Tattersall, P.; Ward, D. C.:1976**

"Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA"  
*Nature* **263**, 106-109

**Thacker, B. J.; Leman, A. D.; Hürtgen, J. P.; Sauber, T. E.; Joo, H. S.: 1981**

"Survey of porcine parvovirus in swine fetuses and their dams at a Minnesota abattoir"  
*Am. J. Vet. Res.* **42**, 865–867

**Truyen, U.; Gruenberg, A.; Chang, S. F.; Obermaier, B.; Veijalainen, P.; Parrish, C. R.:1995**

"Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range *in vivo*"  
*J. Virol.* **69**, 4702-4710

**Truyen, U.; Evermann, J. F.; Vieler, E.; Parrish, C. R.: 1996**

"Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range"  
*Virology* **215**, 186-189

**Van Leengoed, L. A.; Vos, J.; Gruys, E.; Rondhuis, P.; Brand, A.: 1983**

"Porcine Parvovirus infection: review and diagnosis in a sow herd with reproductive failure"  
*Vet. Q.* **5**(3), 131-141

**Vannier, P.; Tillon, J. P.; Cariolet, R.; Madec, F.: 1984**

A seroepizootiological study of Parvovirus in pig herds  
*Zbl. Vet. Med. B.* **31**, 36-45

**Vasudevacharya, J.; Basak, S.; Srinivas, R. V.; Compans, R. W.: 1990**

"The complete nucleotide sequence of an infectious clone of porcine parvovirus, strain NADL-2"  
*Virology* **178**(2), 611-616

**Vasudevacharya, J.; Compans, R. W.: 1992**

"The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus"  
*Virology* **187**, 515-524

**Waldvogel, A. S.; Broll, S.; Roskopf, M.; Schwyzer, M.; Pospischil, A.: 1995**

"Diagnosis of fetal infection with porcine parvovirus by *in situ* hybridisation"  
*Vet. Microbiol.* **47**(3-4); 377-385

**Wang, D.; Yuan, W.; Davis, I.; Parrish, C. R.: 1998**

"Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus"  
*Virology* **240**, 273-281

**Whitaker, H. K.; Neu, S. M.; Pace, L. W.: 1990**

Parvovirus infection in pigs with exsudative skin disease"  
*J. Vet. Diagn. Invest.* **2**, 244-246

**Wilson, G. M.; Jondal, H. K.; Yeung, D. E.; Chen, W.; Astell, C. R.: 1991**

"Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activity"  
*Virology* **185**, 90-98

**Wrathall, A. E.: 1988**

"Field trials of an inactivated oil-emulsion porcine parvovirus vaccine in British pig herds"  
*Vet. Rec.* **122**, 411-418

**Wrathall, A. E.; Mengeling, W. L.: 1979**

"Effect of inseminating seropositive gilts with semen containing porcine parvovirus"  
*Br. Vet. J.* **135**(5), 420-425

**Wrathall, A. E.; Wells, D. E.; Cartwright, S. F.; Frerichs, G. N.: 1984**

"An inactivated, oil-emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure"  
*Res. Vet. Sci.* **36**(2), 136-143

**Yasuhara, H.; Matsui, O.; Hirahara, T.; Ohgitani, T.; Tanaka, M.; Kodama, K.; Nakai, M.; Sasaki, N.: 1989**

"Characterization of a parvovirus isolated from the diarrheic feces of a pig"  
*Nippon Juigaku Zasshi.* **51**(2), 337-344

**Zanoni, R. G.; Henn, V.; Rutishauser, U. P.; Wyler, R.: 1984**

"Häufigkeit der porcinen Parvovirusinfektion in der Schweiz und ein neuer Virusnachweis mittels Immunelektronenmikroskopie"  
*Zbl. Vet. Med. B* **31**, 729-742

## Lebenslauf

Name:	Zimmermann Pia
Geburtstag:	18.07.1974
Geburtsort:	München-Pasing
Eltern:	Klaus Helmut Zimmermann Renata Zimmermann, geb. Bacigalupo
1981 – 1984	Besuch der Regina-Ullmann-Grundschule in München
1984 – 1994	Besuch des Luitpold-Gymnasiums in München
1. Juli 1994	Allgemeine Hochschulreife
September 1994 – September 1995	Lehre als Tierarzhelferin bei Dres. Wiesner und Heubeck in München
November 1995	Beginn des Tiermedizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
September 1998 – Februar 1999	Besuch der Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, ENVL
März 1999	Weiterführung des Tiermedizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
05.03.2001	Abschluß des dritten Staatsexamens
18.4.2001	Approbation als Tierärztin
April 2001	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit im Institut für medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der LMU München
September 2001	Wechseln mit Prof. Truyen an den Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub

---

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München und am Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. angefertigt.

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen bedanken, der die Durchführung der Dissertation ermöglichte und unterstützte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Sandra Essbauer, Dr. Klaus Geissler, Dr. Antonie Neubauer und Dr. Ben Etschmann für ihre jederzeit gewährte fachliche Unterstützung bedanken.

Dr. Mathias Ritzmann möchte ich ganz herzlich für seine Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Proben danken. Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl Heinritzi und allen anderen Mitarbeitern der II.Medizinischen Tierklinik danken.

Prof. Dr. Hans-Joachim Selbitz und dem Impfstoffwerk Dessau-Tornau möchte ich sehr danken für das Interesse und Finanzierung an diesem Thema, die gewährte Unterstützung und der Überlassung zweier Isolate. Mein Dank gilt auch Dr. Volker Herwig.

Dana Wenzel, Andrea Jahnke, Ortrun Lipp und Katharina von Dewitz danke ich sehr herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, freundschaftliche Zusammenarbeit und Gesellschaft.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Dr. Christina Ziegler und Judith Staber, für ihre Freundschaft und dafür, dass sie mir auch in schwierigen Situationen immer zur Seite gestanden haben.

Meinen lieben Freunden, insbesondere Martina, Marco, Koka, André und Ingo, möchte ich für ihre Freundschaft, ihr Verständnis und ihre Hilfe bei Formatierungs- und anderen kleineren Problemen, danken. Corinna möchte ich für das durchsehen des Skripts auf Rechtschreibung und Grammatik danken.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern und meinem Bruder Alexander bedanken. Ihre Unterstützung und ihr Verständnis haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

---