

Aus dem
Institut für Virologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
bioScreen,
European Veterinary Disease Management Center GmbH, Münster

Einflussfaktoren bei der Etablierung, Validierung und praktischen Umsetzung von
Testverfahren zur Mehrparameterdiagnostik von Infektionskrankheiten beim Schwein am
Beispiel von Flüssigchip-Technologie und Multiplex-PCR

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Wiebke Schulze Eskinig

aus Coesfeld

Leipzig, 2008

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Hermann Müller
Dr. Volker Ohlinger

Gutachter: Prof. Dr. Hermann Müller, Institut für Virologie,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Uwe Truyen,
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Mathias Ritzmann, Klinik für Schweine,
Veterinärmedizinische Universität Wien

Dr. Volker Ohlinger, bioScreen GmbH, Münster

Tag der Verteidigung: 19.08.2008

Meinem Mann
und
meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Mehrparameterverfahren in der Infektionsdiagnostik.....	3
2.2	Der respiratorische Krankheitskomplex des Schweins	4
2.3	Diagnostische Methoden	5
2.3.1	Serologische Nachweisverfahren	5
2.3.1.1	Die Chip-Technologie.....	6
2.3.2	Verfahren zum Erregernachweis	10
2.3.2.1	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	10
2.3.2.2	Technische Anforderungen einer Multiplex-PCR	11
3	Material und Methoden	13
3.1	Probenmaterial.....	13
3.2	Referenzstämme.....	13
3.3	Vorbereitung und Lagerung des Probenmaterials	14
3.4	Detektion von Antikörpern gegen PCV2 mittels Flüssigchip- Technologie	15
3.4.1	Das LiquiChip®-System.....	15
3.4.2	Puffer	16
3.4.3	PCV2 ORF2-Protein für die Kopplung	17
3.4.4	Kopplung des Proteins an LiquiChip®-Beads.....	19
3.4.5	Bestimmung der Anzahl an Beads in gekoppelter Lösung	20
3.4.6	Detektionsantikörper	21
3.4.7	Reaktionsansatz für die Antikörperdetektion im LiquiChip®-System.....	21
3.4.8	Indirekter Fluoreszenz Antikörper Test (IFAT) zum Nachweis und zur Quantifizierung von Antikörpern gegen PCV2	22
3.5	Multiplex-PCR zur Amplifikation von Genomfragmenten aus PCV2, FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2 in einem Reaktionsansatz	23
3.5.1	Extraktion der Nukleinsäuren.....	23
3.5.2	Anzucht der Referenzstämme	24
3.5.3	Virusquantifizierung	25
3.5.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	25
3.5.4.1	Primer für die Einparameter-PCR und die Multiplex- PCR.....	25
3.5.4.2	Durchführung der PCR.....	27
3.5.4.3	PCRs der Routinediagnostik	27
3.5.4.4	Reverse Transkription	28
3.5.4.5	Multiplex-PCR	28
3.5.4.6	Multiplex-RT-PCR	29
3.5.5	Detektion der PCR-Produkte	29
3.5.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	30

3.5.7	Sequenzanalysen der PCR-Produkte	31
3.5.8	Aufreinigung von DNA mittels RNase-Verdau	32
3.5.9	Reinigung von PCR-Produkten und Nukleinsäuren	33
3.6	Verbrauchsmaterialien	33
3.7	Geräte	33
3.8	Aqua dest.	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Detektion von Antikörpern gegen PCV2 mittels Flüssigchip-Technologie	34
4.1.1	Quantifizierung des Gesamtproteingehaltes	34
4.1.2	Funktionsprüfung der Beads	34
4.1.3	Methodenetablierung mittels definierter Versuchsseren	37
4.1.4	Optimierungsversuche	39
4.1.4.1	Untersuchung des Einflusses von Waschsritten	39
4.1.4.2	Titration definierter Seren zur Bestimmung der optimalen Testverdünnung	42
4.1.4.3	Titration des biotinylierten Detektionsantikörpers	42
4.1.4.4	Vergleich verschiedener Puffer zur Optimierung der Fluoreszenzwerte	43
4.1.5	Vergleichende Untersuchung von Feldseren im IFAT und im LiquiChip®-System	44
4.1.6	6xHis-Thioredoxin-System als interne Kontrolle	46
4.1.7	Versuche zur Optimierung der Proteinkopplung an Carboxy-Beads und zur Verbesserung der Spezifität	47
4.1.8	Untersuchung von Reaktionskomponenten auf unspezifische Bindungskapazität	49
4.1.9	Inkubationsversuche zur Blockung unspezifischer Bindungsreaktionen	51
4.2	Multiplex-PCR zur simultanen Amplifikation von Genomfragmenten aus PCV2, FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2	59
4.2.1	Quantifizierung des Virusgehalts der Referenzisolate	59
4.2.2	Gehalt der extrahierten Nukleinsäuren an viralen Genomäquivalenten	59
4.2.3	Etablierungsversuche für die Multiplex-PCR	59
4.2.3.1	Funktionsüberprüfung	59
4.2.3.1.1	Multiplex-RT	59
4.2.3.1.2	Untersuchung der Einzelparameter mittels reverser Transkription und PCR unter Multiplexbedingungen	60
4.2.3.1.3	Untersuchung von Mehrfachtemplates mittels reverser Transkription und Multiplex-PCR	61
4.2.3.2	Optimierung der Multiplex-PCR	62
4.2.3.3	Validität der etablierten Multiplex-PCR	64

	4.2.3.3.1	Spezifität	64
	4.2.3.3.2	Sensitivität	65
	4.2.3.3.3	Einfluss von porziner Hintergrund-RNA.....	68
	4.2.3.3.4	Einsatz der Multiplex-PCR bei der Untersuchung von Probenmaterial aus der Diagnostik	70
	4.2.3.4	Schwierigkeiten bei der Auswertung der Multiplex-PCR	72
4.2.4		Multiplex-RT-PCR	75
	4.2.4.1	Funktionsüberprüfung	75
	4.2.4.2	Effizienz der PCV2-Amplifikation.....	77
	4.2.4.2.1	Inhibition der PCV2-Amplifikation durch RNA.....	77
	4.2.4.2.2	Inhibition der PCV2-Amplifikation durch Komponenten des Reaktionsansatzes	77
5	Diskussion		79
	5.1	Detektion von Antikörpern gegen PCV2 mittels Flüssigchip- Technologie	79
	5.2	Multiplex-PCR zur simultanen Amplifikation von Genomfragmenten aus PCV2, FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2.....	92
6	Zusammenfassung		103
7	Summary		105
8	Literaturverzeichnis		107
9	Anhang		118
	9.1	PCR-Primer.....	118
	9.1.1	Primer der PCRs aus der Routinediagnostik	118
	9.1.2	Primer für die Multiplex-PCR	119
	9.2	Zusammensetzung der Reaktionsansätze für RT-Reaktionen und PCRs.....	120
	9.2.1	RT-Reaktionen.....	120
	9.2.2	Multiplex-PCR	121
	9.2.3	Multiplex-RT-PCR	122
	9.2.4	Sequenzierungs-PCRs	123
	9.3	Verbrauchsmaterialien	124
	9.4	Alignments der sequenzierten Multiplex-PCR-Produkte	125
	9.4.1	Porzines Circovirus Typ2	125
	9.4.2	PRRSV-Typ 1	128
	9.4.3	PRRSV-Typ 2	130
	9.4.4	Porcines Influenzavirus.....	134

Abkürzungen

A	Adenosin
ad	bis zu (auffüllen auf)
Ak	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Anson-Einheit; eine Anson-Einheit ist die Enzym-Menge, die Haemoglobin spaltet, und die dabei pro Minute entstehende Menge des TCA-löslichen Produktes die gleiche Aktivität mit Folin-Chiocalteu`s Phenol-Reagenz zeigt wie 1 µmol Tyrosin (ANSON 1938).
Biotin-Anti-Kanin-Ak	Ziegenserum gegen Kaninchen-IgGs, biotin-konjugiert
Biotin-Anti-Maus-Ak	Ziegenserum gegen Maus-IgGs, biotin-konjugiert,
Biotin-Anti-Schwein-Ak	Ziegenserum gegen Schweine-IgGs, biotin-konjugiert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BCA	Bicinchonin Säure
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA, durch reverse Transkription aus RNA hergestellt
cm	Zentimeter
CTP	Cytosintriphosphat
TTP	Thymintriphosphat
ddNTPs	Dideoxynukleosidtriphosphate
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Eq	Äquivalent
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLUAVsw	Porzines Influenza A Virus (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES 2006)
FS	Feldserum
g	Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m/s}^2$
gr	Gramm
G	Guanin
GCP-Studie	nach Prinzipien der Good Clinical Practice durchgeführte Studie
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
Hz	Herz (Frequenz)
IE	Internationale Einheiten

Abkürzungen und Definitionen

IFAT	Indirekter Fluoreszenz Antikörper Test
IgG	Immunglobulin G
IPMA	Immunperoxidase Monolayer Assay
K ⁺	Kalium
Kat.Nr.	Katalognummer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L.i.-mAk	monoklonaler Antikörper gegen <i>Lawsonia intracellularis</i> aus der Maus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar = Konzentration von 1 Mikromol pro Liter
µmol	Mikromol
M	molar = Konzentration von 1 Mol pro Liter
mAU	milli Anson Einheit
mbar	Millibar
MFI	Median Fluorescence Intensity = Mittlerer Fluoreszenzwert; Einheit der LiquiChip [®] -Signale
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar = Konzentration von 1 Millimol pro Liter
mmol	Millimol
MW	Molekulargewichtsmarker
NEAAs	Non Essential Amino Acids
NK	Negativkontrolle, enthält Aqua dest. anstelle von Template
nm	Nanometer
ORF	offener Leserahmen, Open Reading Frame
PAMs	porzine Alveolarmakrophagen
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PCV1	Porzines Circovirus Typ 1
PCV2	Porzines Circovirus Typ 2
PCV2-Kaninchen-pAk	polyklonaler Antikörper gegen PCV2 aus dem Kaninchen
PCV2-mAk	monoklonaler Antikörper gegen PCV2 ORF2 aus der Maus
PDNS	Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome
PK	Positivkontrolle, enthält Template eines bzw. aller Referenzisolate der vier Parameter

pmol	Pikomol
PMWS	Porcine Multisystemic Wasting Syndrome
PRDC	Porcine respiratory disease complex
PRRSV	<i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute = Umdrehungen pro Minute
RS	Referenzserum, -probe
RT	Reverse Transkription,
RT-PCR	Kombination einer PCR mit vorgeschalteter Reverser Transkription
s	Sekunden
SA-PE	Streptavidin-R-Phycoerythrin
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEC	Size Exclusion Chromatography
SNT	Serum-Neutralisationstest
SOP	Standard operation procedure
T	Thymin
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50%, Einheit der Endpunktverdünnungsmethode
T _m	Schmelztemperatur
U	Units
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
VLP	Virus-like Particles
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit

Definitionen

6xHis-Thioredoxin Anti-Thioredoxin-Ak	6xHis-Thioredoxin-Protein mit Tag100-Verlängerung Antikörper gegen die tag100 Verlängerung des 6xHis-Thioredoxin
Capture-Molekül	auf der Oberfläche der LiquiChip®-Beads immobilisiertes Molekül, das komplementär zu dem Zielmolekül ist (Protein, DNA-Sequenz etc.)
externe PCR externer Primer Feldseren Monitoring	PCR, der eine nested bzw. semi-nested PCR folgt Primer der externen PCR, äußerer Primer Schweineseren aus GCP-Studien Systematisches Beobachten, Analysieren und Auswerten einer bestimmten Situation (DUDEN 2004)
Multiplexing	simultane Messung mehrerer Analyten in demselben Versuchsansatz (BIAGINI et al. 2004a)
Multiplex-PCR	PCR mit mehreren speziellen Multiplex-Primern und Multiplex-Reagenzien
Multiplex-RT-PCR	Multiplex-PCR mit Enzym für die Reverse Transkription in einem Ansatz kombiniert
nested PCR	auf eine externe PCR folgende PCR, deren Primer innerhalb des zuvor entstandenen Amplifikates binden
nested Primer Primer	Primer der nested PCR, innerer Primer Oligonukleotid, 15-35 Nukleotide, Anlagerungspunkt für die Reverse Transkriptase und die DNA Polymerase
semi-nested PCR	ähnlich nested PCR, jedoch wird ein externer Primer beibehalten und mit einem nested Primer kombiniert
Template	in einer PCR zu amplifizierende (c)DNA-Sequenz

1 Einleitung und Zielsetzung

In der Schweineproduktion nehmen Krankheitsgeschehen, an denen mehr als ein Pathogen beteiligt ist, stark zu. Vor allem im Bereich der Atemwegserkrankung lassen sich virale Erreger wie z.B. das Porzine Circovirus Typ 2 und das Virus des Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome oft zusammen detektieren (PESCH et al. 2003). Die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Pathogene verstärkt in der Regel die Krankheitserscheinungen. Die klinischen Erscheinungen erlauben häufig keine Rückschlüsse auf die ursächlichen Erreger, so dass der labordiagnostischen Erregerbestimmung entscheidende Bedeutung zukommt, um gezielt therapieren zu können. Auch der Nachweis von Antikörpern unterstützt die Behandlung und Prophylaxe von multifaktoriellen Erkrankungen, da er vor allem für das Monitoring und zur Abklärung der Immunitätslage in den Schweinebeständen geeignet ist. Aus diesen Gründen haben Nachweismethoden mit der Möglichkeit, Probenmaterial auf mehrere Pathogene respektive pathogenspezifische Antikörper gleichzeitig zu untersuchen, sowohl für den behandelnden Tierarzt als auch für das Labor Vorteile in Hinblick auf Schnelligkeit, Kosteneffizienz und Erfassung des relevanten Erregerspektrums.

Methoden zum Nachweis erregerspezifischer Genomfragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion sind mittlerweile in der Diagnostik von Schweinekrankheiten weit verbreitet. Neben dem Nachweis des Vorhandenseins bestimmter Erreger ermöglichen Unterschiede in der Genomsequenz vielfach auch nach bestimmten Erregervarianten zu differenzieren. So können zum Beispiel *Escherichia coli* (FRANCK et al. 1998), *Clostridium perfringens* (MEER U. SONGER 1997) und *Streptococcus suis* (WISSELINK et al. 2002) genotypisiert oder einem Toxintyp zugeordnet werden. Die Genotypisierung wird ebenfalls bei einer Vielzahl viraler Infektionserreger beim Schwein eingesetzt. So können PRRSV, PRCV / TGEV, porcine Entero- und Teschoviren genotypisiert oder Influenza A Virus beim Schwein mittels PCR-Verfahren typisiert werden. Neben der Charakterisierung bestimmter Varianten von Infektionserregern ist es möglich, ein PCR-Verfahren zu entwickeln, mit dem Genomfragmente mehrerer Pathogene, z.B. der viralen Erreger von Atemwegserkrankungen, in einem Ansatz nachgewiesen werden können. Für die Etablierung solcher Verfahren ist es wichtig zu wissen, wie viele Parameter spezifisch und sensitiv nachgewiesen werden können. Wenn nicht das gesamte Spektrum der Erreger nachweisbar ist, muss eine fachlich sinnvolle Auswahl der nachzuweisenden Pathogene erfolgen, um eine praxisrelevante Interpretation der Ergebnisse durch den Tierarzt zu ermöglichen.

In Ergänzung zu den Mehrparameterverfahren in der Erregerdiagnostik ist eine einfach handhabbare Methode zum simultanen Nachweis von Antikörpern gegen unterschiedliche Krankheitserreger beim Schwein wünschenswert. Neben den bereits in der veterinärmedizinischen Diagnostik etablierten Methoden haben auch andere, derzeit noch wenig bekannte Techniken, das Potential für eine sensitive Mehrparameterdiagnostik. So findet die Flüssigchip-Technologie bislang insbesondere im humanmedizinischen Bereich ein breites Spektrum an Applikationen. Die Methode ist sehr flexibel in der Anwendung und bietet die Möglichkeit zum simultanen Nachweis verschiedener Parameter. Die Ansätze

werden im Mikrotiterformat durchgeführt und sind demnach materialsparend und automatisierbar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Möglichkeiten und Grenzen bei der Etablierung, Anwendung und Interpretation von Mehrparameteranalysen in der Infektionsdiagnostik beim Schwein untersucht werden. Für die Antikörpernachweise beim Schwein sollte die prinzipielle Eignung der Flüssigchip-Technologie durch Adaptation aus dem humanmedizinischen Anwendungsbereich geprüft werden. Hierzu sollte ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen das Porzine Circovirus Typ 2 etabliert und mit einem bestehenden und validierten Immunfluoreszenzverfahren verglichen und nach erfolgreicher Etablierung durch weitere Untersuchungsparameter ergänzt werden.

Im Bereich der Erregernachweisverfahren sollten mögliche Einflüsse bestimmter Parameter auf die Aussagefähigkeit einer Multiplex-PCR untersucht werden. Hierzu sollte eine Multiplex-PCR zum Nachweis des Porzinen Circovirus Typ 2, des Influenzavirus A beim Schwein und der zwei Genotypen des Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus etabliert und mit validierten PCR-Methoden zum Einzelnachweis der Erreger bezüglich Sensitivität, Spezifität und Aussagefähigkeit verglichen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Mehrparameterverfahren in der Infektionsdiagnostik

Methoden für den simultanen Nachweis mehrerer Parameter werden zum Beispiel im Bereich der Mutations- und Genexpressionsanalysen eingesetzt. In der Diagnostik von Erbkrankheiten (ARKBLAD et al. 2006), in der Krebsforschung (NAGATA et al. 2003) und zum Schutz vor biologischen Waffen (CIRINO et al. 2004) werden Chipverfahren und andere Nanotechnologien für den Mehrparameternachweis verwendet. In der Infektionsdiagnostik werden Mehrparameternachweise derzeit vor allem mittels Multiplex-PCRs durchgeführt, einer Variante der klassischen PCR.

Eine erste PCR für den Nachweis von multiplen Parametern in einem Ansatz führten CHAMBERLAIN et al. (1988) durch. Sie detektierten verschiedene Deletionsmutanten im humanen Genom, die für die Duchenne-Muskeldystrophie verantwortlich gemacht werden. Multiplex-PCRs zum Nachweis porziner Pathogene sind bislang vor allem zur Differenzierung von bakteriellen bzw. viralen Sero-, Sub- und Genotypen beschrieben. Beispielsweise führten WISSELINK et al. (2002) eine Multiplex-PCR-Methode zur Nachweis von sechs Serotypen und zwei virulenz-assoziierten Phänotypen von *Streptococcus suis* durch. Drei der Serotypen von *Actinobacillus pleuropneumonia* lassen sich mit der PCR-Methode nach JESSING et al. (2003) differenzieren. Diese PCR-Methoden zeigen gute spezifische und sensitive Ergebnisse, erfordern jedoch definiertes Templatematerial. In Probenmaterial aus dem Feld müssen in den meisten Fällen die Pathogene zuvor über selektive Anzucht vereinzelt werden. Erst dann kann eine Typisierung mittels PCR erfolgen. Für die viralen Pathogene sind unter anderem typisierende PCRs für PCV (LAROCHELLE et al. 1999) sowie für den Nachweis der beim Schwein relevanten Influenza-Subtypen H1N1, H3N2, H1N2 (CHOI et al. 2002) beschrieben. Für den gleichzeitigen Nachweis unterschiedlicher Erreger wurden unter anderem folgende PCR-Methoden publiziert: *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* und *Salmonella typhimurium* werden in der PCR nach SUH et al. (2005) aus Kotproben nachgewiesen; BACCARO et al. (2003) hatten zuvor eine ähnliche PCR durchgeführt, in der zusätzlich Primer für *Brachyspira pilosicoli* enthalten waren. Der Simultannachweis von Viren stellt durch die hohe Variabilität mancher Viren und aufgrund der Tatsache, dass im Falle eines Virus mit RNA-Genom vor der Amplifikation eine Umschreibung in cDNA erfolgen muss, höhere Ansprüche. Für die DNA-Viren PCV1, PCV2 und das Porzine Parvovirus (PPV) entwickelten KIM et al. Multiplex-PCRs zum Nachweis von spezifischen Nukleinsäuren in klinischen Proben (2001), Sperma (2003a) und formalinfixierten Paraffinschnitten (2003b). Dieses Nachweisspektrum wurde von HUANG et al. (2004) durch ein für die Aujeszky'sche Krankheit (AK) spezifisches Primerpaar ergänzt. Den Simultannachweis von RNA-Viren führten KIM et al. (2000) durch. Die Enzyme für die Multiplex-PCR und die Reverse Transkription wurden mit den spezifischen Primern für das Porcine Epidemic Diarrhoea Virus und das Transmissible Gastroenteritis-Virus in dem selben Ansatz zusammengegeben. Die RNA beider Viren wurde auf diese Weise zunächst in cDNA umgeschrieben und direkt im Anschluss amplifiziert. Auf ähnliche Weise gelang es AGÜERO et al. (2004), das DNA-Virus der Afrikanischen Schweinepest zusammen mit dem RNA-Virus der Klassischen Schweinepest in einer Multiplex-RT-PCR simultan zu amplifizieren. Hierfür setzten sie eine Methode zur gleichzeitigen Extraktion von RNA und DNA aus dem

Probengewebe ein, so dass die DNA bereits während der reversen Transkriptionsreaktion im Ansatz enthalten war. HARDER et al. (2004) führte den kombinierten Nachweis von DNA- und RNA-Viren am Beispiel von acht porzinen Pathogenen des Respirationstraktes durch. Für den Nachweis von PCV2, PRRSV-Typ 1 und -Typ 2, FLUAVsw, porzinem Cytomegalovirus (PCMV), porzinem Coronavirus, *Mycoplasma hyopneumoniae* und *Mycoplasma hyorhinis* wurde der Multiplex-PCR eine Reverse Transkription mit random-Primern in einem getrennten Ansatz vorangestellt. Die Amplifikation der RNA- aber auch der DNA-Viren und der Mykoplasmen erfolgte aus der Proben-RNA. Die aufgeführten Multiplex-PCRs sind zum größten Teil auf die Erregerdifferenzierung bei verschiedenen porzinen Krankheitsbildern ausgerichtet. Dies gilt zum Beispiel für die Multiplex-PCR zum Nachweis von PCV1, PCV2 und PPV bei Verdacht auf PMWS. Für die Diagnose von PMWS ist der labordiagnostische Nachweis von PCV2 zusammen mit klinischen Symptomen und entsprechendem Vorbericht notwendig (ALLAN et al. 2000a). Darüber hinaus ist beobachtet worden, dass Koinfektionen mit PPV zu einem schwereren Verlauf führen (KRAKOWKA et al. 2000), ein Nachweis von PPV kann somit die prognostische Beurteilung unterstützen (KIM et al. 2003b). Auch im respiratorischen Krankheitsbereich ist ein Diagnostikum zum schnellen, umfassenden Nachweis der beteiligten Pathogene von großem Nutzen, das sich insbesondere auf den Nachweis der für die Therapie oder Prophylaxe relevanten Erreger konzentriert. Während die Methoden zur Subtypisierung von Bakterien an gut definiertem und homogenem Material geeignet sind, stellt diagnostisches Probenmaterial aus dem Feld ein deutlich schwierigeres Ausgangsmaterial dar. Es handelt sich in der Regel um kaum definiertes Organmaterial, das eine Vielzahl von Templates enthalten kann. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit Multiplex-PCRs für den Einsatz im Feld geeignet sind, wie aussagefähig die Ergebnisse sind und welchen Einfluss die Art des Probenmaterials auf Sensitivität und Spezifität hat. Ebenso ist noch wenig untersucht inwieweit Ergebnisse mit diagnostischem Material aus dem Feld mit solchen aus kontrollierten Laborversuchen vergleichbar sind.

2.2 Der respiratorische Krankheitskomplex des Schweins

Respiratorische Krankheitsbilder gewinnen in der Schweineproduktion vor allem im Bereich von Aufzucht und Mast zunehmend an Bedeutung. Insbesondere Erkrankungen mit unspezifischen Symptomen wie z.B. Husten, Fieber, Lethargie, Anorexie und forcierter Atmung werden beobachtet. Die Mortalität ist gering, die hohe Morbidität bewirkt jedoch durch sinkende Futtermittelverwertung und Wachstumsretardierung beträchtliche ökonomische Verluste (THACKER 2001). Im Rahmen von labordiagnostischen Untersuchungen werden von Fall zu Fall unterschiedliche Erreger, häufig auch mehrere Pathogene gleichzeitig festgestellt. HALBUR (1998) beschrieb diesen Symptomkomplex mit „multipathogener“ Ätiologie als Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). Weitere Studien bestätigen die Hypothese des PRDC. Eine Forschungsgruppe aus Minnesota, USA, isolierte im Zeitraum Januar 2000 bis Juni 2001 in 88,2 % von knapp 3000 respiratorisch erkrankten Schweinen zwei oder mehr Erreger (CHOI et al. 2003). Die unterschiedlichen Erreger bzw. Erregerspektren könnten zwar ursächlich für die Variationen im klinischen Bild des PRDC verantwortlich sein, die unterschiedlichen klinischen Erscheinungen geben jedoch keine Hinweise auf die jeweils beteiligten Erreger. Nicht nur im Falle des PRDC ist eine multifaktorielle Ätiologie beschrieben. Es gibt immer mehr Krankheitsbilder, bei denen man bislang entweder von einer monokausalen Ätiologie oder aber von einem Zusammentreffen

eines infektiösen Pathogens mit verschiedenen nichtinfektiösen Faktoren, z.B. Immunstatus, Herdenmanagement, individuellen Effekten (KRAKOWKA et al. 2001, MADEC et al. 2000) ausgegangen war, mittlerweile aber eine hohe Inzidenz von Koinfektionen nachgewiesen hat. Bei bioScreen wurden in dem Zeitraum von September 2000 bis Juli 2001 170 Fälle von Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS) und Interstitieller Pneumonie auf beteiligte Erreger untersucht. Diese Krankheitsbilder werden derzeit mit dem Porzinen Circovirus Typ 2 in Verbindung gebracht. Tatsächlich enthielten etwa 93% aller Proben PCV2-Antigen, allerdings waren zudem 60% positiv für den europäischen Typ des Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRSV-Typ 1) und in 8,2 % wurde Antigen des Influenzavirus A beim Schwein (FLUAVsw) detektiert. In geringerem Ausmaß wurden Porzines Parvovirus, *Chlamydia suis*, *Actinobacillus pleuropneumonia* und *Mycoplasma hyopneumoniae* diagnostiziert. Die PCV2-Nachweisrate von über 90% zeigt, dass es sich in nahezu allen Fällen um Koinfektionen mit PCV2 handelte (PESCH et al. 2003). Diese Mehrfachinfektion scheint eine potenzierende Wirkung zu haben, denn sowohl die klinischen Symptome als auch die histopathologischen Veränderungen (HARMS et al. 2001) sind deutlich stärker ausgeprägt als bei einer Einzelinfektion. Ein synergistischer Effekt ist auch bei Infektionen mit FLUAVsw und PRRSV nachweisbar. VAN REETH et al. (2001) zeigten im Infektionsversuch, dass eine Doppelinfektion mit FLUAVsw und PRRSV in Abhängigkeit von Infektionszeitpunkt und Immunstatus der Tiere eine verlängerte Fieberphase sowie schwere respiratorische Symptome auslösen kann, während Einzelinfektionen nur zu moderaten bis subklinischen Infekten führen. Die Pathogenese für die mit den Koinfektionen verbundenen Synergie-Effekte ist jedoch noch unzureichend erklärt. Bislang wurden lediglich verschiedene Wechselwirkungen zwischen den Pathogenen beschrieben, z.B. steigt die Menge an PCV2-Antigen bei Koinfektionen mit PRRSV deutlich, hingegen hat die Anwesenheit von PCV2 keinen Einfluss auf die Replikation von PRRSV (ALLAN et al. 2000b, ROVIRA et al. 2002). Solange die Zusammenhänge zwischen beteiligten Erregern, nichtinfektiösen Faktoren und den verschiedenen Symptomenkomplexen noch nicht aufgedeckt sind, kann eine exakte ätiologische Diagnose anhand der klinischen Ausprägung kaum getroffen werden. Ein schnelles spezifisches Monitoring eines Bestandes gibt die Möglichkeit, zeitsparend entsprechende Maßnahmen zu ergreifen. Eine Antikörper- bzw. Erregerbestimmung durch ein mikrobiologisches Labor ist daher für ein effizientes Vorgehen unumgänglich. Sind einmal alle beteiligten Pathogene identifiziert und gewichtet, können durch zielgerichtete Therapie oder Impfmaßnahmen sowie Änderungen des Managements die Ausbildung klinischer Erkrankung verhindert und Tierverluste minimiert werden (HALBUR 1998). Damit auf allen Prozessebenen der Produktion ökonomisches Handeln im Sinne der modernen Schweineproduktion gewährleistet werden kann, müssen auch die diagnostischen Verfahren diesen Ansprüchen genügen.

2.3 Diagnostische Methoden

2.3.1 Serologische Nachweisverfahren

Der Nachweis von Antikörpern nimmt in der Labordiagnostik eine wichtige Rolle ein. Die Untersuchungsverfahren sind schnell, die Probenentnahme ist einfach und zudem *in vivo* möglich. Da Antikörper in der Regel noch lange nach dem Verschwinden der Antigene

detektiert werden können, sind serologische Nachweise eine sinnvolle Ergänzung zur Erregerdiagnostik. Die Untersuchung auf Antikörper eignet sich insbesondere zur Ermittlung des Infektionsstatus im Rahmen epidemiologischer und forensischer Fragestellung sowie zur Beurteilung des Immunstatus einer Population.

Unter den serologischen Nachweisverfahren stellt der ELISA eine weit verbreitete, automatisierbare Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität dar. Spezifische Antikörper binden an festphasengebundenes Antigen aus dem Testserum. Nach Zugabe von enzymgekoppelten, spezie-spezifischen Sekundärantikörpern binden diese an die Probenantikörper. Überschüssiges Material wird durch Waschschriffe entfernt. Substratzugabe führt zu einem Farbwechsel durch das antikörpergekoppelte Enzym und macht einen Nachweis der positiven Reagenten möglich. In abgeänderter Verfahrensweise können ELISAs auch als kompetitiver oder blocking ELISA Anwendung finden.

Neben dem ELISA kommen je nach Erreger- oder Antikörpereigenschaften eine Vielzahl anderer Antikörpernachweisverfahren zum Einsatz. So können im Western-Blot protein- oder epitopspezifische Antikörpermuster untersucht werden, und im Serumneutralisationstest (SNT) werden selektiv Antikörper mit neutralisierender Eigenschaft nachgewiesen. Der Immunperoxidase Monolayer Assay (IPMA) und der Indirekte Fluoreszenz Antikörper Test (IFAT) dienen überall dort als serologisches Nachweisverfahren, wo Pathogene in Zellkultur angezüchtet werden können und die Spezifität der Antikörperbindungsreaktion anhand des Fluoreszenzmusters wesentlich für die Beurteilung der Reaktion ist. Für beide Testverfahren werden Zellrasen mit den vermehrungsfähigen Pathogenen infiziert und mit Ethanol fixiert. Das Testserum wird in einer bestimmten Verdünnung oder in Verdünnungsreihen auf die infizierten Zellen aufgetragen und erregerspezifische Antikörper, die mit dem Antigen in den Zellen Komplexe bilden, werden mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten, spezie-spezifischen Sekundärantikörpern nachgewiesen. Ein Vorteil dieser Methoden ist die Möglichkeit, durch Endpunkttitration eine Quantifizierung der Antikörper vornehmen zu können. Die Durchführung ist jedoch sehr aufwendig, da infizierte, fixierte Zellmonolayer und Verdünnungsreihen der Testseren hergestellt werden müssen. Zudem ist der Probanddurchsatz relativ gering, da jede Verdünnungsstufe einer Probe im Mehrfachansatz getestet wird.

Bei Durchführung eines Antikörpertests muss für jeden in Frage stehenden Parameter einer Serumprobe ein neuer Ansatz erstellt werden, dementsprechend kann die Untersuchung zeit- und arbeitsaufwendig sein. Darüber hinaus ist sie mit hohem Verbrauch von Probenmaterial verbunden. Ein weiterer Nachteil ist die eingeschränkte diagnostische Breite. Es kann vorkommen, dass wiederholte Testungen in verschiedenen Verdünnungsstufen durchgeführt werden müssen, da der Parameter in einer ungeeigneten Konzentration im Testserum vorliegt und ein Endpunkt nicht bestimmt werden kann.

2.3.1.1 Die Chip-Technologie

Die klassischen serologischen Nachweismethoden sind auf die Detektion eines Parameters ausgerichtet. Die Beobachtung, dass immer häufiger mehrere Erreger an einem Krankheitsgeschehen beteiligt sind, macht den Nutzen eines schnellen, praktikablen und leistungsstarken Diagnostikums für den gleichzeitigen Nachweis mehrerer erregerspezifischer Antikörper deutlich. Derartige Verfahren sparen Zeit und Reagenzien und liefern zugleich zahlreiche Informationen, die eine effiziente, zielgerichtete Therapie

ermöglichen. Methoden für den simultanen Nachweis verschiedener pathogenspezifischer Antikörper sind bislang nicht bekannt. Allerdings bieten verschiedene neuere Techniken, z.B. die Chip-Technologie, die Möglichkeit für eine solche Mehrparameter-Serologie. Grundlage der Mikrochips ist ein an eine Festphase gebundenes Capture-Molekül, z.B. ein Antigen oder eine DNA-Sequenz, das die entsprechenden Reaktionspartner aus dem Testmaterial bindet. Diese werden im Anschluss mit fluoreszierenden Sekundärreagenten detektiert. Durch die variable Bindung verschiedener Arten von Capture-Molekülen ergibt sich ein breites Spektrum von Applikationsmöglichkeiten. Abhängig von der Art des fixierten Capture-Moleküls können Mikrochips in der Genom- und Proteomforschung oder zur Analyse von Protein-Interaktionen und Genmutationen eingesetzt werden. Die gleichzeitige Bindung verschiedener Capture-Moleküle auf der Festphase ergibt die Möglichkeit des Multiplexing. Da die Reaktionsansätze im Miniaturformat durchgeführt werden, reduziert sich nicht nur der Bedarf an Verbrauchs- und Probenmaterial, es kann auch ein sehr hoher Probendurchsatz erzielt werden (PANG et al. 2005). Es gibt verschiedene technische Varianten von Mikrochips. Eine Hauptform stellen die Festphasen-Mikrochips, die so genannten spotted microarrays, dar. Deren Grundlage sind Nylonmembranen, Träger aus Glas, Silikon oder Keramik, auf denen das Antigen fixiert wird. Kommerziell erhältliche Mikrochips bieten die Möglichkeit, schnell und unkompliziert die Vorteile der Mikrochip-Technik zu nutzen. Eine Anpassung an individuelle Fragestellungen ist mit kommerziellen Chips nur begrenzt möglich und auch bei maßgefertigten Chips muss immer das gesamte Spektrum getestet werden. Das individuelle Erstellen von Mikroarrays ist möglich, erfordert jedoch eine aufwendige und kostspielige Ausrüstung.

Die Grundlage der Flüssigchip-Technologie stellen Kunststoffkügelchen (Beads) dar, die sich in flüssiger Phase befinden (bead-based arrays, suspension-arrays). Verschiedene, leicht unterschiedliche Varianten, werden derzeit genutzt (ELSHAL et al. 2006). Ein herkömmliches Durchflusszytometer ist ausreichend, um die durch verschiedenen Fluoreszenzintensitäten gekennzeichneten Beads des CBA-Systems (Cytometric Bead Array System, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) zu analysieren. Grundlage der Copalis-Technologie (DiaSorin, Stillwater, MN, USA) sind Latex-Kügelchen, die durch ihre einzigartigen Lichtstreuungseigenschaften differenziert werden können. Die Beads der xMAP[®]-Technologie (Luminex Corporation, Austin, T, USA) enthalten in ihrem Inneren zwei Fluoreszenzfarbstoffe, die in verschiedenen Mischungsverhältnissen eingesetzt werden. Durch diese einzigartigen Farbstoffkombinationen kann jeder Analyse-Parameter einem Bead-Farbtyp zugeordnet werden (FULTON et al. 1997, KETTMAN et al. 1998). An der Oberfläche dieser Beads werden die Capture-Moleküle über chemische Bindungen fixiert. Die Bindung an eine sphärische Oberfläche hat die Minimierung der sterischen Hinderung zur Folge. Auf diese Weise wird die Reaktionskinetik deutlich erhöht und trägt dadurch zur weiteren Zeitersparnis bei (PANG et al. 2005). Im Gegensatz zum Festphasen-Mikrochip, an den mehrere Tausend Parameter gebunden werden können, ist die Flüssigchip-Technologie auf die simultane Analyse von maximal hundert Parametern beschränkt. Andererseits können die Bead-Typen für jede Reaktion in beliebigen Kombinationen zusammengestellt werden. Da im veterinärmedizinischen Bereich die Anzahl an Parametern begrenzt ist, überwiegt der Vorteil, einen flexiblen Multiplex-Testansatz zur Verfügung zu haben, der auf die individuellen Bedürfnisse abgestimmt werden kann. Zudem ist die Bindung der Capture-Moleküle an die Bead-Oberfläche einfach und kostengünstig. Durch Einbeziehung von

Standardverdünnungen in die Versuchsansätze bietet die Flüssigchip-Technologie die Möglichkeit quantitativer Messungen. Schwerpunkte des Einsatzes der Flüssigchip-Technologie liegen derzeit in der Zytokin-Forschung (OLIVER et al. 1998, BONFIELD et al. 2005) und der Genanalyse (IANNONE et al. 2000, HURLEY et al. 2004). Aber auch in der Diagnostik von Infektionen und Autoimmunerkrankungen liegen Erfahrungsberichte vor. JOHNSON et al. (2005) detektierten virales Antigen mittels Bead-gekoppelter Antikörper. Durch die Verwendung von Antigenen als Capture-Moleküle konnten Antikörper gegen bakterielle (LAL et al. 2005) und virale (JONES et al. 2002) Antigene sowie Autoantikörper, z.B. verschiedene Rheumafaktoren, (MARTINS et al. 2004b) detektiert werden. Für humanmedizinische Applikationen, z.B. zur Bestimmung von Zytokinen (Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, BD Biosciences, San Jose, CA USA) oder Autoantikörpern (AtheNA Multi-Lyte[®] ANA Kit, Zeus Scientific, Inc., Raritan, NJ, USA), werden mittlerweile kommerzielle Testkits angeboten. Ein Großteil dieser Testkits beruht auf der Grundlage der xMAP[®]-Technologie (Luminex Corporation, Austin, T, USA) (STOLL et al. 2005).

Gegenüber einem ELISA oder einem IFAT hat ein bead-based Array aufgrund der Fähigkeit zum Multiplexing eine höhere Durchsatzleistung und einen geringeren Reagenzien- und Probenverbrauch (PANG et al. 2005). Auch eine verbesserte Stabilität der Reagenzien wird beschrieben (BIAGINI et al. 2004a). Bezüglich Sensitivität und Genauigkeit gibt es unterschiedliche Beobachtungen. Die Sensitivität variiert von Testverfahren zu Testverfahren und wird in erster Linie vom Verhalten der jeweils verwendeten Reaktionskomponenten beeinflusst. Einige Berichte bezeugen den bead-based Arrays eine mit der Referenzmethode (ELISA) identische Sensitivität (STOLL et al. 2005, OPALKA et al. 2003, KHAN et al. 2005), während andere eine Verbesserung der Sensitivität feststellen konnten (BIAGINI et al. 2004a, b und LAL et al. 2005). CARSON et al. (1999) begründen die Überlegenheit in Bezug auf die Sensitivität und Genauigkeit damit, dass das Fluoreszenzsignal der Luminex-Technologie direkter, stabiler und sensitiver sei, als das auf einer enzymatischen Amplifikation beruhende indirekte Signal des ELISAs. Darüber hinaus führt die größere Oberfläche der Plattenvertiefungen eines ELISAs zu einem Anstieg der unspezifischen Bindungen und damit zu einem Absinken der Sensitivität. Die Beads haben zum einen eine deutlich kleinere Oberfläche und zum anderen können ungebundene Substanzen wesentlich effektiver mit Hilfe der Waschschriffe entfernt werden. CARSON et al. (1999) definieren jedes Bead als ein Testreplikat. Auf diese Weise hat das Ergebnis einer Flüssigchip-Reaktion, das als Median von einhundert gemessenen Beads dargestellt wird, eine sehr viel höhere Genauigkeit als ein ELISA-Ergebnis, bei dem jede Vertiefung jeweils nur als ein Replikat gewertet wird. MCBRIDE et al. (2003) berichten von identischer Sensitivität und Genauigkeit und stellten fest, dass auch die Kombination mehrerer Parameter in einer Reaktion die Sensitivität, Spezifität und dynamische Breite nicht beeinträchtigt. Dennoch ist zu beachten, dass bei der Integration eines Testparameters in ein Multiplex-Format die Kreuzreaktivität durch unspezifische Bindungen zwischen Reagenten ausgeschlossen wird (ELSHAL et al. 2006). Sowohl der IFAT als auch die Chip-Technologie sind quantifizierende Methoden. Da die Flüssigchip-Technologie die einzelne Probe gegen eine Standardkurve misst und nicht wie der IFAT durch eine Endpunktverdünnung quantifiziert, ist ein deutlich höherer Probendurchsatz möglich. Auch ist die Chip-Technologie sehr viel besser automatisierbar, da das benötigte Material in größeren Mengen gelagert werden kann.

Ob ein auf der Flüssigchip-Technologie basierendes Testverfahren tatsächlich die Bedingungen für den Einsatz in der Routinediagnostik aufweist, kann nicht pauschal beantwortet werden. Es ist nicht ohne weiteres möglich, etablierte diagnostische Methoden wie z.B. einen ELISA oder IFAT zu einem bead-based Array umzustrukturieren. Die erfolgreiche Etablierung eines Nachweises mit der Luminex xMAP®-Technologie erfordert eine Reihe von Kompatibilitäten. Die Tertiärstruktur des Capture-Antigens sowie die Neigung zu Interaktionen und Komplexbildung kann die Kopplung erschweren oder verhindern (STOLL et al. 2005). Die Eignung eines Proteins als Capture-Antigen kann nur empirisch bestimmt werden. Auch die Vollständigkeit der Antigenaufreinigung hat entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Kopplung. Fremdproteine, z.B. zelluläres Protein aus Zellkulturen, binden ebenfalls an die Beads, fungieren somit als weiteres Capture-Molekül und können zu falsch positiven Signalen führen. Befinden sich nicht abgesättigte Kopplungsgruppen an den Beads, so reagieren diese mit unspezifischen Komponenten aus dem Testserum und verstärken auf diese Weise die Fluoreszenz.

Die derzeitigen Applikationen der Flüssigchip-Technologie beschränken sich auf den humanmedizinischen und biologischen Forschungsbereich, im veterinärmedizinischen Sektor sind keine Anwendungen bekannt. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, eine Methode für den Nachweis von Antikörpern gegen virale Pathogene des Schweins mittels xMAP®-Technologie zu entwickeln. Das System sollte zunächst als Einfach-Ansatz am Beispiel des Porzinen Circovirus Typ 2 etabliert werden. Nach entsprechender Validierung bietet die Methode die Möglichkeit zum Ausbau als Multiplex-Testverfahren. Als Referenzmethode wurde ein validierter PCV2-IFAT hinzugezogen. Sämtliche für die Etablierung und Validierung der Flüssigchip-Methode verwendeten Seren sind zuvor in diesem validierten Testsystem untersucht worden. Als Capture-Molekül wurde ein rekombinant hergestelltes Strukturprotein des PCV2 verwendet. Dieses Protein wird kodiert vom ORF2-Bereich, einem der zwei relevanten, funktionellen ORFs des PCV2-Genoms. Es gibt zwei Virustypen von PCV, PCV1 und PCV2, die zwar antigene Unterschiede aufweisen, aber auch einen geringen Grad an Kreuzreaktivität zeigen (ALLAN et al. 1998). Vor allem der Bereich des ORF 1 ist mit etwa 83,5% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen PCV1 und PCV2 relativ stark konserviert. Die Aminosäuresequenz im Bereich des ORF 2 ist zu 56 % homolog (MAHÉ et al. 2000). Ein Vorteil der Verwendung eines ORF2-Proteins in einem Immuntest für PCV2-Antikörper ist demnach die fehlende Kreuzreaktivität mit PCV1-Antikörpern. Darüber hinaus zeigen die PCV2-Antikörper eine stärkere Reaktivität gegen das ORF2-Protein als gegen das ORF1-Protein (MAHÉ et al. 2000). Dies kann zu einer besseren Auswertbarkeit durch höhere Signale des Testsystems beitragen. Die rekombinanten ORF2-Proteine von PCV2 haben eine starke Neigung zur Aggregation und bilden so genannte Virus-like particles (VLPs). Im Elektronenmikroskop lassen sich diese VLPs beobachten, die morphologisch mit den PCV2-Virionen identisch sind, jedoch eine geringe Dichte besitzen (NAWAGITGUL et al. 2000). PCV2 ist in Zellkultur insbesondere in hohen Titern nur schwer anzuzüchten. Die Baculoviren vermehren sich ohne Probleme in großen Mengen und produzieren deutlich mehr ORF2-Partikel als ein PCV2 in Zellkultur (NAWAGITGUL et al. 2002). Da so große Mengen Antigen-Material in konstanter Beschaffenheit zur Verfügung stehen, ergeben sich Vorteile für den Einsatz eines darauf basierenden Testsystems in der Routinediagnostik.

2.3.2 Verfahren zum Erregernachweis

Es sind zahlreiche Methoden für den Nachweis von Nukleinsäuren und Antigenen viraler und bakterieller Erreger beschrieben. Immunhistochemische Methoden oder *in situ*-Hybridisierungen haben den Vorteil, dass sie die Nukleinsäure oder das Antigen im Gewebe nachweisen und somit der direkte Zusammenhang zwischen infektiösem Agens und histologischen Läsionen hergestellt werden kann. Mit Hilfe von Southern- oder Northern-Blot-Techniken können DNA- bzw. RNA-Sequenzen aus komplexen Nukleinsäuregemischen nachgewiesen werden. Die Sequenzen werden zunächst durch Restriktionsenzyme aufgespaltet und über Hybridisierung an spezifische Sonden werden die einzelnen Spaltstücke identifiziert. Bei dem Nachweis von Erregern mittels Sequenzierung von Nukleinsäuren wird gleichzeitig die Abfolge der Basen entschlüsselt. Insbesondere die Verfahren zum Nachweis von Genomfragmenten haben den Nachteil, dass ohne zusätzliche Informationen meist keine Aussagen über die Infektiosität oder klinische Bedeutung des Erregers möglich sind. Demgegenüber werden Erreger in der Erregerisolierung anhand ihrer Vermehrungsfähigkeit und ihres Wachstumsverhaltens nachgewiesen und sind somit hinsichtlich ihres Infektionspotentials besser einschätzbar.

In der Routinediagnostik hat der Nachweis von Nukleinsäure mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Ursächlich für diese Entwicklung sind verschiedene Vorteile gegenüber den klassischen Methoden, die nachfolgend besprochen werden sollen.

2.3.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist bei geeigneter Primerauswahl sehr spezifisch, schnell und in Teilschritten automatisierbar, so dass auch große Probenaufkommen in kurzer Zeit bewältigt werden können. Bei der Etablierung von PCR-Verfahren sind die Eigenschaften des Erregers, insbesondere dessen Genomorganisation zu berücksichtigen. So liegt in PRRSV-infizierten Zellen neben infektiösen Viruspartikeln mit viraler RNA auch genomische und subgenomische RNA vor (MEULENBERG et al. 1993). Da auch diese von den Primern in einer PCR erkannt und amplifiziert werden, liegt die absolute Sensitivität dieser Methode oft unterhalb der Nachweisgrenze, die mittels Endverdünnungsmethode durch Virusinokulation auf Zellen bestimmt wurde (PESCH 2003). Da die PCR keine replizierenden Viruspartikel, sondern genomisches Material nachweist, ist es möglich, auch Proben von geringerer Qualität, z.B. nach längerem Transport, einzusetzen. Auch Nukleinsäuren aus Materialien, die für die Zellkultur nicht geeignet sind (z.B. Sperma), können in der PCR mit gutem Erfolg detektiert werden. Jedoch stellt die hohe Sensitivität der Methode technische Anforderungen an die Durchführung, denn bereits geringste Kontaminationen können zu positiven Signalen führen. Dies gilt insbesondere, wenn die PCR als Kombination von externer und nested PCR konzipiert ist. Ebenso kann es vorkommen, dass bei stärker variablen Virusisolaten die Primer das virale Genom des Isolates nicht mehr erkennen und somit falsch negative Ergebnisse entstehen (CHRISTOPHER-HENNINGS et al. 2002). Schwierigkeiten bei der Auswertung von PCR-Produkten können sich bei hohen Salzkonzentrationen (vor allem $MgCl_2$) im Reaktionsansatz ergeben. Im elektrischen Feld bewegen sich die Salze schneller als die DNA auf die Anode zu und erzeugen auf diese Weise einen Sog. Insbesondere lange PCR-Amplifikate werden beschleunigt und die Banden entwickeln eine charakteristische U- oder „smile“-Form.

Angesichts der steigenden Anzahl von Koinfektionen zeigt sich auch in der Erregerdiagnostik der Nutzen von Mehrparameternachweisverfahren. Die Untersuchung auf Genomfragmente mehrerer Erreger ist zeitaufwendig und kostspielig, da jeder Parameter in einer getrennten PCR untersucht wird. Material- und Personalkosten addieren sich, zudem wird mehr Probenmaterial benötigt. In einem Multiplex-PCR-Ansatz werden mehrere Primerpaare in einem Reaktionsansatz so zusammengefasst, dass es bei Vorliegen der jeweiligen erregerspezifischen Genomfragmente zu einer entsprechenden Amplifikation kommt und somit ein Erregernachweis möglich ist. Die Nachteile der monospezifischen PCR werden so umgangen und sämtliche PCR-Produkte können zeitgleich in einem Gel ausgewertet werden. Aufgrund dieser Vorteile sind Multiplex-PCRs bereits für verschiedene veterinärmedizinische Applikationen etabliert.

2.3.2.2 Technische Anforderungen einer Multiplex-PCR

Eine Multiplex-PCR erfordert eine sorgsame Konzeption, um Probleme, die sich durch die Kombination der Reagenzien ergeben, zu vermeiden. Unter Umständen treten eine Imbalanz der Amplifikationseffizienz der einzelnen Parameter und unspezifische Produkte auf. Diese können nicht nur zu falsch positiven Ergebnissen führen, sondern auch die Homogenität der Banden negativ beeinflussen. Bevorzugt amplifizierte Zielsequenzen und starke unspezifische Nebenprodukte beeinträchtigen durch den Verbrauch an Reagenzien die effiziente Amplifikation der spezifischen Produkte mit geringerer Amplifikationseffizienz noch zusätzlich (HENEGARIU et al. 1997, HENGEN 1997). Die Folge ist eine stark variierende Produktausbeute (CHOU et al. 1992, MUTTER et al. 1995), die unter Umständen auch die Sensitivität herabsetzt (ELNIFRO et al. 2000).

Die optimale Auswahl der Primer ist ein zentrales Element in der Etablierung einer Multiplex-PCR. Teilhomologe Primer haben Nachteile bei der Bindung der Polymerase (EDWARDS et al. 1994), insbesondere wenn die letzten fünf bis sechs Nukleotide am 3'Ende der Primer nicht vollständig homolog sind (DIEFFENBACH et al. 1993). Durch die schlechtere Bindungseffizienz reduzieren bereits minimale Heterologien insbesondere bei einer hohen Zykluszahl die Menge des entstandenen Produktes (DIEFFENBACH et al. 1993). Durch Dimerisierung von Primern (BROWNIE et al. 1997) oder durch Fehlbindungen von Primern an teilhomologe Bereiche anderer Nukleinsäuren (SHIGEMORI et al. 2005) können unspezifische Nebenprodukte entstehen. Um eine gute Abgrenzung der PCR-Produkte zu gewährleisten, müssen die Primer so gesetzt werden, dass alle Amplifikate eine deutliche Längendifferenz aufweisen (EDWARDS et al. 1994, AGÜERO et al. 2004).

Weitere Einflussfaktoren für die inhomogene Amplifikation mehrerer Parameter sind die Eigenschaften der Zielnukleinsäuren. Dieses Phänomen wird von POLZ et al. (1998) als „PCR selection“ bezeichnet. Zum Beispiel führt bei GC-reichen Bindungsstellen der höhere Gehalt an Guanin und Cytosin zu einem Anstieg der Primeraffinität und somit zu einer schnelleren und stärkeren Bindung der Primer an die Zielsequenz. Hingegen wirkt in Sequenzbereichen, die an die Primerbindungsstelle anschließen, ein geringer GC-Gehalt positiv, da dieses mit einer erleichterten Denaturierung verbunden ist. Dies führt ebenso wie eine schnelle Primerbindung zu einer effizienten Amplifikation.

Einige weitere Aspekte tragen zu einer Benachteiligung bestimmter Parameter bei. So können Sekundärstrukturen vorhanden sein bzw. während der Extension entstehen, die einen Kettenabbruch verursachen (HENGEN 1997) oder interessierende Sequenzbereiche

schwer erreichbar machen (MUTTER et al. 1995). Auch können virusspezifische Gegebenheiten, z.B. eine geringere Anzahl von Genomkopien, zu schwächerer Amplifikation führen (ELNIFRO et al. 2000). Unter „PCR drift“ wird eine Form der Amplifikationsimbilanz beschrieben, die durch stochastische Variationen während der ersten Zyklusdurchgänge entsteht und nicht reproduzierbar ist (ELNIFRO et al. 2000).

Sehr ungleiche Konzentrationen der zu amplifizierenden Zielsequenzen können zu stark inhomogenen Banden führen. Zusätzlich beobachteten JACKSON et al. (1996), dass hohe Konzentrationen eines Parameters einen inhibitorischen Effekt auf die Amplifikation eines simultan amplifizierten Parameters in geringen Konzentrationen haben können.

Bei der Konzeption eines Reaktionsansatzes für eine Multiplex-PCR ist die Art der zu amplifizierenden Nukleinsäuren zu berücksichtigen. RNA-Viren erfordern zunächst eine Transkription ihrer RNA in cDNA. Erfolgt dies in einer herkömmlichen RT-Reaktion für jeden Parameter separat, so reduziert sich der Einspareffekt von Zeit, Kosten und Material stark. Hier wäre eine Multiplex-RT denkbar, in der die Transkription mehrerer Pathogene simultan stattfindet. Auch eine Multiplex-RT-PCR wäre vorstellbar, in der die Reverse Transkriptase mit der Polymerase und Primern mehrerer Pathogene in einem Ansatz zusammengefasst werden. Auf diese Weise könnten mehrere Parameter zeitgleich transkribiert und amplifiziert werden. Gerade im letzteren Falle ist jedoch zu berücksichtigen, dass ebenfalls zu amplifizierende DNA-Parameter durch die Transkription stark benachteiligt sein können. Ob diese Methoden anwendbar sind, muss von Fall zu Fall ausgetestet werden.

Neben der Eignung der Flüssigchip-Technologie zum Antikörpernachweis beim Schwein am Beispiel von PCV2-spezifischen Antikörpern sollten im Rahmen der Etablierung einer Multiplex-PCR zum Nachweis viraler respiratorischer Krankheitserreger beim Schwein die Möglichkeiten und Grenzen bei der Etablierung, Anwendung und Interpretation von Mehrparameteranalysen in der Infektionsdiagnostik beim Schwein untersucht werden. Als Referenzmethoden wurden die bereits etablierten und validierten PCRs zum Einzelnachweis der jeweiligen Pathogene hinzugezogen. Das Nachweisspektrum dieser PCR umfasste die derzeit bedeutendsten viralen Erreger von respiratorischen Erkrankungen im Schwein. Zu diesen gehören die beiden Genotypen des PRRS-Virus, das Porzine Influenzavirus mit den Subtypen H1N1, H3N2 und H1N2 sowie PCV2.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Für die Etablierung der Methoden wurde Probenmaterial aus dem Bestand der Firma bioScreen, Münster, verwendet. Bei bioScreen wird jeder eingehenden Probe eine fortlaufende Nummer zugeteilt. Anhand dieser können Vorbericht, Untersuchung und Befundung dieser Probe lückenlos nachvollzogen werden. Als Probenmaterial für die Versuche zur Etablierung der Flüssigchip-Technologie wurden PCV2-negative bzw. PCV2-positive Referenzseren und Antikörper sowie verschiedene im Rahmen von GCP-Studien gewonnene Schweineseren eingesetzt. Im Folgenden werden diese als Studienserren bezeichnet. Die Einteilung in für PCV2-Antikörper negative sowie positive Studienserren erfolgte anhand der Ergebnisse aus dem nach VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products) validierten Indirekten Fluoreszenz Antikörper Test (IFAT) für PCV2-Antikörper. Die längerfristige Lagerung sämtlicher Proben erfolgte bei -20°C , die Lagerung über wenige Tage bei 4°C .

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Multiplex-PCR-Methode wurde zunächst anhand von Virusreferenzstämmen aus Zellkulturen bzw. Hühnereiern etabliert und optimiert. Für die Überprüfung der methodenspezifischen Eigenschaften wurden zusätzlich Organ-, Tupfer- und Serumproben, die im Zeitraum von 2000 bis 2006 zur Untersuchung bei bioScreen eingegangen waren, verwendet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -70°C . Für die Verwendung in der Multiplex-PCR wurden RNA und DNA aus den Originalmaterialien extrahiert, die mit den bereits etablierten PCR-Verfahren der Routinediagnostik auf PRRSV-, FLUAVsw- und PCV2-Genom untersucht worden waren. Die Lagerung der extrahierten DNA bzw. RNA erfolgte in Form von $5\ \mu\text{l}$ -Aliquots bei -70°C . Die Aliquots wurden direkt nach dem Auftauen verwendet. Restmaterial wurde verworfen, um eine gleich bleibende Qualität des Probenmaterials zu gewährleisten.

3.2 Referenzstämme

Für die Versuche zum Antikörpernachweis gegen PCV2 im LiquiChip[®]-System standen ein polyklonaler PCV2-Antikörper aus dem Kaninchen (PCV2-Kaninchen-pAk) und ein monoklonaler PCV2-Antikörper aus der Maus (PCV2-mAk) zur Verfügung. Ein monoklonaler Antikörper gegen *Lawsonia intracellularis* (L.i.-mAk) diente als unspezifische Kontrolle. Weiterhin wurden die im IFAT als Referenzen eingesetzten Seren getestet. Bei der Positivreferenz handelte es sich um ein aus PCV2-geimpften und anschließend mit PCV2 infizierten Tieren gewonnenes Serum. Ein Serum aus nicht geimpften, nicht infizierten Schweinen, die mittels Sectio caesarea entwickelt worden waren und kein Kolostrum erhalten hatten (cd/cd-Ferkel), diente als Negativreferenz. Im Folgenden werden alle Studien-, Referenzseren und Antikörperlösungen einheitlich als „Serum“ oder „Testserum“ bezeichnet. Der Begriff „Studienserren“ bezieht sich speziell auf die im Rahmen von GCP-Studien gewonnenen Seren.

Für sämtliche Etablierungs- und Optimierungsversuche der Multiplex-PCR wurden Zellkulturisolate von PRRSV und PCV2 sowie aus embryonierten Hühnereiern gewonnenes FLUAVsw-Material verwendet. Ausgangsmaterial für die Inokulation der Zellen bzw. Chorioallantoismembran waren mit Ausnahme von PRRSV-Typ 2 bei bioScreen isolierte und

charakterisierte Virusstämme. Der Zellkulturüberstand des PCV2-Isolats mit der bioScreen-Nr. 93965 wurde in der fünften bzw. sechsten Zellkulturpassage gewonnen. Der Impfstamm Ingelvac® PRRS MLV wurde als Referenzisolat für PRRSV-Typ 2 eingesetzt. Das Isolat für PRRSV-Typ 1 entstammt der Organ-Einsendung mit der bioScreen-Nr. 190131, das FLUAVsw-Isolat der Probe Nr. 55180 und hatte den Subtyp H3N2 (im Folgenden „FLUAVsw-55180“). Für die Funktionsüberprüfung und die Sensitivitätsbestimmung der Multiplex-PCR wurde RNA aus Antigen-Material der porzinen FLUAV-Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 verwendet.

3.3 Vorbereitung und Lagerung des Probenmaterials

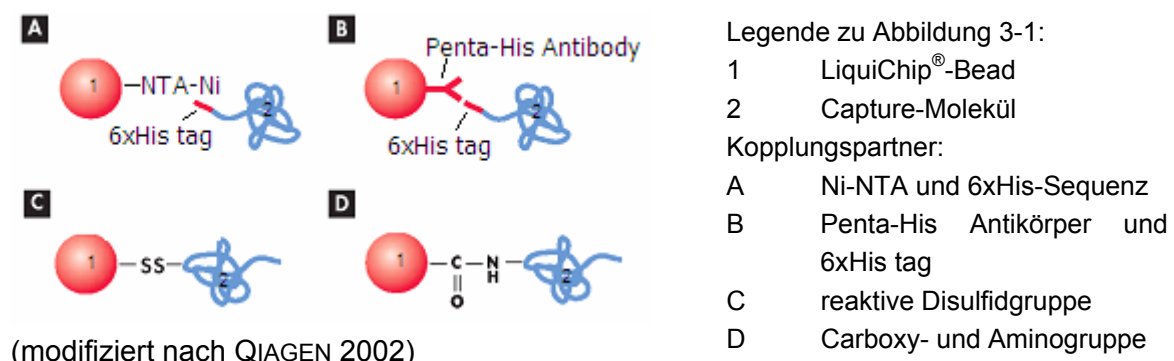
Blutproben wurden nach erfolgter Blutgerinnung bei 1160 g für fünf Minuten zentrifugiert (Megafuge 2.0r, Heraeus, Hanau, D), und das Serum gewonnen. Im Falle einer Weiterbearbeitung innerhalb der folgenden Woche wurden Blut- bzw. Serumproben bei 4°C, Organproben bei -20°C gelagert. Langzeitlagerungen z.B. von ausgewählten Probeneingängen ab dem Jahr 2000 erfolgten bei -70°C in 2,0 ml Kryoröhrchen (Biozym, Hessisch-Oldendorf, D, Kat.Nr. 710057) beziehungsweise in 2,0 ml Reaktionsgefäßen von Eppendorf (Hamburg, D, Kat.Nr. 0030120.094). Serumproben und Organmaterialien wurden vor dem Einfrieren aliquotiert. Die Anzucht der Virusstämme erfolgte mit Organhomogenat durch Inokulation in Zellkultur oder in embryonierte Hühnereier. Zu diesem Zweck wurden Stücke von 50 – 100 mg in 1,6 ml PBS-Puffer (PBS-Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, D, Kat.Nr. L-1825) mittels einer Stahlkugel in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß in der Schwingmühle MM300 (Retsch, Haan, D, Kat.Nr. 20.739.0001) zweimal für je sechs Minuten bei 30 Hz zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenat fünf Minuten bei 380 g zentrifugiert (Biofuge fresco, Kat.Nr. 75005510, Biofuge pico, Kat.Nr. 75003280, Heraeus, Hanau, D) und der Überstand nach Sterilfiltration durch eine Filter mit 0,45 µm Porengröße (FP30/0,45 CA-S, Kat.Nr. 10 462 950, Whatman® Schleicher & Schuell, UK) in Kryotubes bei -70°C eingelagert. Tupferproben wurden über 24 h bei 4°C in 2 ml PBS-Puffer eluiert. Falls die Extraktion nicht sofort im Anschluss erfolgte, wurde das Eluat in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß bei -70°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.4 Detektion von Antikörpern gegen PCV2 mittels Flüssigchip-Technologie

3.4.1 Das LiquiChip®-System

Für die Untersuchungen zur Etablierung eines Nachweisverfahrens von Antikörpern gegen PCV2 auf der Basis einer Flüssigchip-Technologie wurde das LiquiChip®-System der Firma Qiagen (Hilden, D) verwendet. Dieses basiert auf der xMAP®-Technologie der Firma Luminex Corporation (Austin, T, USA). Als Messsystem diente die LiquiChip®-Workstation, deren Herzstück - der LiquiChip®-Reader - mit zwei Lasern ausgestattet ist. Der so genannte Klassifizierungslaser gibt Licht mit einer Wellenlänge von 635 nm ab, der Reporterlaser hat eine Wellenlänge von 532 nm. Grundlage der xMAP®-Technologie bilden Polystyrol-Kügelchen (Beads) mit einem Durchmesser von 5,6 µm, die sich in einer flüssigen Phase befinden. Diese Beads enthalten im Inneren eine Mischung aus zwei fluoreszierenden Farbstoffen, die von Licht der Wellenlänge 635 nm (Klassifizierungslaser) angeregt werden. Die Emissionen der beiden Farbstoffe in den Beads werden in zwei Avalanchedioden aufgenommen, den Klassifizierungskanälen CL1 und CL2. Aus den Informationen der beiden Dioden wird das für die jeweilige Farbstoffmischung in den Beads spezifische Emissionsspektrum zusammengesetzt. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse ergeben sich so insgesamt hundert verschiedene Bead-Sets, die vom LiquiChip®-Reader differenziert werden können. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit mehrere Bead-Sets – die jeweils einem anderen Testanalyten zugeordnet werden – in einem Multiplex-Testansatz zusammenzugeben und mehrere Parameter zeitgleich zu analysieren. Auch in funktioneller Hinsicht werden verschiedene Bead-Typen unterschieden. Durch die variierende Beschaffenheit der Oberfläche werden verschiedene Kopplungsmöglichkeiten vorgegeben. Beads mit Nickel-NTA oder Penta-His-Antikörpern auf der Oberfläche können an Biomoleküle mit einer 6xHis-Sequenz binden. Über kovalente Bindungen werden Biomoleküle an Beads mit Carboxy-Gruppen oder reaktiven Disulfidgruppen gekoppelt.

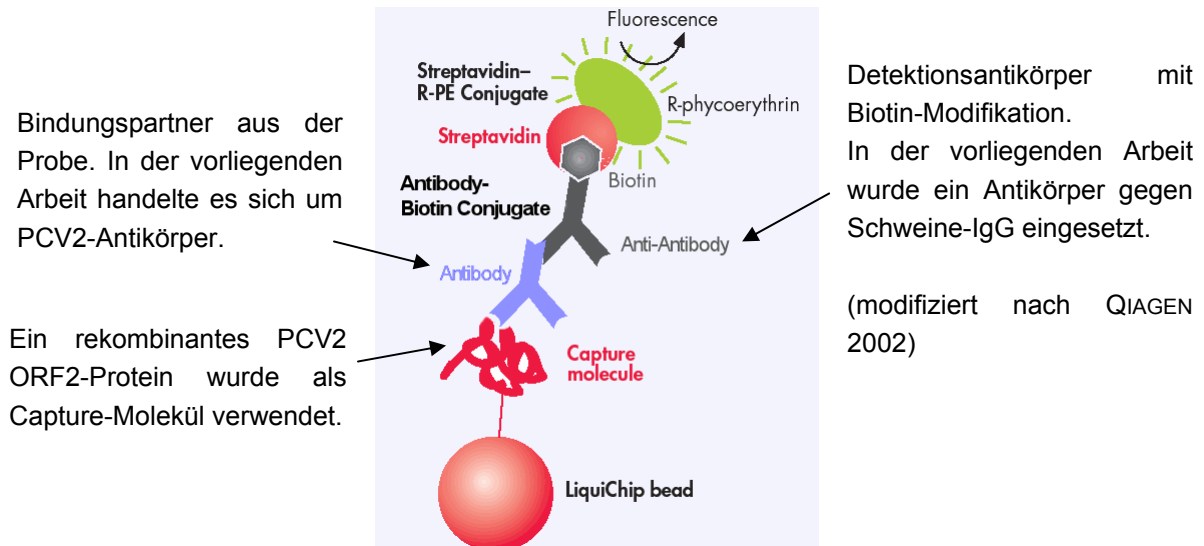
Abbildung 3-1: Chemische Oberflächenstruktur der LiquiChip®-Beads



Die gekoppelten Biomoleküle - in der vorliegenden Arbeit handelt es sich um ein Protein als Antigen - stellen den Bindungspartner zu den Testanalyten, den Antikörpern, dar. Werden Bead-Lösung und Testmaterial zusammengegeben, so bilden die gesuchten Moleküle einen Antigen-Antikörperkomplex und binden auf diese Weise indirekt an die Beads. Mit Hilfe eines fluoreszierenden Detektionsreagenz wird der Komplex nachgewiesen. In den meisten Fällen wird ein kommerziell erhältlicher Sekundärantikörper, der für den Testanalyten spezifisch ist

– z.B. ein Antikörper gegen das Schweine-Immunglobulin G – verwendet, der mit einem Fluorophor oder mit Biotin konjugiert ist, das seinerseits einen stabilen Komplex mit Streptavidin-R-Phycoerythrin eingeht. Das Detektionsreagenz wird durch den Reporterlaser (532 nm Wellenlänge) zur Fluoreszenz angeregt, die von dem Reporter-Kanal, einem Photomultiplier mit der Detektionsbreite von 565 – 585 nm, aufgenommen wird.

Abbildung 3-2: LiquiChip®-Komplex



Die in den Photodioden ermittelten Fluoreszenzsignale werden als Median Fluorescence Intensity (MFI) mittels der zugehörigen Computersoftware berechnet und ausgegeben. Die Signale des Reporter-Kanals werden jedoch nur dann ausgewertet, wenn sie in Verbindung mit einem Signal aus den Klassifizierungslasern eingehen. Die Klassifizierung muss dem für den jeweiligen Lauf definierten Bead-Set entsprechen. Eine dritte Avalanche-Diode sorgt dafür, dass nur Bead-Signale in einem begrenzten Größenbereich aufgenommen werden. Auf diese Weise kann verhindert werden, dass Bead-Aggregate oder Luftblasen als Signal gewertet werden. Mit Hilfe des angeschlossenen PC-Systems lassen sich alle Bedienungsvorgänge steuern und Auswertungen der Ergebnisse durchführen. Zusätzlich ist es möglich, qualitative und quantitative Messungen durchzuführen. Mit Hilfe von parallel gemessenen Standards werden die Fluoreszenzwerte in die entsprechenden Einheiten, z.B. µg/ml, umgerechnet.

3.4.2 Puffer

Sämtliche Versuche und Reaktionen für die Etablierung des LiquiChip®-Systems zur Detektion von PCV2-Antikörpern wurden mit selbst hergestellten, sterilfiltrierten Puffern durchgeführt. Für die Kopplungsreaktion des Proteins an Carboxy-Beads und Activated-Beads wurden Hepes-Puffer, 50 mM, pH 7,4 (Hepes, Kat.Nr. H-4034) zur Verdünnung und PBS, pH 7,4, (NaH₂PO₄, 10 mM, Kat.Nr. 71507; NaCl, 150 mM, Kat.Nr. S-6191) als Waschpuffer verwendet. Die fertig gekoppelten Beads wurden in PBS/1% BSA, pH 7,4, gelagert und auf die entsprechende Gebrauchs-Konzentration verdünnt. Der PBS/1% BSA-Puffer enthielt:

- NaH₂PO₄, 10 mM, Kat.Nr. 71507
- NaCl, 150 mM, Kat.Nr. S-6191

- Bovines Serum Albumin (BSA), 1% (w/v), Kat.Nr. A-7030
- Natriumazid, 0,05 % (w/v), Kat.Nr. S-8032

Der alternativ eingesetzte PBS/0,1% BSA-Puffer enthielt 0,1% (w/v) BSA. Die im Rahmen der Kopplung an Carboxy-Beads notwendige Aktivierungsreaktion wurde mit NaH_2PO_4 , 10 mM, pH 6,3 (NaH_2PO_4 , Kat.Nr. H-4034) als Aktivierungspuffer durchgeführt. Nur in den Kopplungen nach KHAN et al. (2005) wurde die Molarität des Puffers auf 100 mM erhöht. Der Hepes-Puffer wurde zudem als Dialyse-Puffer und zur Verdünnung des Proteins genutzt. Reaktionsansätze für die Antikörperdetektion, die Verdünnung der Testseren, der Detektionsantikörper und des Streptavidin-R-Phycoerythrin wurden standardmäßig mit PBS/1% BSA-Puffer durchgeführt. Abweichungen sind an entsprechender Stelle vermerkt. Zur Bestimmung der Konzentration der Beads nach erfolgter Kopplung wurden diese in PBS-TBN, pH 7,4 verdünnt. Der PBS-TBN-Puffer setzte sich zusammen aus:

- NaH_2PO_4 , 10 mM, Kat.Nr. 71507
- NaCl, 150 mM, Kat.Nr. S-6191
- Bovines Serum Albumin (BSA), 0,1% (w/v), Kat.Nr. A-7030
- Tween[®], 0,02 % (w/v), Kat.Nr. P-9416

Alle Reagenzien wurden von der Firma Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bezogen. Die einzelnen Inhaltsstoffe wurden abgewogen und in eine autoklavierte Glasflasche gegeben. Nach Zugabe von ca. 950 ml Wasser zur Analyse (Applichem, Kat.Nr. A1991 9025) wurde der pH-Wert mit Salzsäure (Applichem, Kat.Nr. A1434-1000), Natronlauge (Applichem, Kat.Nr. A1432-1000) oder Kalilauge (Merck, Darmstadt, D, Kat.Nr. 1.09107.1000) auf den entsprechenden Wert eingestellt und anschließend mit Analysewasser auf ein exaktes Volumen von 1000 ml eingestellt. Sämtliche Puffer wurden durch einen Filter mit 0,45 μm Porengröße (FP30/0,45 CA-S, Kat.Nr. 10 462 950, Whatman[®] Schleicher & Schuell, UK) in eine autoklavierte Glasflasche sterilfiltriert. PBS/1% BSA- und PBS/0,1% BSA-Puffer wurden bei 4°C gelagert, die übrigen Puffer bei Raumtemperatur. Für den Gebrauch wurden Aliquots von 20 ml in Einmalgefäße mit Schraubverschluss (Greiner bio-one, Frickenhausen, D, Kat.Nr. 210-261) abgefüllt.

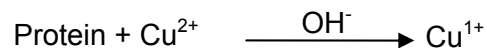
3.4.3 PCV2 ORF2-Protein für die Kopplung

Ein rekombinantes Strukturprotein des PCV2, das im ORF2-Bereich des PCV2-Genoms kodiert ist, wurde als Antigen an die LiquiChip[®]-Beads gekoppelt. Rekombinante ORF2-Proteine haben eine starke Neigung zur Aggregation und lagern sich zu Virus-like Particles (VLPs) zusammen. Diese Viruspartikel weisen eine mit dem PCV2-Virion vergleichbare Morphologie auf (NAWAGITGUL et al. 2000). Ein rekombinantes ORF2-Protein mit einem Molekulargewicht von 30kDa wurde freundlicherweise von Merrill Schaeffer, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., USA, als Capture-Molekül zur Verfügung gestellt. Dieses Protein wurde in Baculoviren exprimiert und anschließend durch Größen-Ausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) aufgereinigt. Die Analyse mittels SDS-PAGE ergab einen Reinheitsgrad von über 95% und über die densitometrische Bestimmung eine Konzentration von etwa 0,4 mg/ml für die erste Charge bzw. 1 mg/ml für die zweite Charge (Daten nicht gezeigt).

Die Kopplung des Proteins an die Activated-Beads beruht auf einer kovalenten Bindung der freien Thiolgruppen des Proteins an die aktiven Gruppen der Beads. Aus diesem Grund darf die Proteinlösung keine Komponenten mit freien Thiolgruppen wie z.B. β -Merkaptoethanol

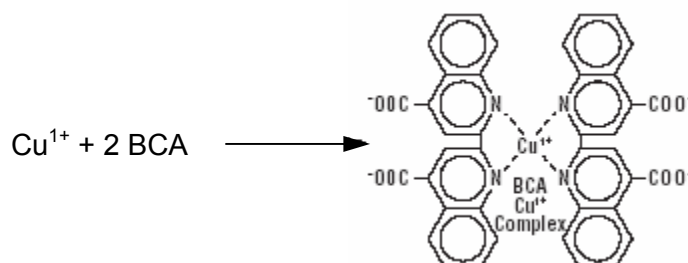
oder DTT enthalten, da diese die erwünschte Proteinkopplung inhibieren können. Entsprechend dürfen bei der Kopplung des Proteins an Carboxy-Beads keine Komponenten mit freien Aminogruppen, z.B. Tris, in der Proteinlösung enthalten sein. Da das PCV2 ORF2-Protein in einem Puffer vorlag, der sowohl 20 mM Tris als auch 5 mM DTT enthielt, musste vor der Kopplung ein Pufferaustausch erfolgen. Zu diesem Zweck wurde eine Dialyse mit den Slide-A-Lyzer[®] MINI Dialyse-Einheiten von Pierce (Slide-A-Lyzer[®] MINI Dialysis Units, Pierce, Rockford, IL, USA, Kat.Nr. 69570) durchgeführt. Diese enthalten eine semi-permeable Membran aus Zellulose, die nur Moleküle mit einer Größe unter 10 kDa wie z.B. Tris oder DTT passieren lässt. 500 – 1000 ml 50 mM Hepes wurden als Dialyse-Puffer in ein Becherglas gegeben und auf einem Magnetrührer (IKAMAG KM02 basic, IKA-Works, Staufen, D) bei einer Motordrehzahl von ca. 600/min in Bewegung gehalten. Die Dialyse-Einheiten enthielten 100 – 150 µl der Proteinlösung und wurden in einer Styroporhalterung auf der Oberfläche des Dialyse-Puffers platziert. Die Einheiten wurden so in der Halterung fixiert, dass sich der Flüssigkeitsspiegel des Proteins über dem des Hepes-Puffers befand. So konnte sichergestellt werden, dass kein rückwärtiger Flüssigkeitseinstrom in das Dialyse-Gefäß erfolgte. Die Dialyse wurde bei einer Temperatur von 4°C für zwei Stunden im Kühlschrank durchgeführt.

Nach jeder Dialyse wurde das Protein quantifiziert. Dies erfolgte mit Hilfe eines BCA-Reaktionsansatzes nach SMITH et al. (1985) und durch Messung der Absorption des dabei entstandenen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 562 nm. Grundlage der BCA-Reaktion ist die Fähigkeit der Bicinchoninsäure in alkalischer Umgebung mit Kupferionen (Cu^{1+}) einen violetten Komplex zu bilden. Die Kupferionen (Cu^{2+}) werden zusammen mit der Bicinchoninsäure zu dem zu quantifizierenden Protein gegeben. In der zunächst stattfindenden Biuret-Reaktion werden die zweifach positiv geladenen Kupferionen in Anwesenheit der Proteine zu Cu^{1+} -Ionen reduziert.



Diese bilden mit der Bicinchoninsäure einen stabilen Farbkomplex, der eine große Toleranz gegenüber nichtionischen Detergenzien und Puffersalzen zeigt.

Abbildung 3-3: Farbkomplex der Bicinchoninsäure mit Kupfer



(PIERCE 2005)

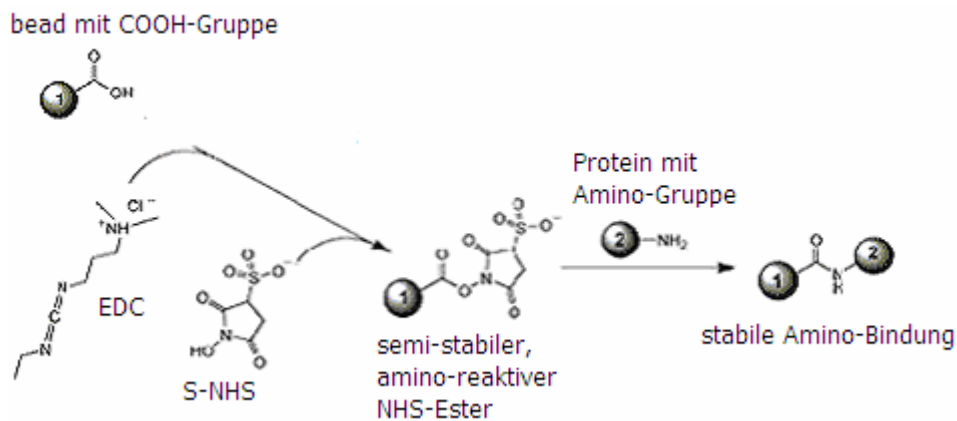
Die Reaktionsansätze wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zur exakten Umrechnung der gemessenen Absorptionswerte wurde in jedem Ansatz eine Standardkurve mit BSA erstellt und die Konzentration des Proteins mit ihrer Hilfe bestimmt.

3.4.4 Kopplung des Proteins an LiquiChip®-Beads

Für die Kopplung des PCV2 ORF2-Proteins, das keine Verlängerungen oder Modifikationen enthält, eignen sich Beads, die den Kopplungspartner entweder über Carboxy-Gruppen oder über Disulfidbrücken binden. Es wurden daher sowohl Carboxy-Beads als auch Activated-Beads eingesetzt, um den optimalen Ansatz ermitteln zu können.

Jedes Carboxy-Bead trägt an seiner Oberfläche etwa 10^8 COOH-Gruppen. Diese werden durch Zugabe von N-[3-dimethylaminopropyl]-N-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) in Anwesenheit von N-Hydroxysulfosuccinimid (S-NHS) zu semi-stabilen, amino-reaktiven S-NHS-Estern (STAROS et al. 1986). Da S-NHS-Ester mit Aminogruppen eine kovalente Bindung eingehen, wird diese Reaktion genutzt, um Biomoleküle mit freien Aminogruppen an den Beads zu fixieren.

Abbildung 3-4: Kopplung der Carboxy-Beads an die Aminogruppen des Proteins



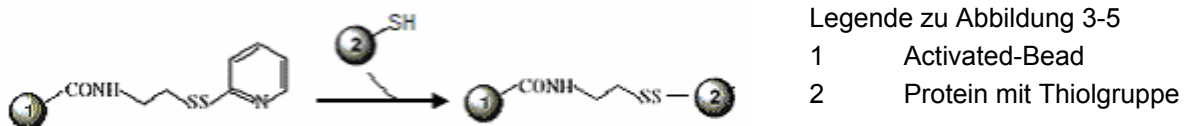
(modifiziert nach PIERCE 2007)

Das Gefäß mit der Stammlösung der Carboxy-Beads (LiquiChip® Carboxy Beads, Qiagen, Hilden, D, Kat.Nr. 922404) wurde zunächst für drei Minuten auf einem Vortexer durchgemischt und anschließend für mindestens 30 min bei 400-600 rpm auf einem Vortexer mit Schüttleraufsatz (MS 1.1, Standardaufsatz, IKA-Works, Staufen, D, Kat.Nr. L001260) geschüttelt. 500 – 1000 µl Stammlösung wurden in ein Reaktionsgefäß (Fisherbrand® Reaktionsgefäß 1,5 ml, Fisher Scientific, Schwerte, D, Kat.Nr. 3544350) gegeben und mindestens drei Minuten bei 10000 g bis zur Bildung eines deutlichen Pellets abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 200 µl-Schritten vorsichtig abgenommen. Eventuell noch vorhandene Schlieren aus Bead-Aggregaten wurden durch erneutes Zentrifugieren aus dem Überstand in das Pellet verbracht. Das Bead-Pellet wurde in 80 µl Aktivierungspuffer Na₂PO₄ (10 mM) durch Vortexen resuspendiert. 10 mg EDC (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. 03449) und 10 mg S-NHS (*N*-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. 56485) wurden jeweils in 200 µl Aqua dest. gelöst. Jeweils 10 µl dieser Lösungen wurden zu den resuspendierten Beads gegeben und durch mildes Vortexen vermischt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit Aluminiumfolie umwickelt und für 20 Minuten bei 400-600 rpm auf einem Vortexer mit Schüttleraufsatz inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Beads erneut für drei Minuten bei 10000 g bzw. bis zur vollständigen Pelletierung zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt worden war, erfolgte die Zugabe

von 250 – 500 µl der Proteinlösung (entsprechend 50 % des Anfangsvolumen der Bead-Stammlösung) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für zwei Stunden, lichtgeschützt bei 400-600 rpm auf dem Schüttler. Nach Pelletierung der Beads (3 min, 10000 g) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 10000 g) und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 500 – 1000 µl PBS/1% BSA (entsprechend dem Anfangsvolumen an eingesetzter Bead-Stammlösung) resuspendiert.

Die Activated-Beads (LiquiChip® Activated Beads, Qiagen, Hilden, D, Kat.Nr. 922540) sind an ihrer Oberfläche mit Spacer-Molekülen (10^6 /Bead) versehen, die an ihrem Ende reaktive Disulfidgruppen tragen. Diese gehen mit Thiolgruppen, die im Capture-Molekül enthalten sind, stabile Verbindungen ein und fixieren diese somit an der Oberfläche der Beads.

Abbildung 3-5: Bindung der Activated-Beads an die Thiolgruppen des Proteins



(modifiziert nach BIACORE 2002)

Die Stammlösung der Activated-Beads wurde zunächst für drei Minuten auf stärkster Stufe des Vortexers durchmischt und weitere 30 min bei 400-600 rpm im Schüttleraufsatz agitiert. Das zu koppelnde Bead-Volumen (100 - 500 µl) wurde in ein Reaktionsgefäß von Fisher Scientific (Fisher Scientific, Schwerte, D, Kat.Nr. 3544350) gegeben. Da die Beads in der Stammlösung in MES-Puffer vorliegen, die Kopplung jedoch in Hepes-Puffer erfolgte, wurden die Beads zunächst pelletiert (3 min, 10000 g) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in gleichem Volumen Hepes-Puffer wieder resuspendiert. 50 – 250 µl Proteinlösung (entsprechend 50 % des Volumens an Bead-Stammlösung), die zuvor mit Hepes-Puffer auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml verdünnt worden war, wurde zu den Beads gegeben. Das Bead-Proteingemisch wurde lichtgeschützt zwei Stunden bei 400 – 600 rpm auf dem Schüttelaufsatz inkubiert. Anschließend wurden die Beads pelletiert (3 min, 10000 g), der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung (3 min, 10000 g) und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in PBS/1% BSA aufgenommen. Das Volumen entsprach dem zu Anfang eingesetzten Volumen an Bead-Stammlösung.

3.4.5 Bestimmung der Anzahl an Beads in gekoppelter Lösung

In jedem Reaktionsansatz wurden etwa 1250 gekoppelte Beads mit Testserum zusammengegeben. Um diese Zahl zu erhalten, musste die Zahl der Beads pro Milliliter fertiger Bead-Lösung bestimmt und auf eine Konzentration von $1,25 \times 10^5$ Beads/ml eingestellt werden. 10 µl dieser verdünnten Bead-Lösung enthielten etwa 1250 Beads. Die Anzahl der in einem Milliliter gekoppelter Bead-Lösung enthaltenen Beads wurde mit Hilfe der LiquiChip®-Workstation bestimmt. In vier Kavitäten einer 96er-Mikrotiterplatte wurden 90 µl PBS-TBN Puffer und 10 µl der gut geschüttelten Bead-Suspension gegeben und

vermischt. Das Analyseprogramm wurde so gewählt, dass 50 µl aspiriertes Volumen 80 Sekunden lang gemessen wurden. Während dieser Zeit wurden nahezu alle in dem Testvolumen befindlichen Beads gezählt. Da stets ein Totvolumen von etwa 20 µl vorhanden ist, das zwar aspiriert, aber nicht gemessen wird, bezieht sich die Anzahl der Beads auf 30 µl. Die Messwerte der vier Proben wurden gemittelt und anschließend unter Berücksichtigung der zehnfachen Verdünnung auf ein Volumen von einem Milliliter hochgerechnet.

3.4.6 Detektionsantikörper

Die erfolgreiche Bindung eines im Testserum befindlichen PCV2-Antikörpers wurde mit Hilfe eines Sekundärintikörpers bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Antikörper der Firma dianova (Hamburg, D) eingesetzt. Diese polyklonalen Antikörper wurden aus der Ziege gewonnen, richten sich gegen IgG-Antikörper und sind mit Biotin konjugiert. Je nach Testserum wurden biotinylierte Antikörper mit der Spezifität für IgGs aus dem Schwein, dem Kaninchen oder der Maus verwendet. Die Antikörper wurden jeweils in 2 ml Aqua dest. und 2 ml Glycerol (Glycerol from plant (min 99%), Serva, Heidelberg, D, Kat.Nr. 23176.01) gelöst und in 20 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

3.4.7 Reaktionsansatz für die Antikörperdetektion im LiquiChip®-System

Die Beads sind photosensitiv und verlieren unter zu langem Lichteinfluss ihre Fluoreszenzkraft. Aus diesem Grund wurden die Inkubationsschritte unter Lichtschutz durchgeführt. Die Agitation auf dem Schüttleraufsatz des Vortexers bzw. auf den Thermoschüttlern erfolgte grundsätzlich bei 600 rpm und Raumtemperatur. Alle getesteten Seren und Antikörperlösungen wurden unmittelbar vor der Zugabe in die LiquiChip®-Reaktionsansätze für fünf Minuten bei 13000 g zentrifugiert. Auf diese Weise wurden größere Partikel und Schwebeteilchen entfernt, die unter Umständen die Aspirationsnadel des Analyse-Gerätes verstopfen können. Anschließend wurden die Seren mit PBS/1% BSA-Puffer verdünnt und zu dem Ansatz gegeben. Es wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen eingesetzt, die im Folgenden für jede Versuchsbeschreibung gesondert angegeben werden.

Die Suspension mit gekoppelten Beads wurde zunächst drei Minuten auf stärkster Stufe des Vortexers aufgemischt und im Anschluss für mindestens 30 Minuten bei 400 – 600 rpm auf dem Schüttleraufsatz in Bewegung gehalten. Für jeden Einzel-Ansatz wurden 1250 gekoppelte Beads benötigt; diese Menge ist in 10 µl der auf eine Konzentration von $1,25 \times 10^5$ Beads/ml eingestellten Bead-Suspension enthalten.

Überschüssiges Material wurde aus dem Reaktionsansatzes mit Hilfe von Waschschritten bei angelegtem Vakuum entfernt. Die Waschvorrichtung setzte sich zusammen aus einer Vakuumpumpe (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, Kat.Nr. 260BR), einer Vakuum-Waschkammer (QIAvac 96, Qiagen, Hilden, D, Kat.Nr. 19504) und Filterplatten im 96er-Mikrotiterformat (LiquiChip® Filter Microplates, Qiagen, Hilden, D, Kat.Nr. 922920). Um eine optimale Bindung der Reaktionspartner zu ermöglichen und eine Sedimentation der Beads zu verhindern, wurde die Platte während aller Inkubationsschritte auf einem Thermoblock (Eppendorf, Hamburg, D, Kat.Nr. 5355000.011) bei 600 rpm geschüttelt. Die nicht benötigten Kavitäten der Filterplatte wurden mit selbstklebender Aluminiumfolie (Abgene, Epsom, UK, Kat.Nr. AB-0626) abgedeckt und 50 µl PBS/1% BSA-Puffer in die verbleibenden Kavitäten gegeben.

Nach 30 Sekunden Inkubation bei 600 rpm wurde die Platte auf die Vakuumkammer gesetzt und der Puffer über einen Zeitraum von maximal 10 Sekunden bei einem maximalen Vakuum von 600 mbar entfernt. Nach jedem Vakuumschritt wurde die Unterseite der Platte auf einem saugfähigen Tuch abgetupft, um eventuelle Flüssigkeitsreste zu entfernen und somit die Kapillarwirkung dieser Flüssigkeiten zu unterbrechen. Andernfalls können diese zu einer spontanen Entleerung der Kavitäten führen. 50 µl PBS/1% BSA-Puffer wurden mit 10 µl Bead-Suspension und 10 µl Testserum in einer Kavität zusammengegeben. Die Platte wurde mit selbstklebender Polypropylen-Folie abgedeckt und 90 min auf dem Thermoschüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit in der Vakuumkammer entfernt. Insgesamt dreimal wurden in jede Kavität 150 µl PBS/1% BSA gegeben, für 30 s auf dem Thermoschüttler inkubiert und danach die Flüssigkeit jeweils abgezogen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe von 100 µl PBS/1% BSA sowie von 10 µl Biotin-Ak (0,02 mg/ml). Nach 90 min Inkubation auf dem Thermoschüttler wurden 20 µl SA-PE (0,1 mg/ml) hinzugegeben und weitere 30 min auf dem Thermoschüttler inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde in der LiquiChip[®]-Workstation analysiert.

Dieses Grundprotokoll für Reaktionsansätze mit Waschsritten wurde im Laufe der Optimierungsphase geringfügig variiert. Die vorgenommenen Abänderungen werden an entsprechender Stelle beschrieben.

Abweichend hierzu erfolgten die ersten Etablierungsversuche der Methode nach einem Protokoll ohne Waschsritte auf einer 96er-Mikrotiterplatte ohne Filterboden. Die Volumina und Konzentrationen der einzelnen Reagenzien waren identisch, ebenso die Inkubationszeiten. Lediglich die Inkubationsphase nach Zugabe von SA-PE wurde nach Einführung der Waschsritte von 90 min auf 30 min reduziert. Die Platte wurde während der Inkubationsschritte nicht permanent auf dem Thermoschüttler agitiert, sondern lediglich zu Anfang und Ende der Inkubationsphase. Die statistische Auswertung der MFI-Werte erfolgte nach der T-Test-Methode mit Hilfe des Statistikprogrammes „The SAS[®] System“, Release 8.2 (TS2MO). Als signifikant wurden Abweichungen der MFI-Werte mit einem t-Wert < 0,05 gewertet.

3.4.8 Indirekter Fluoreszenz Antikörper Test (IFAT) zum Nachweis und zur Quantifizierung von Antikörpern gegen PCV2

Der als Referenzmethode für die Etablierung der Flüssigchip-Technik verwendete PCV2-IFAT wurde gemäß bioScreen SOP S 016.0 durchgeführt. Vido-R1-Zellen wurden in 96er Platten simultan mit PCV2-Virusmaterial (PCV2 RefS p. 13, reference Lot # 538-090203, Titer $10^{5,5}$ TCID₅₀/ml, 100 µl pro well) infiziert. Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens (ca. 48 h bei 36,5°C, 4% CO₂) erfolgten ein bis zwei Waschgänge mit PBS. Anschließend wurden 100 µl eiskaltes Ethanol in jede Vertiefung gegeben und maximal 20 min bei -20°C gelagert. Die zu testenden Serumproben, die positiven und die negativen Referenzseren wurden in seriellen Verdünnungsreihen mit Vido-R1-Medium ohne FKS verdünnt. Nach Entfernung des Ethanols und gründlicher Trocknung der Platten wurden je 100 µl von jeder Verdünnungsstufe in drei Vertiefungen pipettiert. Nach Inkubation (60 min, 37°C) wurde erneut mit PBS gewaschen und in jede Vertiefung 100 µl Anti-Swine IgG FITC-Konjugat in einer Verdünnung 1 in 150 mit PBS pipettiert. Es folgten eine zweite Inkubationsphase (60 min, 37°C) und zwei weitere Waschgänge mit PBS. Nach Zugabe von 100 µl PBS/Glycerol-Lösung (50/50, v/v) wurde die Auswertung mittels UV-Mikroskop vorgenommen.

3.5 Multiplex-PCR zur Amplifikation von Genomfragmenten aus PCV2, FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2 in einem Reaktionsansatz

3.5.1 Extraktion der Nukleinsäuren

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus Organmaterial wurde das RNeasy[®] Mini Kit von Qiagen (Hilden, D, Kat.Nr. 74106) verwendet. Das Prinzip dieser Extraktionsmethode beruht auf den selektiven Bindungseigenschaften von Silicagel-Membranen. Je nach Zielsetzung und Probenart wurden Material eines Organs oder ein Organpool aus Lunge, Milz und Lymphknoten genutzt. Hierzu wurden etwa 20 mg Organmaterial mittels 350 µl Lysispuffer und 1 % β-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. M-7522) bei 30 Hz für sechs Minuten in der Schwingmühle lysiert. Durch das stark denaturierende Guanidinisothiocyanat im Lysispuffer wurden vorhandene Ribonukleasen inaktiviert und somit die RNA stabilisiert. Die Zugabe von Ethanol gewährleistet beim anschließenden Auftragen auf das Zentrifugensäulchen eine optimale Bindung der Gesamt-RNA an die Silica-Membran. 70 Teile 96%iges Ethanol (Applichem, Darmstadt, D, Kat.Nr. A1615) wurden mit 26 Teilen Aqua dest. verdünnt und 400 µl dieses 70%igen Ethanols zugegeben. Durch die folgenden Zentrifugations- und Waschschriffe wurden nicht gebundene Bestandteile ausgewaschen. Durch Zugabe von 65 µl 80°C warmem, RNase freiem Wasser, Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten und Zentrifugation (1 Minute bei 9500 g) wurde die RNA eluiert.

Die RNA aus Serum, Zellkulturüberständen und Tupferproben wurde mit dem QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, D, Kat.Nr. 52906) extrahiert. Die Extraktion beruht auf den gleichen Mechanismen wie die Extraktion aus Organmaterialien. Zu 140 µl Serum, Zellkulturüberstand oder Tupfer-PBS-Eluat wurden 560 µl des AVL-Puffer gegeben und die Mischung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der AVL-Puffer ist mit Carrier-RNA versetzt, die durch Absättigung der Silicagel-Membran die Ausbeute der viralen RNA erhöht. Nach Zugabe von 560 µl 96%igem Ethanol wurde das Material in zwei Schritten zu je 630 µl auf das Zentrifugenröhrchen mit der Silicagel-Membran pipettiert und jeweils eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Im ersten Waschschriff wurden 500 µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben und diese eine Minute bei 6000 g zentrifugiert, im zweiten Schritt wurden 500 µl AW2-Puffer hinzugegeben und nun drei Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurden 65 µl AVE-Puffer mit einer Temperatur von 80°C auf die Säule gegeben, diese fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute bei 6000 g zentrifugiert.

Die DNA aus Organmaterial wurde mit dem DNeasy[®] Tissue Kit (Hilden, D, Kat.Nr. 69506) gewonnen. Die Lyse des Zellmaterials erfolgte hierbei durch eine Puffermischung aus 90 % ATL-Puffer und 10 % Proteinase K (Aktivität 600 mAU/ml), von der jeweils 200 µl zu etwa 20 mg Organmaterial gegeben wurden. Diese Mischung wurde bei 55°C mindestens 3 – 24 h unter Agitation in einem Thermoblock (TB1 Thermoblock, Kat.Nr. 051-200, Heizaufsatz 20 x 2,0 ml, Kat.Nr. 051-213, Whatman Biometra[®], Göttingen, D) inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL-Puffer wurde nochmals für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die gesamte Probe wurde nach Zufügen von 210 µl 96%igem Ethanol auf das Säulchen mit der Silicagel-Membran gegeben. Nach einer Minute Zentrifugation bei 6000 g wurden 500 µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben und diese erneut eine Minute bei 6000 g

zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 500 µl AW2-Puffer und Zentrifugation über drei Minuten bei 16000 g. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 90 µl AE-Puffer mit einer Temperatur von 70°C, Inkubation bei 70°C für fünf Minuten und Zentrifugation für eine Minute bei 6000 g.

Die Extraktion viraler DNA aus Serum, Tupferproben sowie Zellkulturüberständen erfolgte mit Hilfe des QIAamp[®]DNA Blood Mini Kit von Qiagen (Hilden, D, Kat.Nr. 51106). Es wurden 200 µl Probenmaterial mit 225 µl eines Gemisches aus 89 % AL-Puffer und 11 % Protease für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die anschließenden Schritte wurden nach dem Protokoll zur DNA-Extraktion aus Organmaterial durchgeführt.

3.5.2 Anzucht der Referenzstämme

Die Anzucht des PCV 2 erfolgte auf porzinen Retinazellen (Vido-R1). Die PRRSV-Referenzstämme wurden auf MA-104-Zellen vermehrt. Diese aus Affennierenzellen abgeleitete permanente Zelllinie wurde ebenso wie die Vido-R1-Zellen von Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., USA, zur Verfügung gestellt.

Für die Antibiotika-Stammlösung, mit der PBS-Waschlösung und Zellkulturmedien in einer Konzentration von 1,6 ml/l versetzt wurden, wurden 106 IE Penicillin G (Biochrom AG, Berlin, D, Kat.Nr. A 321-44) und 1,0 gr Streptomycin Sulfat (Biochrom AG, Berlin, D, Kat.Nr. A 331-27) in 14 ml PBS-Puffer gelöst.

Für das Medium zur Anzucht der MA-104-Zellen wurde MEM-Eagle-Medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), Gibco[®] (Invitrogen), Carlsbad, CA, USA, Kat.Nr. 11966-025] mit 6 % Fetalem Kälberserum von Gibco[®] (Invitrogen), (Carlsbad, CA, USA, Kat.Nr. 26140-079), 1 % D-(+)-Glucose Lösung (45 % in Wasser mit Zellkulturqualität, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. G8769), 1 % L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, D, Kat.Nr. K 0202) und 1 % MEM Non Essential Amino Acids (NEAAs) von Gibco[®] (Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA, Kat.Nr. 11140-035) versetzt. Das Erhaltungsmedium bestand zu 95 % aus MEM-Eagle-Medium mit 2 % fetalem Kälberserum, 1 % Glukose-Lösung, 1 % L-Glutamin und 1 % NEAAs.

Das Anzuchtmedium für die Vido-R1-Zellen enthielt 94 % MEM-Medium mit Earle's Salzen (2,2 gr/l NaHCO₃) von der Firma Biochrom AG (Berlin, D, Kat.Nr. FG 0325) sowie 5 % fetales Kälberserum und 1 % NEAAs. Das Erhaltungsmedium setzte sich zusammen aus 97 % MEM-Earle-Medium mit einem Zusatz von 2 % fetalem Kälberserum und 1 % NEAAs.

Die Passagierung der Zellen und die Herstellung von Titrationsplatten wurden unter Sicherheitswerkbänken der Klasse 2 (Herasafe, HS 12, Kat.Nr. 51013393, Heraeus, Hanau, D) durchgeführt. Alle Reagenzien wurden im Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C gebracht. Nach makro- und mikroskopischer Untersuchung des Zellmonolayers wurde das alte Zellkulturmedium entfernt und der Zellrasen mit 10 ml PBS-Puffer (PBS-Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, D, Kat.Nr. L-1825), versetzt mit 0,2 % Antibiotika-Lösung, gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Trypsin-EDTA (Biochrom AG, Berlin, D, Kat.Nr. L-2143) auf die Zellen gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ für zwei Minuten inkubiert. Nach Abschütten der Trypsin-EDTA-Lösung wurde erneut 3 - 4 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, bis sich der weißliche Zellrasen sichtbar ablöste. Durch Zufügen von 5 ml Zellkulturmedium und nachfolgendem Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen zusätzlich mechanisch vereinzelt. Die vereinzelt Zellen wurde auf neue Zellkulturflaschen oder -platten verteilt und dabei mit Kulturmedium verdünnt. 1 ml der Zellsuspension vermischt mit 8,6 ml Anzuchtmedium

wurden in 100 µl-Aliquots auf die Vertiefungen einer 96er-Flachboden-Mikrotiterplatte (BD Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, USA, Kat.Nr. 353072) gegeben. Die MA-104-Zellen wurden bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens (24 – 48 Stunden) bei 37°C im Brutschrank (BBD6220, Kat.Nr. 50047468, Heraeus, Hanau, D) inkubiert. Die Vido-R1-Zellen wurden simultan, d.h. direkt nach der Einsaat infiziert.

3.5.3 Virusquantifizierung

Die Bestimmung des Virusgehaltes der Zellkulturüberstände von PCV2, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2 erfolgte durch die Endverdünnungsmethode. Die bei –70°C gelagerten virushaltigen Zellüberstände wurden nach dem Auftauen mit Erhaltungsmedium in logarithmischer Reihe (\log_{10}) bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-7} verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl in sechsfacher Ausführung in die Vertiefungen einer 96er-Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben. PRRSV-haltige Virussuspension wurde auf den konfluenten Zellrasen der MA-104-Zellen (Zellmonolayer) gegeben; die VidoR1-Zellen wurden direkt nach der Einsaat der Zellen mit PCV2-haltigem Material inokuliert. Nach sieben Tagen Inkubation bei 37°C (Brutschrank BB16, Kat.Nr. 1013684, Heraeus, Hanau, D) konnte die Vermehrung von PRRSV anhand des zytopathischen Effektes unter dem Mikroskop (Olympus IX50, Hamburg, D) ausgewertet werden. Da PCV2 auf Zellen zu keinem zytopathischen Effekt führt, wurde die Vermehrung mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Hierzu wurde der Überstand der Zellkultur abgenommen, verworfen und die am Boden des Gefäßes verbliebene Zellschicht mit 96%igem Ethanol (200 µl/96er-Plattenvertiefung) bei –20°C mindestens für 30 Minuten fixiert. Anschließend wurde die Zellplatte zweimal mit PBS gewaschen. Der PCV2-Antikörper (169-2HG, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., USA) wurde mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:500 – 1:1000 verdünnt, in jede 96er-Plattenvertiefung 60 µl dieser Verdünnung hinzugefügt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS-Puffer bevor 60 µl FITC-Antikörper [Ziege Anti-Schwein gegen IgG (H+L), FITC konjugiert, Dianova, Hamburg, D Kat.Nr. 114-095-003] in einer Verdünnung mit PBS-Puffer von 1:150 – 1:200, in jede Vertiefung gegeben wurden. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, einmal mit Aqua dest. nachgespült und in jede Vertiefung 100 µl Glycerol-PBS-Puffer hinzugegeben. Der Glycerol-PBS-Puffer enthielt 99%iges Glycerin (Applichem, Darmstadt, D, Kat.Nr. A4443) und PBS-Puffer zu gleichen Teilen. Die erfolgreiche Anzucht konnte anhand der Fluoreszenz der Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beurteilt werden. Der Virustiter wurde nach SPEARMAN (1908) und KAERBER (1931) berechnet und als $TCID_{50}$ (50% Tissue Culture Infectious Doses) angegeben. Dieser Wert definiert die Verdünnungsstufe einer Virussuspension, in der mit 50%iger Wahrscheinlichkeit ein infektiöses Viruspartikel vorhanden ist. Der reziproke $TCID_{50}$ -Wert entspricht dem Virustiter (infektiöse Viruspartikel / Volumen).

3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion

3.5.4.1 Primer für die Einparameter-PCR und die Multiplex-PCR

Nach DIEFFENBACH et al. (1993) wird Spezifität definiert als die Häufigkeit, mit der fehlerhafte Anlagerungen eines Primers, die zu unerwünschten Zusatzamplifikaten führen können, auftreten. Effizienz beschreibt die Fähigkeit eines Primerpaares, die maximal mögliche

Verdopplung der DNA-Stränge während eines Zyklus zu erzielen. Ein optimales Primerpaar hat demnach ein Minimum an Fehlbindungen bei maximaler Amplifikationsleistung. Um ein solches Primerpaar zu erhalten, wurden bei der Konzeption der Multiplex-Primer folgende Kriterien (DIEFFENBACH et al. 1993, EDWARDS et al. 1994, HENEGARIU et al. 1997, ROUX 1995, ELNIFRO et al. 2000, QIAGEN® MULTIPLEX PCR HANDBOOK 2004) berücksichtigt:

- Mindestlänge 28 – 30 Basenpaare
- Homologie des 3´Ende zum Zieltemplate
- Heterologie zum 3´Ende der beteiligten Primer
- $T_m \sim 60^\circ\text{C}$
- GC-Gehalt $\sim 50\%$
- eindeutige Amplifikatlängen
- mindestens eine, maximal drei Guaninbasen oder drei Cytosinbasen am 3´-Ende
- Keine Palindromsequenzen oder Sekundärstrukturen
- Keine PolyA-, G-, C-, T-Abfolgen

Bei der Berechnung der Schmelztemperatur von Primern mit mehr als 20 Nukleotidbasen sind nach DIEFFENBACH et al. (1993) thermodynamische Parameter zu berücksichtigen. Die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer wurden anhand der Software „FastPCR“ (V3.04.11) berechnet, dieser liegt die Nearest Neighbour Thermodynamic-Theorie von SANTALUCIA (1998) zugrunde. Die Software steht über die Internetadresse <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1.html/oligos.htm> (zitiert vom 29.01.2008) zur Verfügung. Zur Festlegung der Primer wurden die Sequenzen der Referenzisolate, weiterer bei bioScreen sequenzierter sowie in Genbank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), Bethesda, MD 20894, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>, zitiert vom 29.01.2008) verfügbarer Virusisolate verwendet. Mit Hilfe der Computerprogramme AlignIR™ V2.0 von Li-Cor (Lincoln, NE, USA) und GeneDoc V2.6.001 (<http://www.nrbsc.org/downloads/>, zitiert vom 29.01.2008) wurden die für PCV2, FLUAVsw, den europäischen bzw. den nordamerikanischen Genotyp von PRRSV spezifischen Sequenzen verglichen und eine Konsensussequenz gebildet. In konservierten Bereichen wurden Primer festgelegt, wobei darauf geachtet wurde, den Längenunterschied zu den bereits definierten Amplifikaten der anderen Parameter möglichst groß zu halten (EDWARDS et al. 1994, AGÜERO et al. 2004). Im Falle von FLUAVsw wurde besonderen Wert darauf gelegt, dass beide Primer mindestens spezifisch für die FLUAVsw-Stämme H1N1, H1N2 und H3N2 sind. Anschließend wurden die physikochemischen Eigenschaften Nukleotidlänge, Schmelztemperatur, die Tendenz zur Dimerisierung sowie in begrenztem Ausmaß auch der GC-Gehalt aller vier Primerpaare mit Hilfe des Computerprogrammes FastPCR überprüft und an die oben aufgeführten Kriterien angepasst. Die so festgelegten Primer wurden im BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Suchprogramm des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, zitiert vom 29.01.2008) auf ihre Spezifität überprüft. Primer wurden nicht verwendet, wenn die BLAST-Suche eine Bindung an das Genom eines anderen als den gewünschten porzinen Krankheitserreger ergab. Die finalen Primer wurden erneut mit dem Sequenzalignment verglichen und empirisch auf ihre Zuverlässigkeit getestet.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, bezogen. Die lyophilisiert gelieferten Nukleotide wurden zunächst nach Herstellerangaben in DEPC-

Wasser gelöst. Ausgehend von einer 100 µM Stammlösung wurden Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 20 µM hergestellt. Sämtliche Primerlösungen wurden bei –20°C gelagert. Die mit den Fluoreszenzmarkierungen IRD700 und IRD800 modifizierten Primer für die Sequenzierungs-PCR 2 wurden ebenfalls über MWG-Biotech bezogen, bei –20°C gelagert und vor der Verwendung auf eine Konzentration von 2 µM verdünnt.

Die Primerkombinationen der bei bioScreen in der Routinediagnostik eingesetzten PCRs für PRRSV Typ 1, Typ 2, FLUAVsw, PCV2 sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 9-1 bis Tabelle 9-3). Die Primer für PRRSV Typ 1 sind im Bereich des ORF 7, die Primer für PRRSV Typ 2 im ORF 7 (sense-Primer) bzw. in dem 3' nicht translatierten Bereich (NTR), der an ORF 7 anschließt (antisense-Primer) lokalisiert. Der Nachweis von PCV2 erfolgt durch Primer, die das ORF2-Gen erfassen. Die Annealingbereiche der Primer für die FLUAVsw-PCR liegen im Matrix-Gen. In der vorliegenden Arbeit dienten diese PCR-Methoden als Referenzverfahren für die Beurteilung der Multiplex-PCR.

Die Primer für die Multiplex-PCR wurden nach den zuvor erläuterten Grundsätzen für die Amplifikation von PRRSV-Typ 1, PRRSV-Typ 2, PCV2 und FLUAVsw in einer Multiplex-PCR konzipiert. Sie sind in denselben Abschnitten des Genoms lokalisiert wie die Primer der Referenz-PCRs. Einzige Ausnahme stellt der sense-Primer für PRRSV-Typ 2 dar, der in den Bereich des ORF 6 verlagert wurde. Die Sequenzdaten der Multiplex-Primer finden sich im Anhang in Tabelle 9-4 bis Tabelle 9-6.

3.5.4.2 Durchführung der PCR

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die einzelnen Arbeitsschritte in strikter räumlicher Trennung durchgeführt. Die Erstellung der Reaktionsansätze erfolgte unter pathogenfreien Verhältnissen unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2. Die Zugabe des Templates erfolgte in einem separaten Raum; für die Amplifikation im Thermozykler sowie die Detektion der PCR-Produkte standen ebenfalls getrennte Räumlichkeiten zur Verfügung. Es wurden der Thermozykler T3, Kat.Nr. 050-703 sowie der Gradientenzykler TGradient, Kat.Nr. 050-801 der Firma Whatman Biometra® (Göttingen, D) eingesetzt. Die Zugabe der RNA, cDNA bzw. DNA des Feldprobenmaterials bzw. der Referenzisolate erfolgte auf Eis. Multiplex-PCRs ohne Transkriptionsphasen wurden erst bei einer Temperatur oberhalb der Annealingtemperatur in den vorgeheizten Thermozykler gestellt. Zur Überprüfung auf mögliche Kontaminationen wurde in etwa 10 – 15 % der Ansätze Aqua dest. anstelle des Probenemplates eingesetzt. Bei den RNA- bzw. DNA-Aufarbeitungen wurde ebenfalls je eine Probe ohne Template parallel mitgeführt und im Anschluss in der PCR auf Kontamination überprüft. Die erfolgreiche Amplifikation wurde anhand von Positivkontrollen bestätigt. Zu diesem Zweck wurde RNA respektive DNA der Referenzstämme in der Kontroll-PCR amplifiziert. Je nach Versuchsansatz wurden eine singuläre Kontrolle und/oder eine Vierfachkontrolle, bestehend aus einer Mischung der Nukleinsäuren von PRRSV-Typ 1, PRRSV-Typ 2, PCV2 und FLUAVsw verwendet. Im Anschluss an die Amplifikation wurden die PCR-Produkte für maximal 48 Stunden bei 4°C gelagert, bevor die Auswertung durch die Agarosegelelektrophorese erfolgte.

3.5.4.3 PCRs der Routinediagnostik

Für die PCRs der Routinediagnostik wurden folgende Materialien verwendet:

- Taq DNA Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, Kat.Nr.201207)

- Qiagen® OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland Kat.Nr. 210212),
- RNAsin® RNase Inhibitor von Promega (Madison, WI, USA, Kat.Nr. N211B)
- dNTPs (Promega, Madison, WI, USA, Kat.Nr. U1240); die Stammlösung der dNTPs wurde auf eine Konzentration von 10 µM je Nukleotid verdünnt.

Die Durchführung der PCRs erfolgte nach den bei bioScreen etablierten Standardarbeitsanweisungen.

Die Untersuchungen auf PRRSV-spezifische Genomfragmente wurden gemäß der Methode nach PESCH (2003) durchgeführt. Der Nachweis setzt sich zusammen aus einer RT-PCR zur Transkription und Amplifikation eines für den europäischen (Typ 1) und den nordamerikanischen (Typ 2) Genotyps des PRRS-Virus spezifischen Genomfragmentes und zwei anschließenden nested PCRs, die jeweils ein für PRRSV-Typ 1 (Primer P-EU-7-14684-s und P-EU-7-14903-as) bzw. PRRSV-Typ 2 (P-US-14970-s und P-US-7-15306-as) spezifisches Genomfragment von 241 bzw. 337 bp amplifizieren.

Der Nachweis von PCV2-DNA erfolgt mit Hilfe einer PCR, die ein 490 bp langes Fragment des Genoms amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden von LIU et al. (2000) publiziert.

Die in der FLUAVsw-PCR verwendeten Primer bilden ein Amplifikat mit einer Länge von 613 bp im Bereich des für das Matrixprotein des Influenzavirus codierenden Genombereiches. Auch hier wird das Prinzip einer RT-PCR mit anschließender nested PCR verfolgt.

3.5.4.4 Reverse Transkription

Vor dem Einsatz in der Multiplex-PCR wurde die aus den Referenzisolaten von PRRSV und Influenzavirus sowie aus Feldproben extrahierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Für diese Reverse Transkription wurde die Omniscript® Reverse Transkriptase von Qiagen (Hilden, D, Kat.Nr. 205113) verwendet. Die Zusammensetzung der RT-Reaktion für einen Parameter entsprach den Empfehlungen des Herstellers. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten analog zur Verfahrensweise beim Ansetzen der PCRs. Es wurde jeweils der Multiplex-Antisense-Primer für den zu transkribierenden Parameter verwendet.

In einer weiteren RT-Reaktion wurden durch die Kombination von drei Antisense-Primern in einem Reaktionsansatz die RNAs der entsprechenden Viren gleichzeitig transkribiert. Die sonstigen Bedingungen der RT-Reaktion blieben unverändert. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die beschriebenen RT-Reaktionen sowie die jeweiligen Temperaturprofile im Thermozykler sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 9-7 und Tabelle 9-8).

3.5.4.5 Multiplex-PCR

Die Reaktionsansätze der Multiplex-PCR wurden mit dem Qiagen® Multiplex PCR Kit von Qiagen (Hilden, D, Kat.Nr. 206143) hergestellt.

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit der Primer für die verschiedenen Parameter in der Multiplexchemie wurden diese zunächst getrennt unter Multiplexbedingungen eingesetzt. Der PCR-Ansatz mit Multiplex-Primern für einen Parameter setzte sich zusammen aus den Bestandteilen des Qiagen® Multiplex PCR Kits und einem Multiplex-Primerpaar sowie dem zugehörigen Template. Im Falle von PCV2 wurde die DNA direkt eingesetzt. Die RNA von

FLUAVsw-, PRRSV-Typ 2 bzw. PRRSV-Typ 1 wurde zunächst in einer separaten Transkriptions-Reaktion in cDNA umgeschrieben und das RT-Produkt in die PCR eingesetzt. Für die gleichzeitige Amplifikation spezifischer Genomsequenzen für PCV2, PRRSV-Typ 1, PRRSV-Typ 2 und FLUAVsw aus positiven Templates wurde dieser PCR-Ansatz so abgeändert, dass alle hierfür erforderlichen Multiplexprimer und Templates zu dem Reaktionsansatz zugefügt wurden. Als Template wurde neben DNA auch cDNA aus einer separat durchgeführten reversen Transkription eingesetzt. Die Reaktionsansätze und Temperaturprofile der Multiplex-PCRs können Tabelle 9-9 und Tabelle 9-10 im Anhang entnommen werden.

3.5.4.6 Multiplex-RT-PCR

Für die Kombination von reverser Transkription und PCR im Multiplex-Format (Multiplex-RT-PCR) wurde zusätzlich zu dem Qiagen® Multiplex Kit das Sensiscript® RT Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, Kat.Nr. 205213) sowie der RNasin® RNase-Inhibitor von Promega (Madison, WI, USA, Kat.Nr. N211B) verwendet.

Der Ansatz zur Prüfung der Einzelparameter in der Multiplex RT-PCR enthielt alle für die Transkription und Amplifikation benötigten Komponenten, jedoch wurde nur ein Multiplex-Primerpaar zugegeben (Anhang, Tabelle 9-11).

Für die gleichzeitige Amplifikation spezifischer Genomsequenzen für PCV2, PRRSV-Typ 1, PRRSV-Typ 2 und FLUAVsw aus positiven Templates wurde dieser PCR-Ansatz so abgeändert, dass alle hierfür erforderlichen Multiplexprimer zu dem Reaktionsansatz zugefügt wurden (Anhang, Tabelle 9-12). Sie umfasste somit sowohl die reverse Transkription der RNA-Viren, als auch die simultane Amplifikation von PRRSV-Typ 1, PRRSV-Typ 2, FLUAVsw, PCV2.

3.5.5 Detektion der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel und anschließender Betrachtung unter UV-Licht detektiert (SAMBROOK et al. 1989). PCR-Amplifikate liegen als doppelsträngige DNA in definierter Länge vor. Aufgrund von Phosphatgruppen sind diese DNA-Sequenzen negativ geladen und bewegen sich in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Auspolymerisierte Agarose bildet ein Molekularsieb, dessen Porengröße mit zunehmender Agarosekonzentration sinkt. Die Größe der erwarteten PCR-Amplifikate bestimmt somit die Konzentration des Gels. Größere PCR-Amplifikate erfahren eine stärkere Verzögerung durch die Siebstruktur, so dass die aufgetragene DNA abhängig von der Amplifikatgröße unterschiedlich schnell zur Anode wandert. Eine Auftrennung der DNA ist die Folge. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der doppelsträngigen DNA, so dass diese sich unter UV-Licht bei 312 nm als deutlich abgrenzbare, fluoreszierende Bande darstellt. Ein parallel aufgetrennter Molekulargewichtsmarker (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Kat.Nr. 15628-019) ermöglicht einen Vergleich und somit eine Längenbestimmung der PCR-Amplifikate. Bei der Herstellung der Gele wurde TAE-Puffer (Qbiogene, Montreal, Kanada, Kat.Nr. TAE50x1, für den Gebrauch wurde das Konzentrat 1 in 50 in deionisiertem Wasser verdünnt) mit Agarose (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA, Kat.Nr. 820723) in einer Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung der Agarose aufgeköcht. Die flüssige Agarose wurde mit 1-2% Ethidiumbromid (1 %ige Lösung in Wasser, Merck, Darmstadt, D, Kat.Nr. 1.11608.0030) versetzt und in

einen mit Klebeband abgedichteten Gelträger (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, Kat.Nr. 170-4524 und 170-4522) gegossen. Durch Einstecken von Kämmen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, Kat.Nr. 170-4529) in die noch flüssige Gellösung wurden die für das Auftragen der Proben notwendigen Taschen vorgeprägt. Vor dem Auftragen wurden 7 µl des PCR-Produktes (ABgene, Epsom, UK, Kat.Nr. AB-0900) mit 6 µl Bromphenolblau-Auftragspuffer in einer Mikrotiterplatte verdünnt; eventuelle Abweichungen von diesem Verfahren sind an entsprechender Stelle vermerkt. Die Stammlösung des Auftragspuffers enthielt Aqua dest. mit Konzentrationen von 40 % Saccharose (w/v) (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA, Kat.Nr. 821713), 0,25 % Bromphenolblau (v/v) (Merck, Darmstadt, D, Kat.Nr. 1.11608.0030) und 0,25 % Xylencyanol (v/v) (Serva, Kat.Nr. D-5758). Vor Gebrauch wurde die Stammlösung im Verhältnis 1 zu 1 mit Aqua dest. verdünnt. Nach dem Erkalten der Agarose wurden Klebeband und Kämmen entfernt und der Gelträger in eine mit TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, Kat.Nr. 170-4511) gesetzt. Das Agarosegel war zu 4–6 mm mit TAE-Puffer bedeckt. Das verdünnte PCR-Produkt wurde vollständig in die vorgeprägten Geltaschen pipettiert. Im Anschluss an die Auftrennung, die bei einer Feldstärke von 3-5 V/cm erfolgte, wurden die Banden unter UV-Licht bei 312 nm betrachtet und mittels Digitalfotografie und Ausdruck dokumentiert. Es wurde das Geldokumentationssystem von BioSciTec (Frankfurt am Main, D) verwendet.

3.5.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von unterschiedlich langen DNA-Sequenzen in einem Agarosegel können diese gezielt isoliert und aufgereinigt werden. Zur Isolierung der einzelnen Fraktionen eines DNA-Gemisches erfolgte die Trennung in präparativen Agarosegelen. Da kürzere Amplifikate in einem höherprozentigem Gel stärker aufgetrennt werden, wurde die Probe sowohl auf ein 1%iges als auch auf einem 1,5%iges Gel aufgetragen. Auf einem Blaulicht-Transilluminator wurden die gewünschten Banden anhand des DNA-Molekulargewichtsmarkers eindeutig bestimmt. Die längeren Banden der PCV2-Amplifikate (483 bp) und der PRRSV-Typ 2-Amplifikate (595 bp) wurden aus dem niedrigprozentigen, die Banden der FLUAVsw- (304 bp) und PRRSV-Typ 1-Amplifikate (241 bp) aus dem höherprozentigen Gel mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten. Nachdem das Gewicht der Gelstücke bestimmt worden war, erfolgte die Extraktion der DNA mit dem Jetsorb Gel Extraction Kit von Genomed (Löhne, Deutschland, Kat.Nr. 110150) gemäß bioScreen SOP GT 032.0. Das Kernstück dieser Extraktionsmethode ist eine Suspension aus Silica-Membrankügelchen. Die DNA bindet bei hoher Salzkonzentration an diese Membranen, bei niedriger Salzkonzentration geht sie wieder in Lösung über. Im ersten Schritt wurden 10 µl der Suspension aus Membrankügelchen sowie A1-Puffer (300 µl /100 mg Gelstück) zu dem ausgeschnittenen Gelstück in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dieser A1-Puffer enthält einerseits das Enzym Agarase, andererseits eine hohe Salzkonzentration. Somit wurde durch Lyse des Agarosegels die DNA freigesetzt und gleichzeitig an die Membrankügelchen gebunden. Die enzymatische Lyse wurde durch Inkubation und Agitation im Thermoblock für 15 min bei 50°C und 8 g thermisch und mechanisch unterstützt. Amplifikate, die kürzer als 300 bp waren, wurden bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Die übrigen in Lösung gebliebenen Bestandteile der Reaktion wurden nach Pelletieren der Membrankügelchen durch Zentrifugation (1 Minute bei 16000 g) mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit

300 µl des ebenfalls stark salzhaltigen A2-Puffer versetzt und durch Agitation gemischt. Anschließend wurde erneut für eine Minute bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Dieser Waschprozess wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Anschließend wurde das Pellet in einem Labor-Vakuum-Konzentrator (Heraeus, Hanau, D, Kat.Nr. 50041694) bis zur Weißfärbung getrocknet (2 – 5 Minuten). Durch Zugabe von 50 µl Aqua dest., Inkubation für 5 min bei 50°C (37°C) und Agitation bei 190 g wurde die DNA aus dem Pellet freigesetzt. Nach Zentrifugation bei 16000 g für eine Minute befand sich die gewünschte DNA im Überstand und wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei –20°C.

3.5.7 Sequenzanalysen der PCR-Produkte

Die Analyse der Sequenzen der PCR-Produkte wurde mit dem DNA Sequencer IR² Model 4200 von Li-Cor[®], (Lincoln, NE, USA) nach der Methode der Kettenabbruchreaktion von SANGER et al. (1977) in geringfügig modifizierter Form durchgeführt (MIDDENDORF et al. 1992). Im Anschluss an die Auftrennung der PCR-Produkte mit Hilfe eines Agarosegels und die Extraktion der DNA aus dem Gel wurde in der Sequenzierungs-PCR 1 an die zu analysierenden PCR-Produkte sowohl am 5' als auch am 3'-Ende eine Sequenz aus 18 Nukleotiden angefügt. Zu diesem Zweck wurden die parameterspezifischen Primer der PCR mit der jeweiligen Sense- bzw. Antisense-M13 Sequenz verlängert (Firma MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) und in einer PCR (Sequenzierungs-PCR 1) mit den aufgereinigten PCR-Produkten eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR 1 ist im Anhang (Tabelle 9-13) aufgeführt.

Tabelle 3-1: Primer der Sequenzierungs-PCR 1

Bezeichnung	Sequenz
M13-Sense-xxx	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT xxx-3'
M13-Antisense-xxx	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC xxx-3'

xxx steht für den spezifischen Anteil des Sequenzierungsprimers.

In der Sequenzierungs-PCR 2 bildete dieser M13-Tag die Bindungsstelle für den mit IRD700 bzw. IRD800 fluoreszenzmarkierten M13-Primer (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Fluoreszenzmarkierte Primer für die Sequenzierungs-PCR 2

Bezeichnung	Sequenz
M13-Universal-Primer	5'-IRD700-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
M13-Antisense-Primer	5'-IRD800-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

Diese M13-Primer wurden zunächst mit dem Template der Sequenzierungs-PCR 1, Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr.-D2650) und Aqua dest. in einem Reaktionsansatz zusammengegeben (Anhang, Tabelle 9-14). Nach Aliquotierung jeder Probe auf vier mit A, C, G beziehungsweise T gekennzeichneten Vertiefungen einer 96er-Mikrotiterplatte wurden 1,5 µl des entsprechenden Reagenz (A, C, G, T reagent premix) aus dem Thermo Sequenase[®] DYEnamic[™] Direct Cycle Sequencing

Kit (7-deaza-dGTP) von GE Healthcare (Amersham Bioscience) (Piscataway, NJ, USA, Kat.Nr. US79535) zugegeben und mit einem Tropfen Chill-out-Wax 14 (Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland, Kat.Nr. 621707 bzw. CHO-1411) abgedeckt. Jedes dieser vier Reagenzien setzte sich zusammen aus den vier 2'-Desoxynucleotiden Adenosin (dATP), Cytosin (dCTP), Thymin (dTTP), Guanin (dGTP) und einem geringen Anteil von Didesoxynucleotiden (ddNTPs) jeweils einer anderen Nucleotidart. Der Einbau dieser Didesoxynucleotide, der so genannten Terminatoren, bewirkte den Abbruch der Einzelstrangverlängerung. Nach der PCR-Reaktion wurde jede Reaktion mit 6 µl Stop-Solution abgestoppt und 3 Minuten bei 70°C denaturiert.

Nach erfolgreicher Amplifikation finden sich in jedem der vier Reaktionsansätze DNA-Stränge unterschiedlicher Länge, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind und je nach enthaltenem Terminatortyp (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) enden. Gemäß den Herstellerangaben von Li-Cor wurde ein Gel aus 40 ml der KB Plus, 3,7 % Gel-Matrix (Li-Cor, Lincoln, NE, USA, Kat.Nr. 827-05214), 230 µl APS-Lösung und 23 µl Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. T7024) gegossen. Die Gelbildung erfolgt bei diesen Gelen durch Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid durch Zugabe von Ammoniumpersulfat-Lösung und dem Katalysator Temed zu Polyacrylamid (SAMBROOK et al. 1989). Die in Aqua dest. angesetzte APS-Lösung enthielt 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, Kat.Nr. 161-0700) und wurde in 300 µl-Aliquots bei -20°C gelagert. Die vier Reaktionsansätze aus der Sequenzierungs-PCR 2 wurden nebeneinander auf ein Polyacrylamid-Gel mit hoher Auflösung aufgetragen und die Analyse analog zur Gerätebeschreibung durchgeführt. Während der Auftrennung fuhr eine Laser- /Scanner-Einheit kontinuierlich auf einer Querebene des Gels entlang. Die Fluoreszenzmarkierungen an jedem Amplifikat wurden durch das von den beiden Laserdioden abgestrahlte Licht mit der Wellenlänge 680 nm respektive 780 nm zur Emission angeregt. Die Emissionsstrahlung wurde ihrerseits durch die Silicondioden der Scannereinheit erfasst. Die Information über das auf dem Gel entstandene Bandenmuster wurde auf diese Weise aufgenommen, in digitaler Form gespeichert und auf einem PC zur weiteren Bearbeitung und Auswertung zur Verfügung gestellt. Die Analyse der Sequenzierungsrohdaten erfolgte durch die Software der Firma Li-Cor, die Bestandteil des automatischen Sequenzierungsgerätes ist. Die Anzahl der dargestellten Banden entspricht theoretisch der Anzahl der Nucleotide des Amplifikates. Eine Bande an Position 150 im Reaktionsansatz mit einem Anteil von ddATPs zeigte, dass das analysierte Amplifikat an Position 150 ein Adenosin enthält. Die Kombination der vier Reaktionsansätze einer Probe ermöglichte so die Rekonstruktion der kompletten Sequenzabfolge des DNA-Amplifikates. Die Aneinanderlagerung und Angleichung verschiedener Sequenzen sowie die Verifizierung analysierter Sequenzen anhand von Vergleichsisolaten erfolgte mit Hilfe der AlignIR™ V2.0 Software von Li-Cor.

3.5.8 Aufreinigung von DNA mittels RNase-Verdau

Beim RNase-Verdau werden eventuell vorhandene RNA-Anteile aus DNA-Materialien enzymatisch entfernt. 90 µl der Probe wurden mit 3 µl Ribonuclease A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Kat.Nr. 109142) und 10 µl NEB2-Puffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, Kat.Nr. B7002S) versetzt, vermischt und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Aufreinigung der DNA mit dem High Pure PCR Product Purification Kit

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Kat.Nr. 11 732 668 001) durchgeführt und die DNA in 90 µl Puffer eluiert. Durch diese Aufreinigung werden RNase-Enzym und Pufferbestandteile entfernt, die mit den im Anschluss durchgeführten Reaktionen interferieren könnten. Um eine dem Ausgangsmaterial möglichst ähnliche DNA-Konzentration zu erhalten, wurde die DNA mit dem Auftragsvolumen von der Aufreinigungssäule eluiert.

3.5.9 Reinigung von PCR-Produkten und Nukleinsäuren

Im Anschluss an den RNase-Verdau wurden die Proben mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Kat.Nr. 11 732 668 001) aufgereinigt. Die Vorgehensweise erfolgte nach Handbuch; jedoch wurden statt 500 µl nur 100 µl des Guanidiniumisothiocyanat-haltigen Bindepuffers zur RT-Reaktion hinzugegeben.

3.6 Verbrauchsmaterialien

In allen Fällen in denen Pipettenspitzen verwendet wurden, kamen gestopfte Spitzen der Firma Biozym (Hessisch-Oldendorf, D) sowie Pipetten von Eppendorf (Hamburg, D) zum Einsatz. Eine Übersicht über verwendete Pipetten und Pipettenspitzen findet sich im Anhang (Tabelle 9-15).

Soweit nicht anders erwähnt, wurde mit 1,5 ml Reaktionsgefäßen von Eppendorf (Hamburg, D, Kat.Nr. 0030120.086) gearbeitet. Des weiteren wurden 5 ml-Pipetten (Kat.Nr. 606180), 10 ml-Pipetten (Kat.Nr. 607180) und 25 ml-Pipetten (Kat.Nr. 760180) von Greiner (Frickhausen, D) mit einem Pipettierhelfer (Brand, Wertheim, D, Kat.Nr. 26300) verwendet.

3.7 Geräte

Der Schüttler MiniShaker IKA MS1 der Firma IKA-Works (Staufen, D, Kat.Nr. L001500) mit dem zugehörigen Schüttleraufsatz MS 1.1 (Kat.Nr. L001260) wurde zum Vermischen von Reaktionsansätzen verwendet. Die Minizentrifuge Galaxy Mini (VWR, Darmstadt, D, Kat.Nr. 521-2812) wurde zum Anzentrifugieren der PCR-Reaktionsansätze eingesetzt. Mengen wurden mit der Waage Model 824-24 von Kern (Albstadt, D) abgemessen.

3.8 Aqua dest.

Es wurde mit dem in den PCR-Kits der Firma Qiagen enthaltenen Wasser gearbeitet. Ansonsten wurde DEPC-Wasser selbst hergestellt. Hierfür wurde Aqua dest. in einer Konzentration von 0,15 % mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. D – 5758) versetzt und 24 Stunden bei 35°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Diethylpyrocarbonats wurde 10 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Für Arbeiten im Rahmen der Methoden-Etablierung mit dem LiquiChip®-System, kam Wasser für die Analyse (Applichem, Darmstadt, D, Kat.Nr. A1991) zum Einsatz.

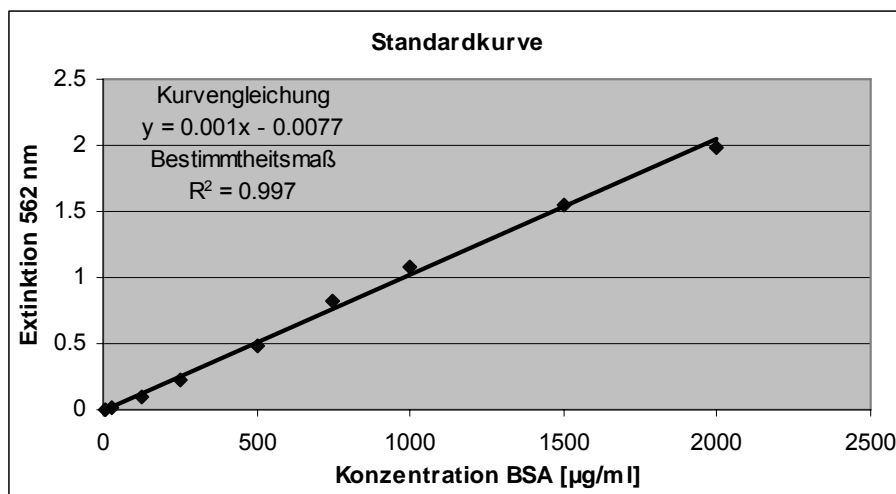
4 Ergebnisse

4.1 Detektion von Antikörpern gegen PCV2 mittels Flüssigchip-Technologie

4.1.1 Quantifizierung des Gesamtproteingehaltes

Für jede Proteinbestimmung mittels BCA wurde eine interne Standardkurve erstellt, die sich aus den Extinktionswerten der BSA-Kontrollen bekannter Konzentration ergab. Die Gleichung der Geraden für das erste dialysierte Proteinbatch lautete $y = 0,001x + 0,0077$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 99,7 % und wurde mit Microsoft® Excel bestimmt.

Abbildung 4-1: BCA-Protein-Quantifizierung, Standardkurve



Legende zu
 Abbildung 4-1:
 Dargestellt ist die
 Linearität der
 Standardkurve für
 den Dialyseansatz
 1 der ersten
 Proteincharge.

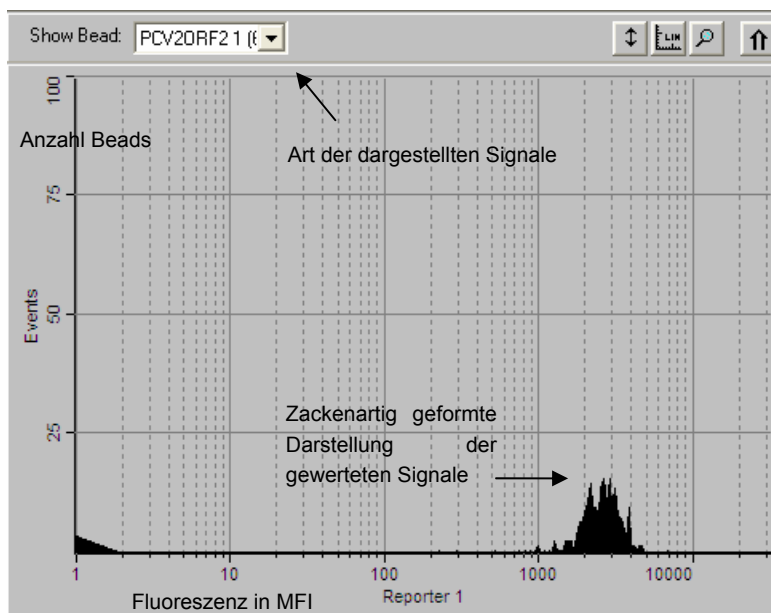
Die photometrischen Auswertungen der verschiedenen dialysierten PCV2 ORF2-Proteinbatches aus der ersten Proteincharge ergaben bei einer Wellenlänge von 562 nm Extinktionswerte von 0,542 bis 0,707. Mit Hilfe der Standardkurven ließen sich die Extinktionswerte in Konzentrationen von 520 bis 550 µg/ml umrechnen. Das dialysierte PCV2 ORF2-Protein aus einer weiteren Proteincharge ergab in der BCA-Quantifizierung eine Konzentration von 700 µg/ml.

4.1.2 Funktionsprüfung der Beads

Nach Kopplung der Beads wurde die Funktion in Anlehnung an die vom Hersteller empfohlenen Messprotokolle zur Antikörperdetektion geprüft. Dabei handelte es sich um humanmedizinisch relevante Systeme. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Ermittlung der Kopplungsverfahren mit der besten Fluoreszenzeffizienz sowohl Activated-Beads als auch Carboxy-Beads verwendet. Die Prüfung beider Kopplungsansätze erfolgte parallel. Der Prüfansatz wurde mit einem Messvolumen von 50 µl und einer Messzeit von 45 s pro Probe in der LiquiChip®-Workstation gemessen. Da PCV2-Infektionen im Feld weit verbreitet sind und Feldseren eine hohe Kreuzreaktivität mit PCV1 aufweisen, wurden zur Prüfung der Spezifität der Reaktion spezifisch hergestellte Antiseren mit den zugehörigen Kontrollseren verwendet. PCV2-negative Feldseren vom Schwein dienten zur Prüfung unspezifischer Bindungskapazitäten. Als Kontrollen dienten spezifische Seren, die zuvor in der jeweiligen Verdünnung im Immunfluoreszenztest und / oder in der Immunhistochemie als Referenzproben für die Validierung nach VICH verwendet wurden. Die PCV2-Kaninchen-pAk

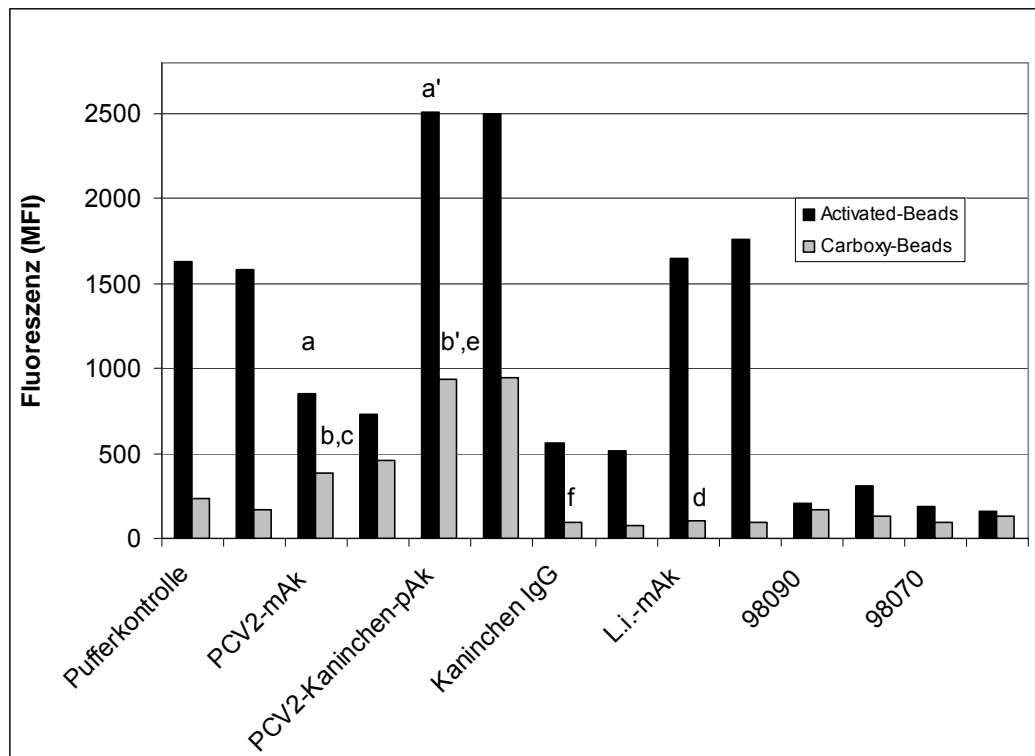
wurden 1:2000, der PCV2-Maus-mAk 1:200, das Kaninchen IgG 1:20000 (Endkonzentration: 1ng/µl), der L.intracellularis-Maus-mAk 1:1000 verdünnt und die PCV2-negativen Feldseren vom Schwein unverdünnt eingesetzt. Als Verdünnungspuffer diente hierbei PBS/1% BSA. Fluoreszenzwerte bis zu 2500 MFI für Activated-Beads und 1000 MFI für Carboxy-Beads bei positiven Kontrollseren und gleichzeitig signifikant niedrigere Werte mit den zugehörigen negativen Kontrollseren waren Anzeichen für eine spezifische Reaktion des LiquiChip®-Systems. Die Datenauswertung erfolgte anhand der Luminex®-Software. Diese zeigt nicht nur die MFI-Werte jeder gemessenen Probe an, sondern stellt die Details der Messung anhand eines Fluoreszenz-Histogrammes dar. Mit Hilfe dieser Darstellung können für jede Probe Rückschlüsse auf die Qualität der Kopplung und des Fluoreszenzsignals gezogen werden.

Abbildung 4-2: Histogramm des Versuchs zur Plausibilitätsprüfung



Legende zu Abbildung 4-2
In der Abbildung wird das Fluoreszenz-Histogramm einer Messung des PCV2-Kaninchen-pAK dargestellt. Auf der x-Achse ist der Fluoreszenzwert in MFI der Bead-Signale angeordnet, die y-Achse gibt Auskunft über die Anzahl der gezählten Beads. Es ergibt sich eine mediane Fluoreszenz (MFI) von 2504.

Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzwerte der mit jeder Probe gemessenen Beads (x-Achse), aufgetragen gegen die Anzahl der registrierten Beads (y-Achse). Der Fluoreszenzwert (MFI-Wert) einer Probe setzt sich zusammen aus den Einzelfluoreszenzwerten von mindestens 100 Beads, die pro Probe gemessen werden müssen. Je höher der y-Wert ist, desto mehr Beads wurden mit dem zugehörigen Fluoreszenzsignal registriert. Je weiter nach rechts auf der x-Achse die Signale angeordnet sind, desto höher ist der absolute Wert der Fluoreszenz. In dieser Form der Darstellung werden nur die Signale angezeigt, die innerhalb des definierten Größenbereichs der Beads liegen und einen Fluoreszenzwert bei 635 nm aufweisen, der dem im Analyseprogramm ausgewählten Bead-Farbcode entspricht. Der mediane Fluoreszenzwert dieser Bead-Signale bildet den MFI-Wert. Eine ideale Kopplung des Capture-Moleküls wird dargestellt durch einen klar abgegrenzten, möglichst hohen Zacken mit geringer Grundfläche. Eine breitere Grundfläche deutet ebenso wie eine flache Kuppe eine wenig homogene Kopplung an. In Abbildung 4-2 ist das Histogramm für eine Messung des PCV2-Kaninchen-pAk dargestellt. Die registrierten Fluoreszenzen formen einen gut abgegrenzten Zacken mit eindeutiger Spitze. Die für die eingesetzten Seren ermittelten MFI-Werte sind in Abbildung 4-3 dargestellt:

Abbildung 4-3: Funktionsprüfung an verschiedenen Beadtypen im Doppelansatz

Legende zu Abbildung 4-3:

MFI-Werte mit PCV2-spezifischen Seren und zugehörigen Kontrollseren

- PCV2-mAk (monoklonaler Ak gegen PCV2);
- L.i.-mAk (irrelevanter monoklonaler Antikörper),

der T-Test ist signifikant für cd.

- PCV2-Kaninchen-pAk (polyklonale Antikörper gegen PCV2);
- Kaninchen IgG (irrelevante polyklonale Antikörper),

der T-Test ist signifikant für ef.

Die MFI-Werte für Activated-Beads und Carboxy-Beads ergaben signifikante Unterschiede für die Testungen ab und a'b'. Pufferkontrolle und PCV2-negative Studienserum vom Schwein (98090, 98070) dienen zur Ermittlung unspezifischer Bindungsaktivität.

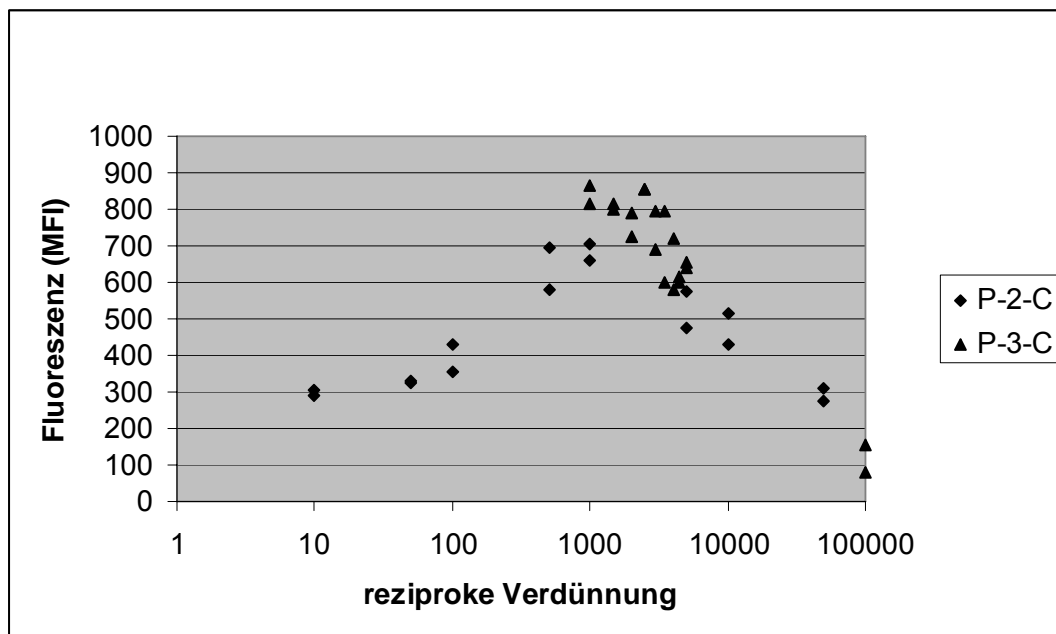
Die Messwerte mit den Activated-Beads lagen mit Ausnahme der PCV2-negativen Seren vom Schwein (98090, 98070) signifikant über denen mit Carboxy-Beads. Die Signifikanzen wurden mittels T-Test für PCV2-mAk ($p = 0,0364$), L.i.-mAk ($p = 0,0014$), PCV2-Kaninchen-pAk ($p < 0,0001$) und Kaninchen IgG ($p = 0,0029$) ermittelt. Beide Beads zeigten in der Doppelbestimmung nur sehr geringe Schwankungsbreiten mit den jeweiligen Seren. Das polyklonale PCV2-Kaninchen-Antiserum (pAk) zeigte mit beiden Beads die höchsten MFI-Werte, während die zugehörige Negativkontrolle (Kaninchen IgG) signifikant geringere MFI-Werte aufwies (Activated-Beads: $p = 0,0002$; Carboxy-Beads: $p < 0,0001$). Der PCV2-mAk reagierte mit beiden Beads deutlich schwächer. Der als mAk-Kontrolle eingesetzte monoklonale Antikörper gegen *L. intracellularis* ergab je nach Bead unterschiedliche Kontrollwerte. Während die MFI-Werte mit den Carboxy-Beads gegenüber dem PCV2-spezifischen mAk signifikant geringer waren ($p = 0,0145$), wurden mit den Activated-Beads höhere Werte als im PCV2-spezifischen Ansatz gemessen. Damit verhielt sich der irrelevante monoklonale Antikörper vergleichbar zur Pufferkontrolle. Die PCV2-negativen

Schweineseren ergaben mit MFI-Werten von <160 für die Carboxy-Beads und <300 für die Activated-Beads lediglich Hintergrundreaktionen.

4.1.3 Methodenetablierung mittels definierter Versuchsseren

Da die Activated-Beads ein hohes MFI-Signal sowohl mit der Pufferkontrolle als auch mit dem irrelevanten mAk gegen *L. intracellularis* aufwiesen und somit eine unspezifische Bindung nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die folgenden Versuche mit Carboxy-Beads durchgeführt. Um die Reaktivität der Positivkontrolle zu prüfen, wurde der PCV2-Kaninchen-pAk mit PBS/1% BSA-Puffer 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000; 1:10000 und 1:50000 verdünnt und mit Carboxy-Beads gemessen. Um den Bereich zwischen 1:1000 und 1:5000 weiter zu erfassen, wurden Zwischenverdünnungen hergestellt und in einem zweiten Versuchsansatz gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 4-4 dargestellt.

Abbildung 4-4: Titration von PCV2-Kaninchen-pAk



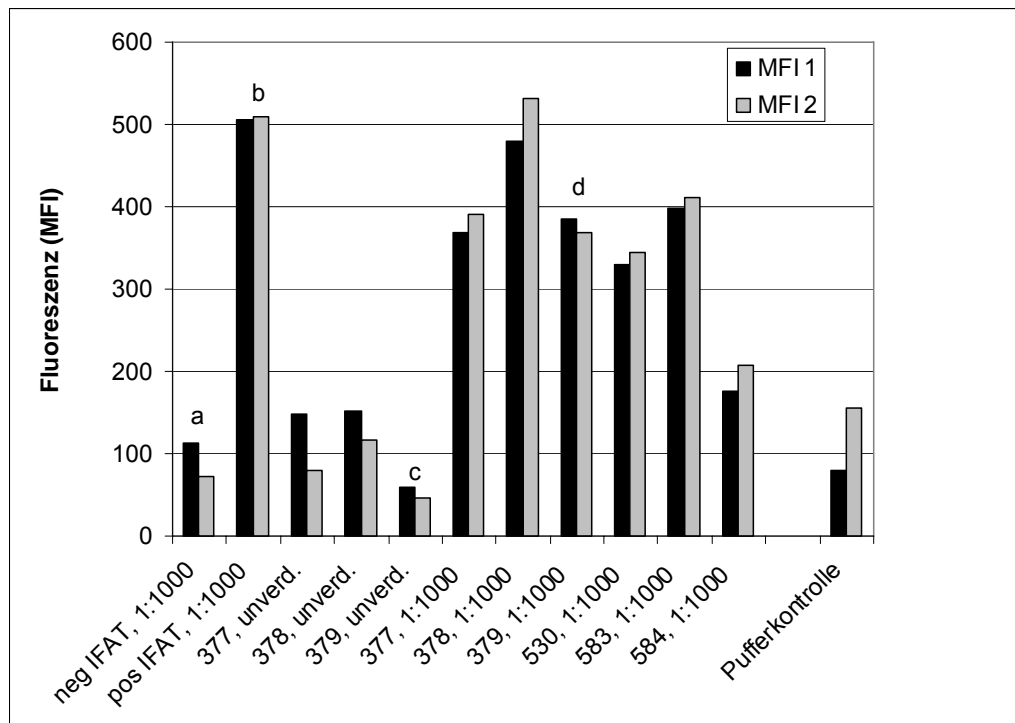
Legende zu Abbildung 4-4:

Titration des polyklonalen PCV2-Kaninchen-Antiserums zur Ermittlung des Reaktionsspektrums über verschiedene Verdünnungsstufen. (P-2-C: Versuchsansatz 1; P-3-C: Versuchsansatz 2).

Die Hintergrundreaktion wurde mittels PBS/1% BSA-Puffer ermittelt und unter der Verdünnungsstufe 1:100000 graphisch dargestellt.

Bis zu Verdünnungen von 1:100 wurden lediglich MFI-Werte bis zu 400 gemessen. Zwischen den Verdünnungsstufen 1:1000 und 1:4000 zeigte sich ein Plateau mit einem Peakwert von 854 bei der Verdünnung 1:2500. Danach erfolgte ein Abfall der MFI-Werte, die bei Verdünnungen von 1:10000 die Werte niedriger Verdünnungsstufen erreichten, aber immer noch über den Pufferwerten lagen. Die Etablierung des LiquiChip®-Systems an Seren aus dem Schwein erfolgte mit definierten, im IFAT positiv bzw. negativ getesteten Seren sowie Seren aus einem GCP-kontrollierten Infektionsversuch mit PCV2. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-5 zusammengefasst.

Abbildung 4-5: MFI-Werte definierter Schweineseren aus GCP-konformen PCV2-Versuchen



Legende zu Abbildung 4-5:

Das positive (pos IFAT) und negative Kontrollserum (neg IFAT) aus der IFAT-Validierung stammt von experimentell mit PCV2a infizierten SPF-Schweinen vor und nach Inokulation. Die Differenz der MFI-Werte ist signifikant im T-Test (ab). Die Seren 377-379 und 530, 583 und 584 stammen aus einem PCV2-Versuch mit konventionellen Schweinen nach Infektion mit einem PCV2b. Pufferansätze wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Die Proben wurden im Doppelansatz gemessen (MFI 1 und MFI 2). Das Serum 379 zeigt unverdünnt signifikant niedrigere MFI-Werte als 1:1000 verdünnt (cd).

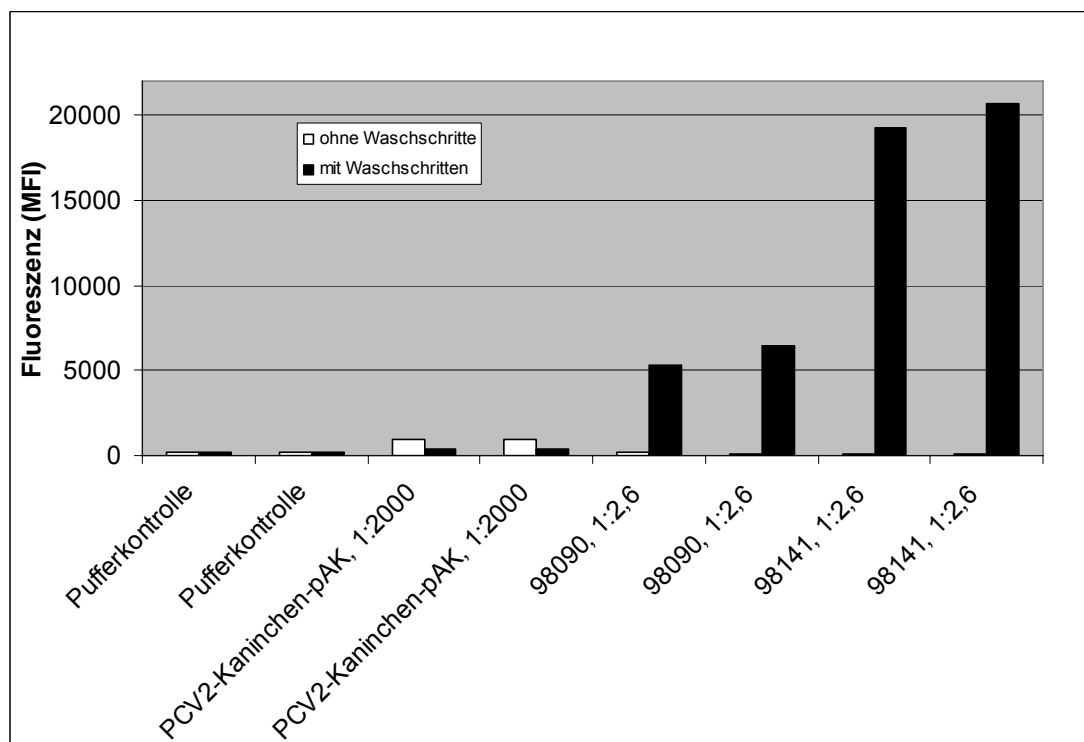
Der Positivserumpool (pos IFAT) ergab einen mittleren MFI-Wert von 507 gegenüber dem Negativserumpool (neg IFAT) von 92,75; der T-Test ergab mit $p = 0,0025$ für das Positivserum eine Signifikanz gegenüber dem Negativserum. Die PCV2-Antikörpertiter, die im IFAT ermittelt wurden, lagen bei 1:16000 für das Positivserum und $<1:20$ für das Negativserum. Die IFAT-Titer für die konventionellen Seren waren $\geq 1:1280$. Die Doppelmessungen zeigten mit Ausnahme der unverdünnt eingesetzten Schweineseren nur geringe Schwankungsbreiten. Während die Schweineseren in der Verdünnung 1:1000 mittlere MFI-Werten von 192 bis 505 gegenüber 118 bei den Pufferkontrollen ergaben, reagierten die unverdünnten Seren der Tiere 377-379 mit mittleren MFI-Werten zwischen 53 - 134 ähnlich wie das polyklonale PCV2-Antiserum aus dem Kaninchen in niedrigen Verdünnungsstufen. Damit konnten positive MFI-Werte nur nach Verdünnung der Schweineseren erzielt werden. Die Untersuchung des Serums 379 zeigte im T-Test, dass eine Verdünnung von 1:1000 zu einer signifikanten Zunahme der MFI-Werte ($p = 0,001$) führte.

4.1.4 Optimierungsversuche

4.1.4.1 Untersuchung des Einflusses von Waschschritten

Die durch die Verdünnung der Testseren erzielte Erhöhung der Fluoreszenzwerte ergab Hinweise auf das mögliche Vorhandensein von inhibitorischen Substanzen im Versuchsansatz. Es konnte sich hierbei um Serumbestandteile handeln. Durch die Verdünnung der Seren könnte die Konzentration dieser Bestandteile so reduziert worden sein, dass der inhibitorische Einfluss auf die Bindungsreaktion minimiert wurde. Durch Waschschriffe zwischen den einzelnen Inkubationsphasen sollten inhibitorische Substanzen und überschüssige Reaktionskomponenten aus dem Versuchsansatz weitgehend entfernt und dadurch eventuell auftretende Interaktionen vermindert werden. Die Waschschriffe erfolgten durch Anlegen eines Vakuums auf Mikrotiterplatten mit Filterboden. Mit Hilfe dieses Vakuums wurden Flüssigkeiten und kleine Partikel durch den Filterboden der Platten, der aus modifiziertem Nylon mit 0,2 µm Porengröße bestand, abgesaugt. Die Beads mit einer Größe von 5,6 µm und alle an diese gebundenen Komponenten wurden von der Membrane zurückgehalten.

Abbildung 4-6: Untersuchung des Einflusses von Waschschriffen an Feldseren



Legende zu Abbildung 4-6:

Die Feldseren 98090 und 98141 stammten von aus kontrollierten Versuchstierhaltungen und wurden sowohl mit und ohne Einbeziehen von Waschschriffen im Doppelansatz untersucht. Waschschriffe zwischen den Inkubationsphasen führten bei Feldseren vom Schwein in der eingesetzten Verdünnung zu einer massiven Erhöhung der MFI-Werte, während bei dem PCV2-Kaninchen-pAk eine Verminderung der MFI-Werte erfolgte.

Durch die Einführung von Waschschritten führten auch Versuchsansätze mit Feldseren in geringen Verdünnungen (1:2,6) zu hohen MFI-Werten gegenüber der Pufferkontrolle. Dabei konnten mit dem Feldserum 98090 MFI-Werte von 5303 und 6427 und mit dem Feldserum 98141 MFI-Werte von 19235 und 20700 erzielt werden. Diese Werte lagen etwa 50 bis 100-fach über den Werten mit Feldseren, die in Versuchsansätzen ohne Waschritte gemessen wurden und somit in Größenordnungen, die bei einigen humanmedizinischen Anwendungen erreicht werden. Obwohl PCV2-Kaninchen-pAk eher eine negative Beeinflussung zeigten, wurden weitere Untersuchungen unter Anwendung der Waschschritte durchgeführt.

In einem weiteren Reaktionsansatz wurden der PCV2-Kaninchen-pAk, das positive sowie das negative IFAT-Referenzserum in den Verdünnungsstufen 1:2,6, 1:1000, 1:2000, 1:3000 eingesetzt. Zusätzlich wurden drei positive und ein negatives Feldserum aus einem GCP-konformen PCV2-Infektionsversuch in den gleichen Verdünnungsschritten getestet. Die Antikörper-positiven Seren entstammten Tieren aus unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion mit PCV2-Virus. PCV2-DNA war in einigen Seren noch enthalten, in anderen ergab die PCV2-PCR bereits ein negatives Ergebnis. Der Reaktionsansatz wurde in einem LiquiChip®-Analyseprotokoll mit 75 µl Probenvolumen und 80 s Messzeit analysiert.

Die Schweineseren aus dem PCV2-Infektionsversuch zeigten eine Serokonversion, die in allen Verdünnungsstufen nachweisbar war (Abbildung 4-7). Die höchsten Werte ergaben sich bei der Verdünnung 1:2,6 mit mittleren MFI-Werten von 5865, 19968, 13919 und 12529 für die Tage 38, 63 und 161 nach Infektion. Da der höchste Wert am Tag 38 nach Infektion gemessen wurde und danach ein Abfall der MFI-Werte erfolgte, korrelieren diese Werte nicht mit den im IFAT ermittelten Antikörpertitern. Die MFI-Werte der Verdünnungen 1:1000 bis 1:3000 nahmen mit zunehmender Verdünnung ab. Dabei zeigten die MFI-Werte der Ausgangsverdünnung 1:1000 eine deutliche Serokonversion an Tag 38 nach Infektion. Allerdings ergab die Analyse im T-Test mit $p = 0,0224$ beziehungsweise $p = 0,0248$ signifikante Werte erst am Tag 161 gegenüber dem IFAT-negativen Serum beziehungsweise der strikten Kontrolle vom Tag 23 des Versuches.

Abbildung 4-7: Untersuchung von Schweineseren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion mit PCV2 in unterschiedlichen Ausgangsverdünnungen.

Abbildung 4-7a: Ausgangsverdünnung 1:2,6

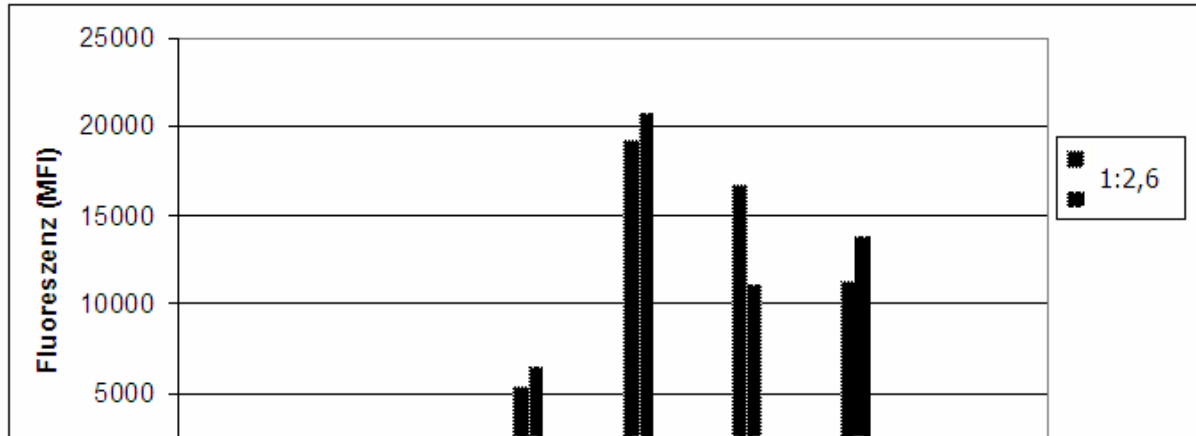
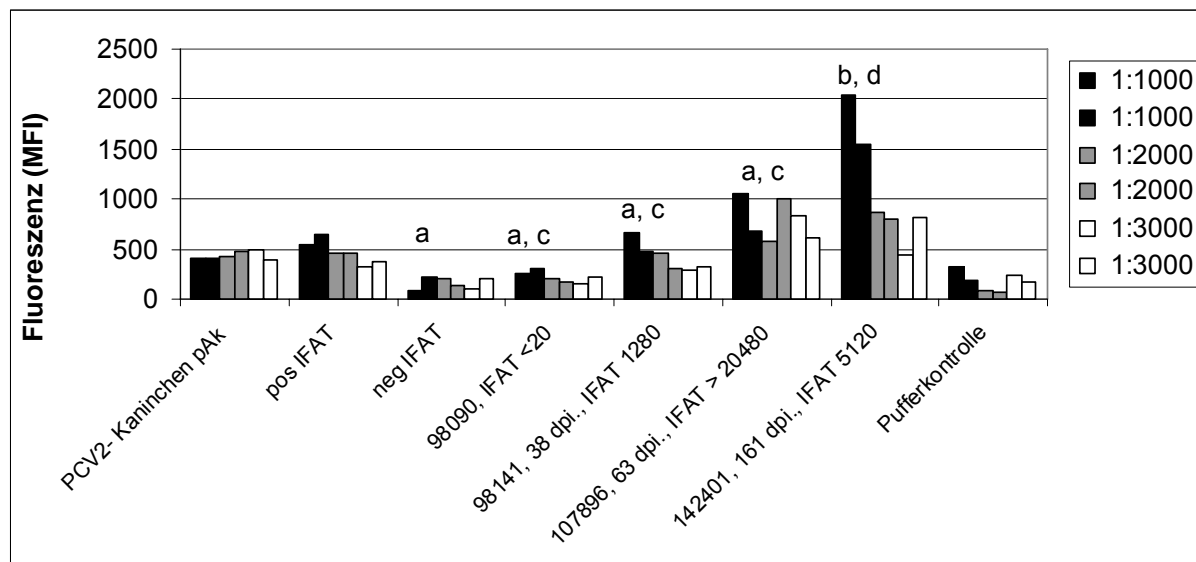


Abbildung 4-7b: Verdünnungsstufen 1:1000 bis 1:3000



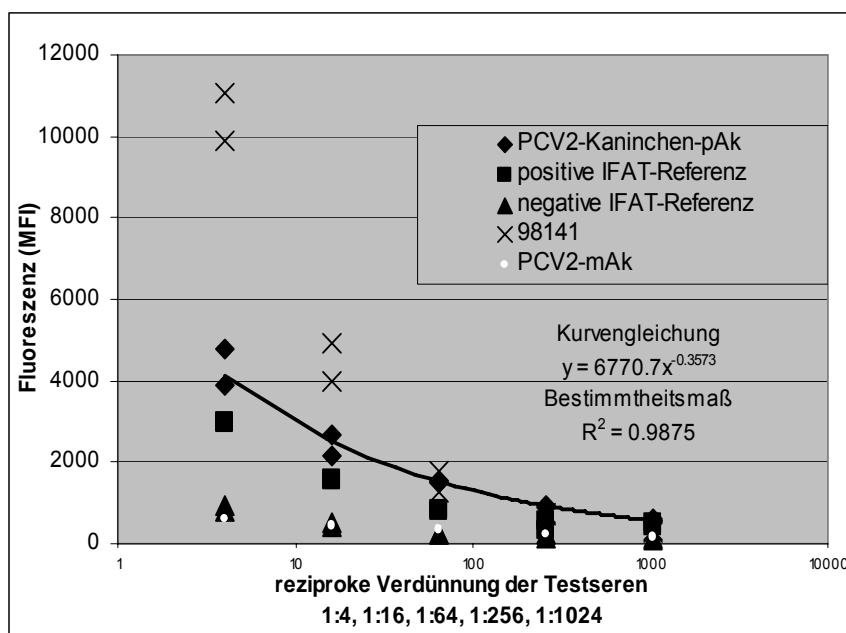
Legende zu Abbildung 4-7:

Dargestellt sind die Ergebnisse der Untersuchung von Schweineseren 38 - 161 Tage nach Infektion (dpi.) mit PCV2. Die MFI-Werte der Verdünnungsstufe 1:2,6 sind aus Gründen der besseren Skalierung in Abb.4-7a, die der anderen Verdünnungsstufen in Abb.4-7b dargestellt. Als Kontrollen dienten die PCV2-Kaninchen-pAk, ein positives und negatives IFAT-Kontrollserum und die Pufferkontrolle. Die zugehörigen IFAT PCV2-Antikörpertiter der Versuchstierseren sind als reziproke Antikörpertiter angegeben. Mittels T-Test wurde die Signifikanz der MFI-Werte der Versuchstierseren gegen das negative IFAT Kontrollserum (neg IFAT) (ab) sowie der MFI-Werte der infizierten Versuchsgruppe (38-161 dpi) gegenüber der nicht infizierten Kontrolle (98090) (cd) ermittelt. Identische Buchstaben (aa oder cc) kennzeichnen keine Signifikanzen. Die MFI-Werte bezeichnet mit a und b (neg IFAT und 142401) zeigen signifikante Abweichungen im T-Test, ebenso die mit c und d (98141 und 142401) gekennzeichneten.

4.1.4.2 Titration definierter Seren zur Bestimmung der optimalen Testverdünnung

Zur Bestimmung der optimalen Testverdünnung wurden PCV2-positive und –negative Seren aus dem Kaninchen (pAk), der Maus (mAk) und dem Schwein in einer \log_4 Verdünnungsreihe von 1:4 bis 1:1024 verdünnt und in der LiquiChip®-Messung eingesetzt. Die Messwerte der einzelnen Seren in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen lagen auf einer logarithmisch proportionalen Gerade mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 \geq 98\%$. Maximale MFI-Werte von 13000 MFI wurden mit dem Serum 98141 bei einer Verdünnung von 1:4 gemessen. Alle Seren zeigten einen Maximalwert bei der geringsten Verdünnung von 1:4, das Minimum wurde bei einer Verdünnung von 1:1024 erreicht (70 – 700 MFI).

Abbildung 4-8: Kurvenverlauf der Titration definierter Testseren im Untersuchungsprotokoll mit Waschschr



Legende zu Abbildung 4-8:

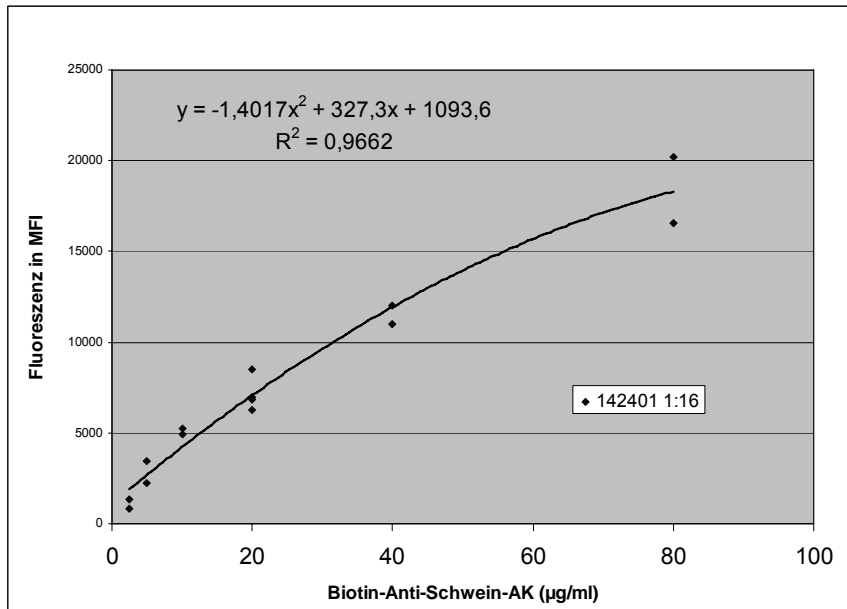
Aufgetragen wurden die MFI-Werte der \log_4 Verdünnungsstufen der PCV2-Kaninchen-pAk, des PCV2-positiven und negativen IFAT Poolserums, des PCV2-positiven Schweineserums 98141 und des monoklonalen Antikörpers (PCV2-mAk). Das Bestimmtheitsmaß wurde für alle Datenreihen bestimmt und für die PCV2-Kaninchen-pAk dargestellt.

4.1.4.3 Titration des biotinylierten Detektionsantikörpers

Die Bestimmung der optimierten Konzentration des zur Detektion eingesetzten biotinylierten Sekundärantikörpers erfolgte durch Testung von zwei definiert PCV2-positiven und einem negativen Feldserum in den Verdünnungsstufen 1:4, 1:16, 1:64 und 1:256. Jede dieser Verdünnungsstufen wurde mit dem Biotin-Anti-Schwein-Ak in einer Konzentration von 80 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ als Sekundärantikörper inkubiert und mittels LiquiChip®-Messung detektiert. Die Messwerte nahmen sowohl bei sinkender Konzentration an Sekundärantikörper, als auch bei steigender Verdünnung des Testserums ab. Bei vorliegendem Konzentrationsspektrum konnte kein Kurvenverlauf mit Plateau beobachtet werden. Je stärker konzentriert der Sekundärantikörper eingesetzt wurde, desto

höher waren die Fluoreszenzwerte, die erzielt werden konnten. Die Ergebnisse des PCV2-positiven Serums 142401, 1:16 verdünnt, sind in Abbildung 4-9 exemplarisch dargestellt.

Abbildung 4-9: Titration des Sekundärantikörpers am Beispiel des Serums 142401, 1:16 verdünnt.



Legende zu Abbildung 4-9:
Dargestellt ist der Kurvenverlauf der Titration des biotinylierten Sekundärantikörpers (2,5 bis 80 µg/ml). Ein Plateau liegt innerhalb des Konzentrationsbereiches nicht vor.

Ab einer Konzentration des Sekundärantikörpers von 2,5 µg/ml lagen die Werte unterhalb von 2000 MFI, eine Differenzierung zwischen positivem und negativem Serum war nicht mehr möglich. Eine gute Differenzierung wurde bereits ab einer Konzentration von 20 µg/ml und einer Serumverdünnung von 1:4 erreicht. Um den Materialverbrauch im Rahmen zu halten, wurden die Sekundärantikörper im Folgenden in der Regel in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt.

4.1.4.4 Vergleich verschiedener Puffer zur Optimierung der Fluoreszenzwerte

Waschschritte und Einstellung der optimalen Konzentration von Testserum und Detektionsantikörper hatten eine entscheidende Erhöhung der Fluoreszenzwerte bewirkt. An diesem Punkt stellte sich die Frage, ob durch Variation des Puffers die Fluoreszenzwerte noch weiter optimiert werden konnten. Hierzu wurden insgesamt sechs Puffervarianten, die unterschiedliche Konzentrationen von BSA (1% bzw. 0,1%) sowie einen Zusatz von 0,05%, 0,4% Tween respektive keine Tween-Anteile enthielten, angesetzt.

PBS/1% BSA

PBS/1% BSA + 0,4% (v/v) Tween® 20

PBS/1% BSA + 0,05% (v/v) Tween® 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. P9416)

PBS/0,1% BSA

PBS/0,1% BSA + 0,4% (v/v) Tween® 20

PBS/0,1% BSA + 0,05% (v/v) Tween® 20

Sämtliche Reaktions- und Waschschritte wurden mit dem jeweilig verwendeten Puffer durchgeführt. Ebenso wurden die Testseren im entsprechenden Puffer 1:4 verdünnt. Der Sekundärantikörper wurde sowohl in der Konzentration 20 µg/ml als auch in 10 µg/ml

ausgetestet. Die Suspension mit den gekoppelten Beads wurde abzentrifugiert (3 min, 10000 g) und das Bead-Pellet im jeweiligen Puffer resuspendiert. Alle Reaktionen erfolgten auf derselben 96er-Filterplatte, um Variationen durch externe Parameter wie Inkubationslänge, Waschschrte und verschiedene Messdurchgänge in der LiquiChip®-Workstation ausschließen zu können.

Unter Berücksichtigung einer Variation zwischen den einzelnen Versuchsansätzen (Interassay-Variation) von ca. 20-30% konnten keine nennenswerten Verbesserungen durch eine der Pufferalternativen erzielt werden.

4.1.5 Vergleichende Untersuchung von Feldseren im IFAT und im LiquiChip®-System

Zur Ermittlung der Reaktivität von Feldseren wurden 21 Schweineseren, die zuvor in einem validierten Immunfluoreszenztest (IFAT) auf Antikörper gegen PCV2 untersucht wurden, im LiquiChip®-Verfahren geprüft. Die IFAT-Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 dargestellt.

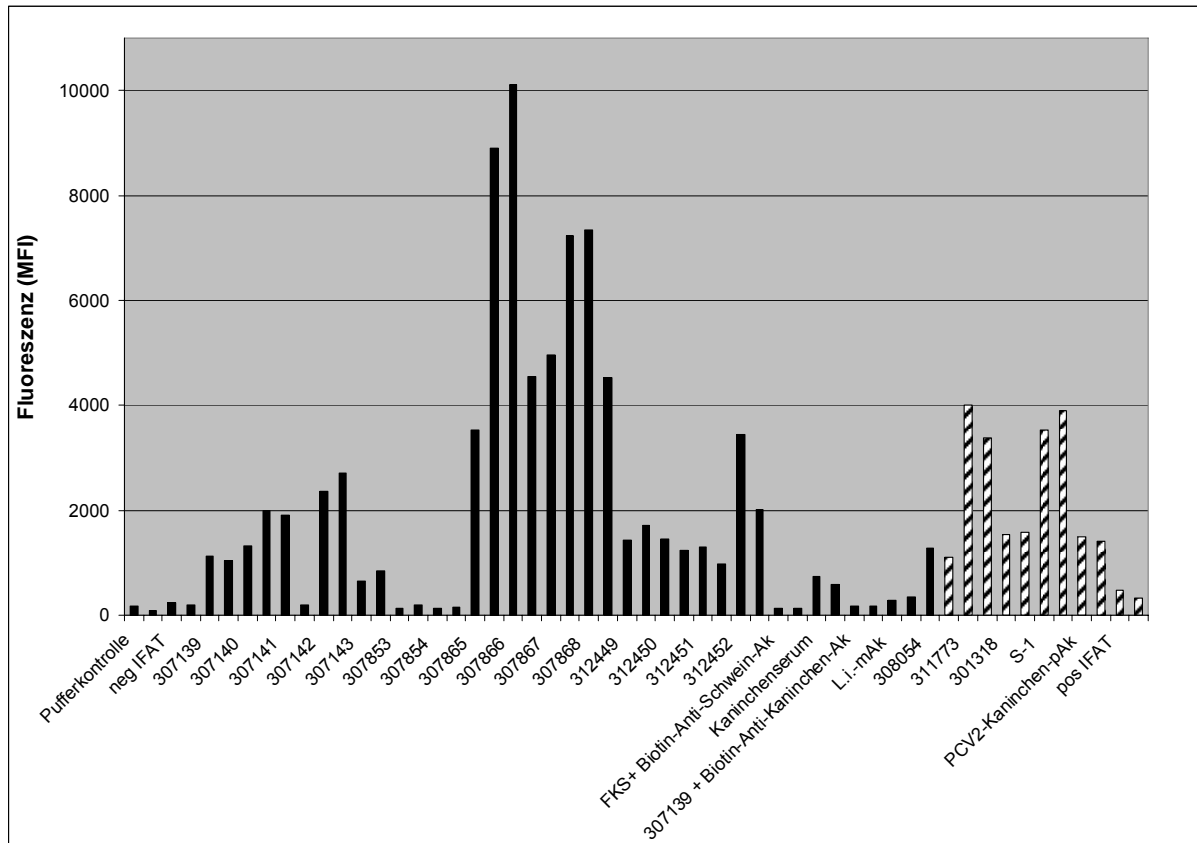
Tabelle 4-1: Bezeichnung und IFAT-Ergebnis von verwendeten Schweineseren

Probennummer	Ergebnis IFAT	
307139	< 1:20	NRW
307140	< 1:20	NRW
307141	< 1:20	NRW
307142	< 1:20	NRW
307143	< 1:20	NRW
307853	< 1:20	BW, Absatzferkel
307854	< 1:20	BW, Absatzferkel
307865	< 1:20	BW, Sauen
307866	< 1:20	BW, Sauen
307867	< 1:20	BW, Sauen
307868	< 1:20	BW; Sauen
312449	< 1:20	SH, Ferkel
312450	< 1:20	SH, Ferkel
312451	< 1:20	SH, Ferkel
312452	< 1:20	SH, Ferkel
301318	> 1:20480	
308054	1:320	Bayern
311773	1:1280	Bayern
S-1	> 1:6400	BW, GCP

Die Ergebnisse aus der LiquiChip®-Testung zeigten keine Übereinstimmung mit den PCV2-Antikörpertitern aus dem IFAT. Lediglich die beiden Seren von Absatzferkeln 307853 und 307854 lagen in einem MFI-Bereich, wie er für Negativseren zu erwarten war. Die anderen Negativseren zeigten mit MFI-Werten > 10000 sehr hohe Fluoreszenzen. Damit übertrafen einige der im IFAT mit < 1:20 negativ getesteten Seren die MFI-Werte für positiv getestete Schweineseren und die der definiert positiven Kontrollseren (PCV2-Kaninchen-pAk, positive IFAT Kontrolle). Demgegenüber zeigten die irrelevanten Kontrollenansätze mit FKS sowie Biotin-Anti-Kaninchen-Ak als Reaktionskomponenten MFI-Werte von maximal 178,5.

Besonders hohe MFI-Werte ergaben sich mit Serum von Sauen (307865 bis 307868, MFI-Werte 3534,5 bis 10112), wobei die Schwankungsbreite im Doppelansatz sehr ausgeprägt war.

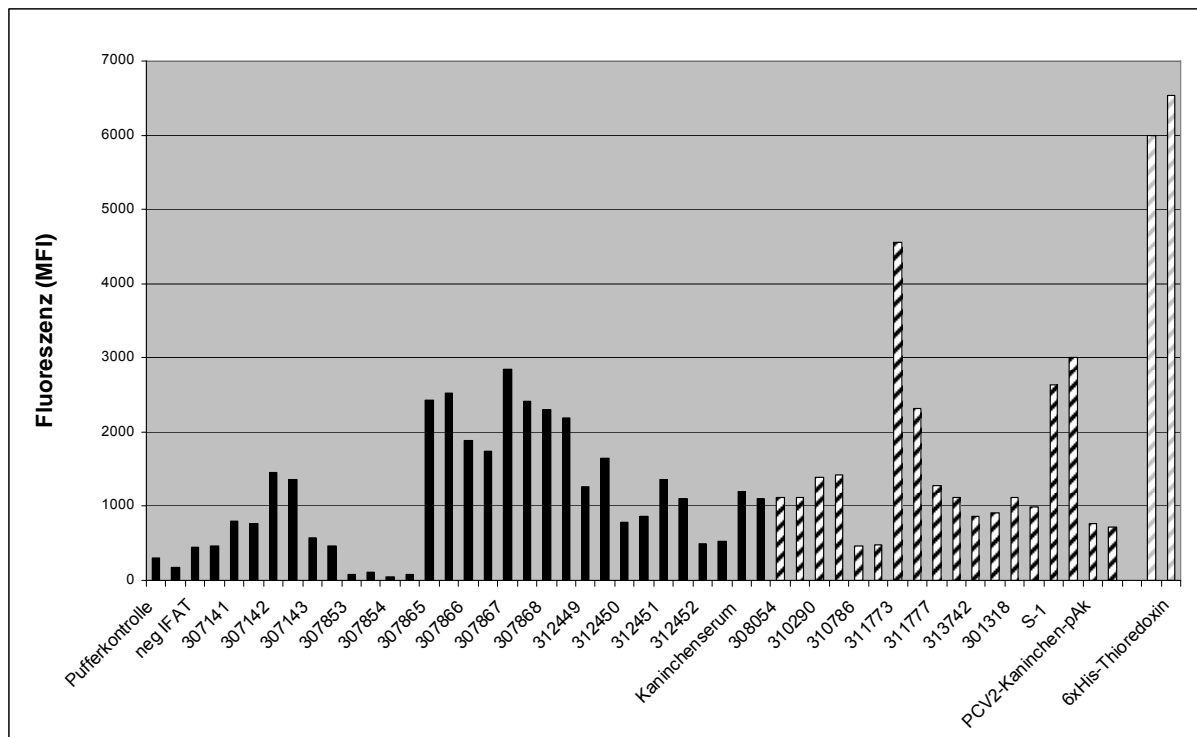
Abbildung 4-10: Untersuchung von Feldseren an PCV2 ORF2-gekoppelten Carboxy-Beads



Legende zu Abbildung 4-10:

In den Versuchsansatz mit Carboxy-Beads wurden die Seren aus Tab. 4-1 eingesetzt. Zusätzlich dienten die Pufferkontrolle und das negative IFAT-Poolserum als Negativkontrollen sowie die PCV2-Kaninchen-pAk, der PCV2-mAk und das PCV2-positive IFAT-Poolserum als Positivkontrollen. Im IFAT Antikörper-negativ getestete Seren sind als schwarze Balken, positiv getestete Seren als schraffierte Balken dargestellt. Alle Proben werden im Doppelansatz gezeigt. Zur Prüfung der Spezifität der Reaktionskomponenten wurden zusätzlich ein irrelevanter mAk (L.i.-mAk), ein irrelevantes Primärserum (fetales Kälberserum, FKS) mit Biotin-Anti-Schwein-Ak als Sekundärantikörper, Kaninchenserum und das Schweineserum 307139 in Kombination mit einem irrelevanten Sekundärantikörper (Biotin-Anti-Kaninchen-Ak) eingesetzt.

Der Versuchsansatz wurde mit Carboxy-Beads, die mit einer neuen Proteincharge gekoppelt wurden, wiederholt. Dabei ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Zur Abklärung möglicher Ursachen für die hohe Reaktivität von im IFAT PCV2-negativ getesteten Seren wurde der Versuchsansatz mit ungekoppelten Carboxy-Beads wiederholt. Hierzu wurden die Beads direkt aus der ungekoppelten Stammlösung mit PBS/1% BSA auf die Konzentration von $1,25 \times 10^5$ Beads/ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden jeweils 10 μ l in die Reaktion eingesetzt. Dabei ergaben sich die in Abbildung 4-11 dargestellten Ergebnisse.

Abbildung 4-11: Untersuchung von Feldseren an ungekoppelten Carboxy-Beads

Legende zu Abbildung 4-11

Die Seren aus Abbildung 4-10 wurden mittels LiquiChip®-Gerät an ungekoppelten Carboxy-Beads unter Verwendung des Biotin-Anti-Schwein-Ak und Streptavidin-R-Phycoerythrin getestet. Im IFAT Antikörper-negativ getestete Seren sind als schwarze Balken, positiv getestete Seren als schwarz-schraffierte Balken dargestellt. Getestet wurden die Seren jeweils im Doppelansatz. Als zusätzliche Kontrolle wurden 6xHis-Thioredoxin-gekoppelte Carboxy-Beads mit dem zugehörigen Testantikörper eingesetzt (grau schraffiert). Die Fluoreszenz wurde als MFI-Wert dargestellt.

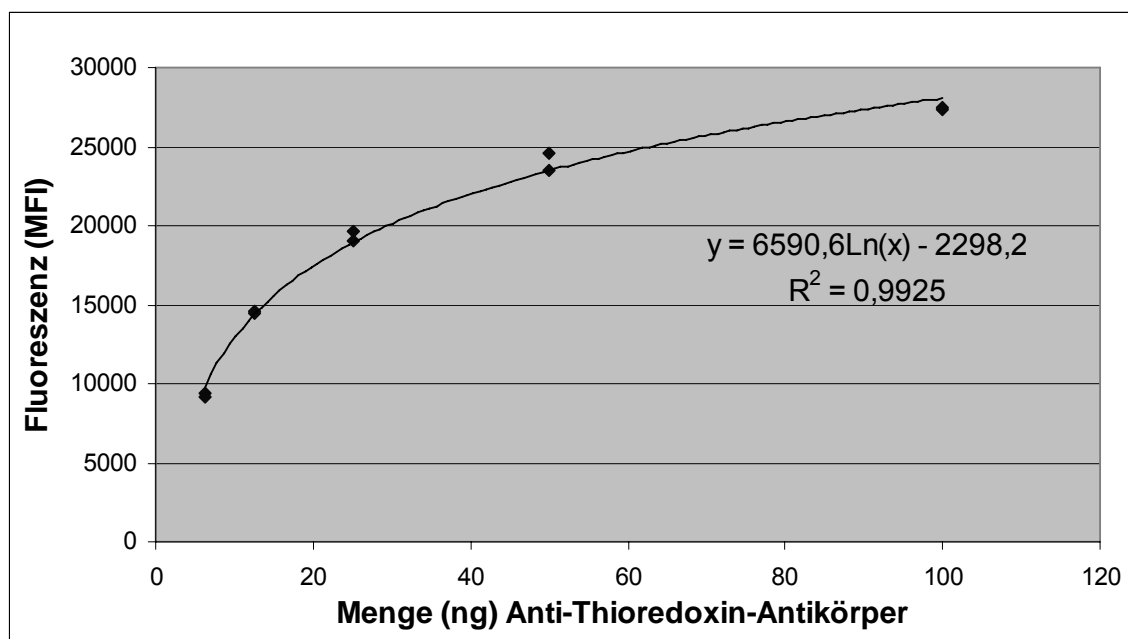
Die Ergebnisse mit ungekoppelten Carboxy-Beads zeigten MFI-Werte zwischen 45 und 4555. Damit lagen die absoluten MFI-Werte unter denen mit PCV2 ORF2-gekoppelten Beads und deutlich unter denen des Thioredoxin Testsystems (MFI: 6264,5). Eine Differenzierung zwischen im IFAT PCV2-Antikörper positiv oder negativ getesteten Seren konnte erwartungsgemäß nicht beobachtet werden. Allerdings zeigten die Seren ein ähnliches Profil der MFI-Werte wie mit PCV2 ORF2-gekoppelten Beads.

4.1.6 6xHis-Thioredoxin-System als interne Kontrolle

Ein 6xHis-Thioredoxin-Protein wurde als internes Kontrollsystem eingesetzt, um die Funktionsfähigkeit des Kopplungs- und Messprotokolls überprüfen zu können. Gleichzeitig ermöglichte diese mitgeführte Probe einen relativen Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Versuche miteinander. Das 6xHis-Thioredoxin-Protein, das mit einer artifizialen Tag100-Sequenz verlängert war, wurde ebenso wie der dazugehörige biotinylierte Anti-Thioredoxin-Antikörper, der gegen die Tag100-Sequenz gerichtet war, freundlicherweise von der Firma Qiagen zur Verfügung gestellt. Das Thioredoxin wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gemäß Standardprotokoll an Carboxy-Beads gekoppelt. Der Aktivierungsschritt der EDC-S-NHS-Reaktion erfolgte bei 4°C. Auch die Messversuche wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Da der Anti-Thioredoxin-Antikörper bereits biotinyliert war, entfiel die Zugabe

des Detektionsantikörpers. Die 6xHis-Thioredoxin-Kontrollen befanden sich in allen Versuchen zusammen mit den Proben zur Detektion von PCV2-Antikörpern auf derselben Platte. Dementsprechend durchliefen alle Proben identische Wasch- und Inkubationsschritte, jedoch wurde im Falle der 6xHis-Thioredoxin-Kontrollen statt Detektionsantikörper lediglich Puffer zugegeben und für weitere 90 min inkubiert. Zur Ermittlung der Gebrauchsverdünnung wurde in einem ersten Versuch der Detektionsantikörper in den Konzentrationen 0 ng, 6,25 ng, 12,5 ng, 25 ng, 50 ng und 100 ng eingesetzt. Die Kurve zeigte einen logarithmischen Verlauf mit MFI-Werten von 10000 – 28000 und ein Bestimmtheitsmaß von 99,25%. Verwendet werden sollte eine Konzentration, die MFI-Werte im Bereich von 15000 bis 20000 liefert. Entsprechend der Ergebnisse in Abbildung 4-12 wurde der Detektionsantikörper in den weiteren Versuchen in einer Konzentration von 25 ng eingesetzt.

Abbildung 4-12: 6xHis-Thioredoxin-Protein gekoppelt an Carboxy-Beads



Legende zu Abbildung 4-12:

Als Kontrollsystem wurde 6xHis-Thioredoxin-Protein an Carboxy-Beads gekoppelt und mit dem spezifischen, biotinylierten Antikörper detektiert. Dargestellt ist die Abhängigkeit der MFI-Werte von der Konzentration des eingesetzten Anti-Thioredoxin-Antikörpers.

4.1.7 Versuche zur Optimierung der Proteinkopplung an Carboxy-Beads und zur Verbesserung der Spezifität

Die zuvor beobachteten hohen MFI-Werte an ungekoppelten und PCV2 ORF2-gekoppelten Carboxy-Beads könnten durch freie Proteinbindungskapazitäten an den Beads bedingt sein. Zur Optimierung der Proteinbindung und zur Minimierung potentiell freier Proteinbindungsstellen wurden verschiedene Kopplungsvarianten getestet.

Die bisherigen Kopplungen wurden mit einer Konzentration des PCV2 ORF2-Proteins von 100 µg/ml durchgeführt. Dies entsprach ca. 25 ng Protein pro 1250 Beads und lag damit in dem vom Hersteller empfohlenen Konzentrationsbereich von 6,25 ng – 62,25 ng Protein pro 1250 Beads, was einer Proteinlösung von 25 µg/ml bzw. 250 µg/ml entspricht. In zwei weiteren Kopplungsansätzen wurde das Protein einmal in geringerer Konzentration (25

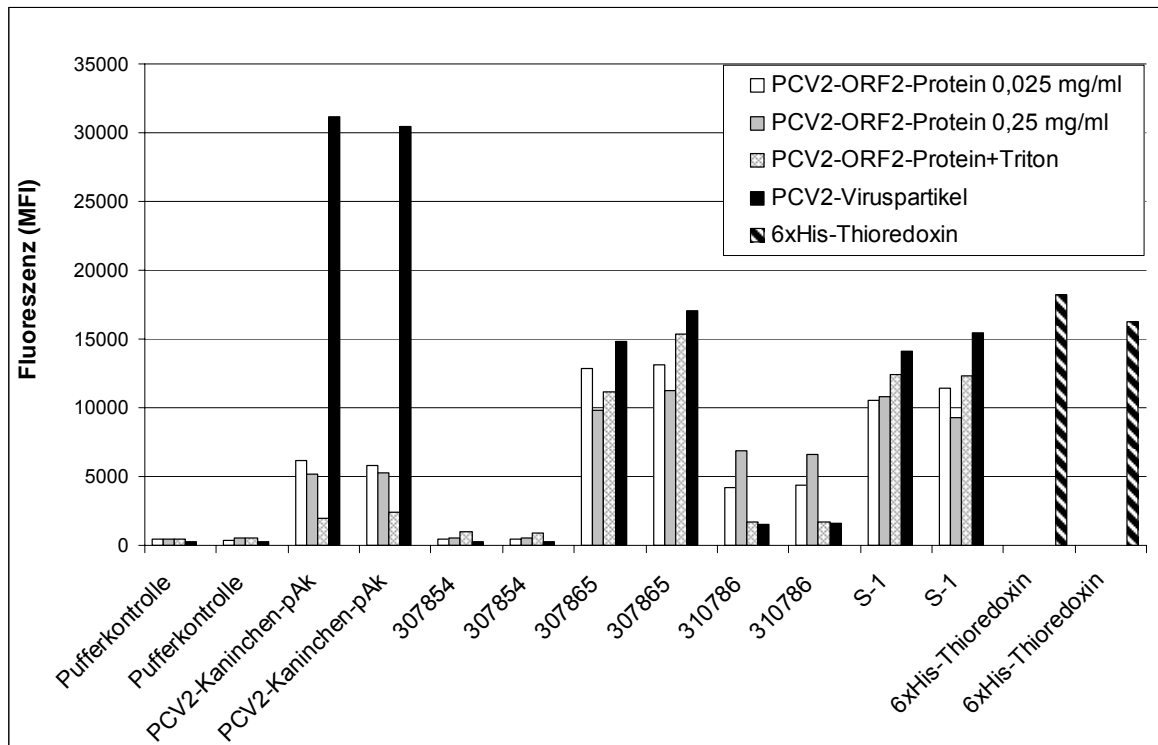
µg/ml) das andere mal in höherer Konzentration (250 µg/ml) eingesetzt wurde. Die Kopplung erfolgte nach Standardprotokoll in HEPES-Puffer.

Um die prinzipielle Eignung des rekombinanten PCV2 ORF2-Proteins für die Kopplung an die Polystyrol-Kügelchen zu überprüfen, wurde eine Kopplung von in Zellkultur vermehrtem PCV2 an Carboxy-Beads durchgeführt. Hierzu wurde in Anlehnung an die Versuche von KHAN et al. (2005) stark konzentriertes Virusmaterial an die Beads gekoppelt. 4,4 ml Zellkulturüberstand des PCV2-Virus (Isolat b2V) mit einem Virustiter von $10^{6,2}$ TCID₅₀/ml wurden über 24 h bei 33000 rpm und 4°C in einer Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in 500 µl PBS resuspendiert. Der Gesamtproteingehalt dieser PBS-Viruslösungen wurde mit einem BCA-Test bestimmt. Der Anteil an Virusprotein wurde mit 10 % des Gesamtproteingehaltes veranschlagt. Eine Viruspräparation wurde hergestellt, indem 1 ml 10fach konzentriertes PBS (PBS 10x, MP biomedical, Irvine, CA, USA, Kat.Nr. PBS10x02) mit 0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. T-8532) versetzt wurde. In dieser Stammlösung wurde eine Tablette Protease-Inhibitor Cocktail (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Kat.Nr. 11 836 153 001) gelöst und die Mischung auf 10 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. 500 µl PCV2-Überstand wurden 1:1 mit 500 µl der Triton X-100-Mischung versetzt und bei -70 °C gelagert. Zur Vergleichbarkeit der Kopplungsverfahren wurde das rekombinante Protein für diesen Versuch entsprechend an Carboxy-Beads gekoppelt. Alle Kopplungen erfolgten in einer Konzentration von 250 µg/ml.

Zur Prüfung der Reaktivität der so hergestellten Beads wurden zwei PCV2-positive und zwei negative Feldseren sowie der PCV2-Kaninchen-pAk getestet. Eine 6xHis-Thioredoxin-Kontrolle mit 25 ng Anti-Thioredoxin-Ak wurde ebenfalls mitgeführt. Der Reaktionsansatz erfolgte im Wesentlichen nach dem Standardprotokoll, wurde in einigen Bereichen jedoch an die Methode von KHAN et al. (2005) angepasst. Hierbei wurde anstelle der LiquiChip®-Filter Mikroplatte mit 0,2 µm Porengröße die MultiScreen_{HTS} Filterplatte mit 1,2 µm Porengröße (Multiscreen_{HTS} BV Plate, Millipore, Billerica, MA, USA, Kat.Nr. MSBV N1210) verwendet. Dem PBS/1% BSA-Puffer wurde ein Anteil von 0,1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. P-9416) beigefügt. Zusätzlich zu dem bisher durchgeführten Waschschrift nach Inkubation des Serums an den Beads wurde auch nach Inkubation mit dem sekundären Biotin-Antikörper dreimal mit 150 µl PBS/1% BSA/0,1% Tween 20-Puffer gewaschen. Nach Zugabe des SA-PE wurde 30 min inkubiert, die Flüssigkeit abgezogen, 150 µl des Waschpuffers zugegeben, 30 s auf dem Schüttler resuspendiert und erneut abgezogen. Nach Zugabe von 150 µl Waschpuffer und Resuspendierung wurde der Reaktionsansatz wie bereits beschrieben in der LiquiChip®-Workstation analysiert.

Die Testung unterschiedlich gekoppelter Bead-Varianten führte nur in zwei Fällen zu abweichenden Fluoreszenzwerten (Abbildung 4-13). Die PCV2-Kaninchen-pAk ergaben mit Viruspartikel gekoppelten Beads etwa sechsfach höhere MFI-Werte als bei Testung mit rekombinantem PCV2 ORF2-Protein. Gegenüber Triton-behandeltem Protein lag der Wert etwa 12fach höher. Diese Ergebnisse konnten mit PCV2-positiven Schweineseren nicht reproduziert werden. Mit dem Serum 310786 wurden sogar deutlich geringere Fluoreszenzwerte gemessen. Die Verwendung unterschiedlicher PCV2-Antigene beziehungsweise verschiedener Antigenkonzentrationen führten nicht zu einer Differenzierung PCV2-positiver und negativer Feldseren vom Schwein. Die 6xHis-Thioredoxin-Kontrolle ergab MFI-Werte von 17000 MFI.

Abbildung 4-13: Untersuchung von Seren an unterschiedlich gekoppelten Carboxy-Beads



Legende zu Abbildung 4-13:

PCV2-negative (307854, 307865) und positive Feldseren (310786, S-1) und der PCV2-Kaninchen-pAk wurden an unterschiedlich gekoppelten Carboxy-Beads getestet. Neben zwei unterschiedlichen PCV2 ORF2-Protein-Konzentrationen (0,025 mg/ml und 0,25 mg/ml) wurden mit Triton-X-100 präpariertes PCV2-Protein (0,25 mg/ml) und PCV2-Viruspartikel an die Beads gekoppelt. 6xHis-Thioredoxin gekoppelte Carboxy-Beads dienen mit dem spezifischen Antikörper als Kontrolle.

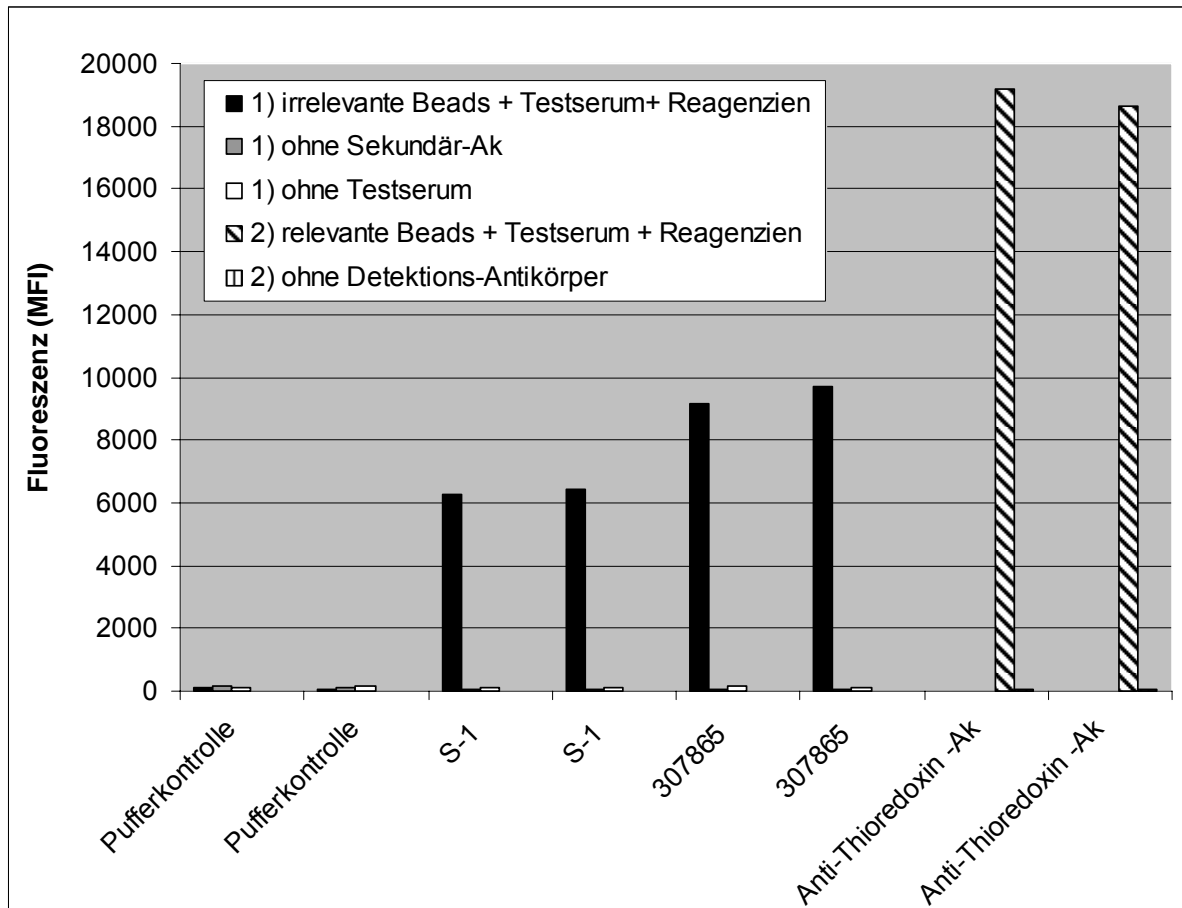
4.1.8 Untersuchung von Reaktionskomponenten auf unspezifische Bindungskapazität

Ein weiterer Versuch wurde durchgeführt, um ausschließen zu können, dass die Fluoreszenzwerte durch unspezifische Bindungen der weiteren Reaktionskomponenten, z.B. des Detektionsantikörpers oder des Streptavidin-R-Phycoerythrins an die Beads, das Capture-Molekül oder das Serum hervorgerufen wurden. Als Proben wurden eine Pufferkontrolle, der für das 6xHis-Thioredoxin spezifische Anti-Thioredoxin-Ak, sowie jeweils ein positives und ein negatives Serum eingesetzt. Diese vier Proben wurden als Duplikate in drei Versuchsansätzen getestet. Der erste enthielt sämtliche im Standardprotokoll aufgeführte Komponenten, im zweiten wurde der Detektionsantikörper, im dritten das Testserum durch Puffer ersetzt. Diese Ansätze wurden jeweils an mit 6xHis-Thioredoxin bzw. mit PCV2 ORF2-Protein gekoppelten Beads getestet. Reaktionsansatz und Messung wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt.

In der Versuchsvariante ohne Testserum wurden mit allen Proben MFI-Werte von maximal 160 gemessen. Vergleichbare Werte (100-200 MFI) wurden mit Proben erhalten, bei denen kein Detektionsantikörper zugegeben wurde. Demgegenüber ergaben die Feldseren S-1 und 307865 sowohl an irrelevanten, 6xHis-Thioredoxin-Beads (Abbildung 4-14) als auch an relevanten PCV2-gekoppelten Beads (Abbildung 4-15) hohe MFI-Werte (6363,75 und

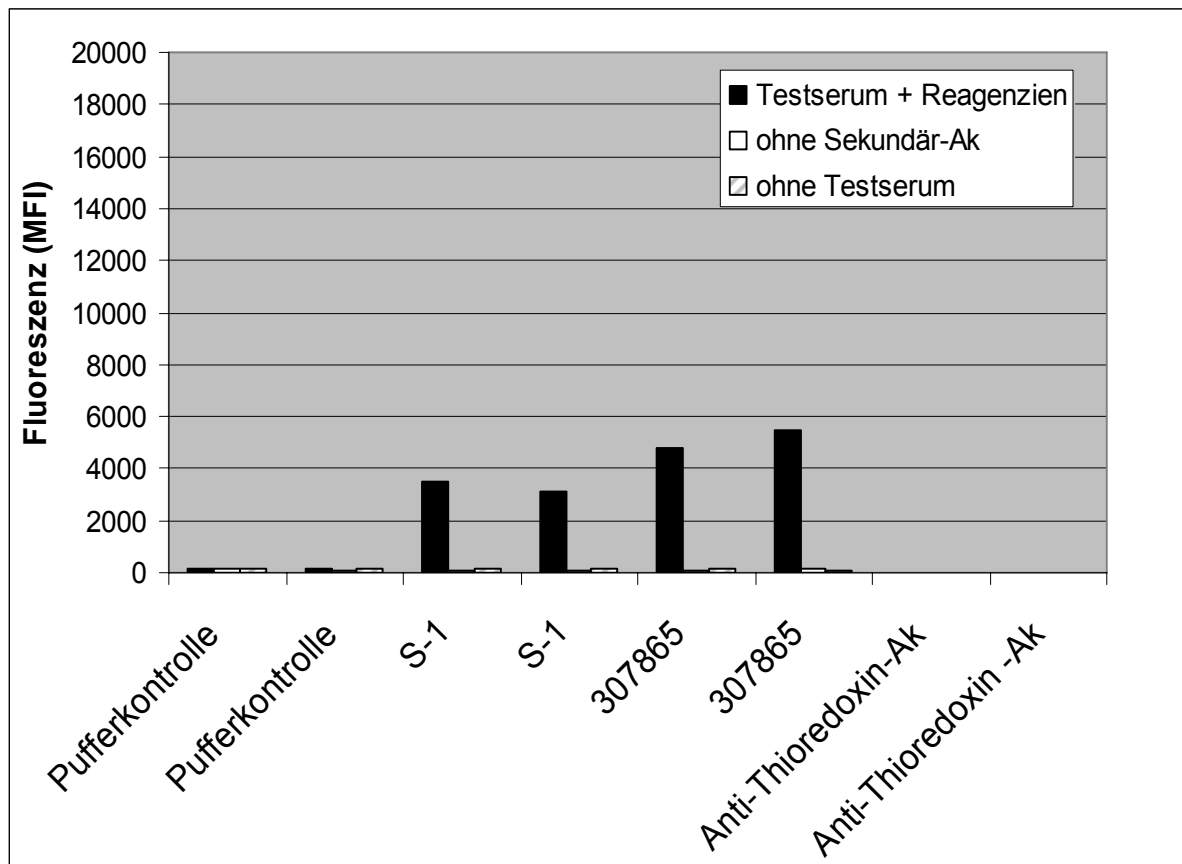
9472,25 für die irrelevanten Beads, 3308,5 und 5138,75 für die PCV2-Beads). Wie bereits in den vorherigen Versuchen zeigten die Messwerte keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen des IFATs.

Abbildung 4-14: Untersuchung an irrelevanten Beads (gekoppelt mit 6xHis-Thioredoxin)



Legende zu Abbildung 4-14:

Getestet wurden zwei Feldseren an irrelevanten, 6xHis-Thioredoxin gekoppelten Carboxy-Beads. Es wurden drei Messungen (1)) an Duplikaten durchgeführt. Im ersten Messansatz waren alle Reagenzien vorhanden. Die Feldseren zeigten hohe Fluoreszenzwerte (Serum S-1: MFI 6274, 6453,5; Serum 307865: MFI 9156,5; 9698). In den folgenden Messungen wurden die Detektionsantikörper bzw. das Testserum weggelassen. In beiden Varianten wurden lediglich MFI-Werte von 35 bis 166,5 gemessen. Zur Kontrolle wurde der spezifische Anti-Thioredoxin-Antikörper mit den 6xHis-Thioredoxin-Beads eingesetzt (2)). Als Spezifitätskontrolle hierzu diente ein Ansatz ohne Detektionsantikörper (2)).

Abbildung 4-15: Untersuchung an relevanten PCV2-Carboxy-Beads

Legende zu Abbildung 4-15:

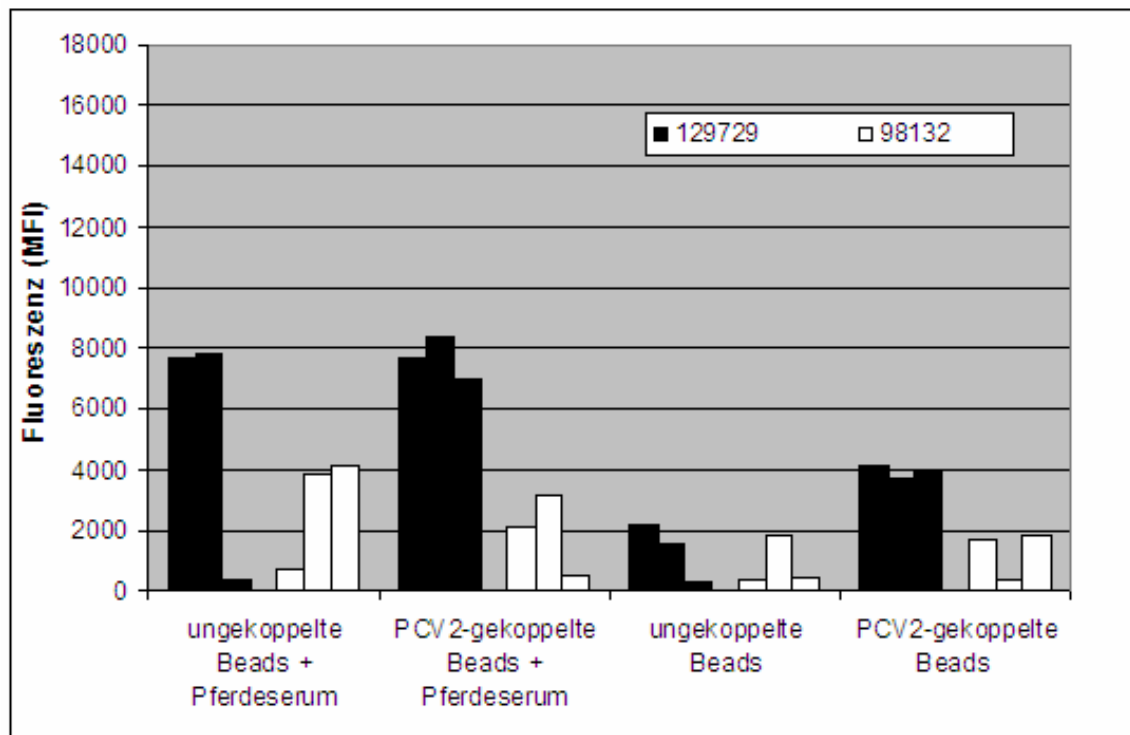
Die Versuche zur Abklärung von unspezifischen Bindungen erfolgten im zweiten Schritt an relevanten PCV2-gekoppelten Beads. Die Feldseren zeigten in Ansätzen mit allen Reagenzien Fluoreszenzen bis 6000 MFI, in den Proben, in denen relevante Reaktionskomponenten (biotinylierter Sekundärantikörper, Testserum) weggelassen wurden, lagen die Messwerte mit < 160 MFI im Bereich der Pufferkontrolle. Der Anti-Thioredoxin-Antikörper ergab keine Fluoreszenz.

4.1.9 Inkubationsversuche zur Blockung unspezifischer Bindungsreaktionen

Die Möglichkeiten, unspezifische Bindungsreaktionen zu verhindern, wurden durch verschiedene Inkubationsmethoden untersucht.

Zunächst sollte geprüft werden, ob freie Bindungsstellen an den Beads durch eine Vorinkubation mit Pferdeserum abgeblockt werden könnten. Hierzu wurden PCV2 ORF2-gekoppelte und ungekoppelte Carboxy-Beads abzentrifugiert (3 min, 10000 g) und das Bead-Pellet in 1:4 mit PBS/1%BSA-Puffer verdünntem Pferdeserum resuspendiert. Anschließend wurden die Bead-Lösungen für 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Agitation inkubiert, erneut abzentrifugiert, zweimal mit PBS/1%BSA gewaschen und auf eine Konzentration von $1,25 \times 10^5$ Beads/ml gebracht. Die so vorbehandelten Beads wurden in den Prüfansätzen nach Standardprotokoll eingesetzt.

Abbildung 4-16: Vergleich von Schweineseren an irrelevanten und PCV2-Antigen gekoppelten Carboxy-Beads mit und ohne Vorinkubation der Beads in Pferdeserum



Legende zu Abbildung 4-16:

PCV2-gekoppelte und irrelevante, ungekoppelte Beads wurden zur Absättigung von freien Bindungsstellen zunächst 90 Minuten in Pferdeserum inkubiert und anschließend an Feldseren aus einem GCP-konformen PCV2-Infektionsversuch (129729, IFAT positiv, 1:5120, und 98132, IFAT-negativ) getestet. Zum Vergleich wurde die Messung ebenfalls an PCV2-gekoppelten (Standard) und ungekoppelten Beads ohne Vorinkubation in Pferdeserum durchgeführt.

Alle Seren ergaben in Kombination mit den vorinkubierten Carboxy-Beads höhere Fluoreszenzwerte als an nicht vorinkubierten Beads. Dies bedeutete, dass auch die Fluoreszenzen an ungekoppelten Beads deutlich zunahm (Maximalwerte 7803,5 und 4072 gegenüber 2197,5 und 1772). Die als Triplikate gemessenen Seren zeigten zum Teil extreme Schwankungen (Triplikat 1 7803,5 MFI, Triplikat 3 340,5 MFI).

Im zweiten Versuchsansatz sollten durch Vorinkubation der Seren die unspezifischen Bindungsaktivitäten verhindert oder verringert werden. Diese Blockierung erfolgte in Anlehnung an die Methode von WATERBOER et al. (2006) mittels einer Behandlung der Seren mit verschiedenen Kombinationen aus Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon und Super Chemiblock (CHEMICON™ International, Inc, Temecula, CA, USA). Verwendet wurden die Kontroll- und Feldseren, die bereits in vorangegangenen Versuchen getestet worden waren. Zusätzlich wurde das positive IFAT-Referenzserum eingesetzt. Der Versuch wurde nach dem Standardprotokoll mit Waschschritten durchgeführt. Die Beads wurden auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^5$ anstatt $1,25 \times 10^{2,5}$ verdünnt worden. Die Feldseren wurden zuvor eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Verdünnung 1:50 mit dem Blockpuffer vorinkubiert.

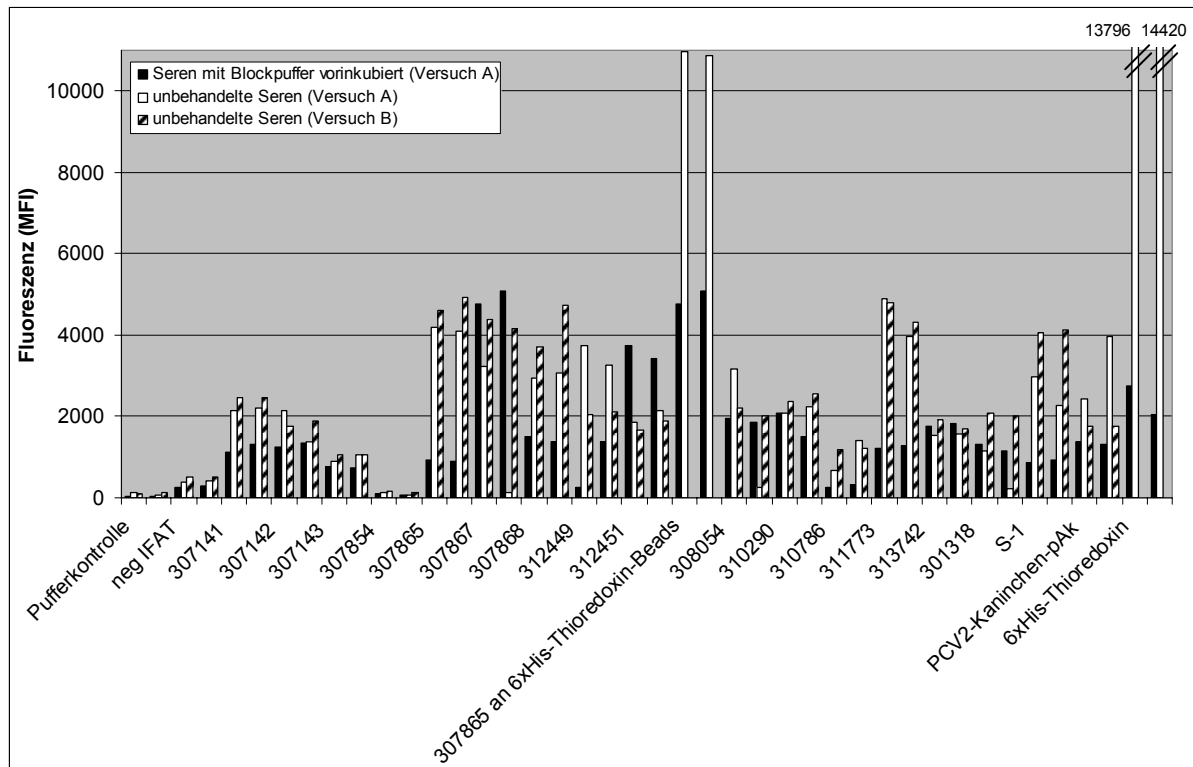
Der Blockpuffer setzte sich zusammen aus

- PBS (PBS 10x, MP biomedical, Irvine, CA, USA, Kat.Nr. PBS10x02)
- 0,01 % (w/v) Casein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. C 7078)
- 0,05 % (w/v) Polyvinylalkohol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. P 8136)
- 0,08 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Kat.Nr. PVP 360)
- 0,24 % (v/v) CBS-K Super Chemiblock™ Heterophile Blocking Agent (CHEMICON International, Inc, Temecula, CA, USA)

Im Anschluss an die Vorinkubation wurden 50 µl des geblockten Serums mit 35 µl PBS/1%BSA und 15 µl Beads in die Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben und das Waschprotokoll durchgeführt. Alle Seren wurden auf derselben Mikrotiterplatte in ungeblocktem Zustand getestet. Außerdem wurde eines der Feldseren, das zuvor an 6xHis-Thioredoxin-gekoppelten Beads hohe unspezifische Signale gezeigt hatte, sowohl im geblockten als auch im ungeblockten Zustand mit 6xHis-Thioredoxin-Beads getestet. Auf diese Weise war eine direkte Beurteilung der Wirkung der Vorinkubation möglich. Die 6xHis-Thioredoxin-Kontrolle mit 25 ng Anti-Thioredoxin-Ak wurde ebenfalls in geblocktem und ungeblocktem Zustand getestet.

Die in Blockpuffer vorinkubierten Seren zeigten maximale MFI-Werte von etwa 5000 MFI (Abbildung 4-17). Mit wenigen Ausnahmen konnte eine Absenkung der MFI-Werte um 20 bis 80 % im Vergleich zu den Fluoreszenzwerten im ungeblockten Zustand beobachtet werden. Eine Differenzierung zwischen positiven und negativen Feldseren war jedoch nicht möglich. Das Feldserum, das zusätzlich an 6xHis-Thioredoxin-Beads getestet worden war, zeigte im ungeblockten Zustand eine sehr hohe unspezifische Fluoreszenz von 11000 MFI, die durch Vorinkubation des Serums auf 4500 MFI abgesenkt werden konnte. Die Thioredoxin-Kontrolle lag im ungeblockten Zustand bei 14000 MFI und wurde durch die Blockung auf 4500 MFI herabgesenkt.

Abbildung 4-17: Vergleich der Fluoreszenzen von unbehandelten und in Blockpuffer vorinkubierten Seren



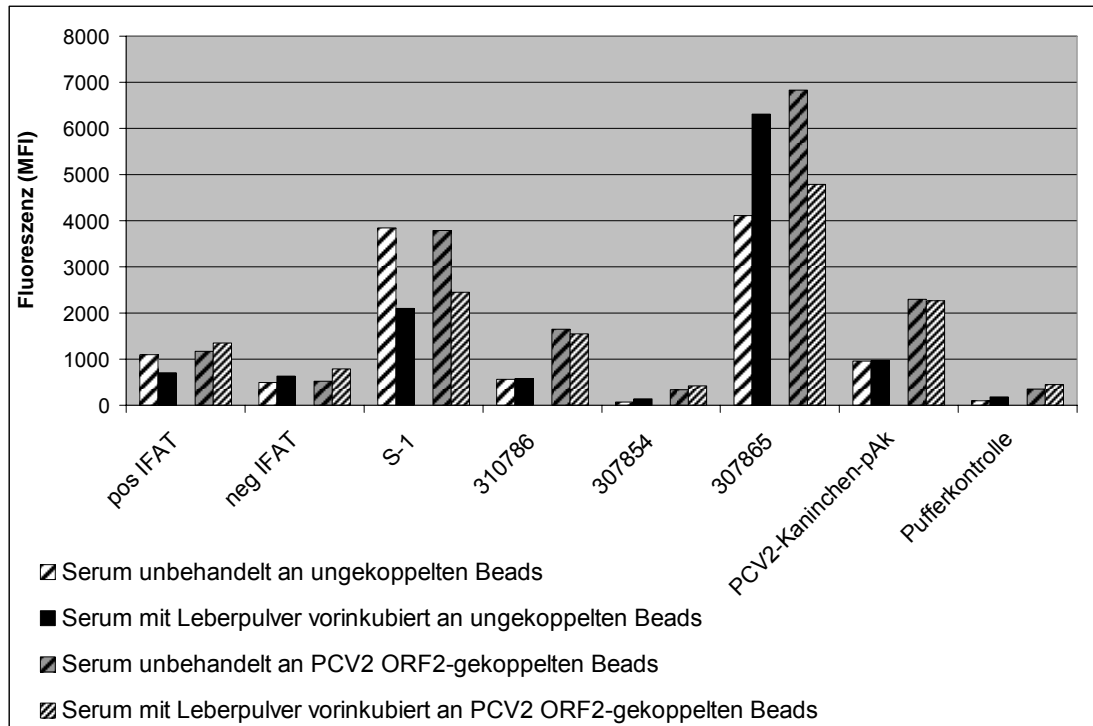
Legende zu Abbildung 4-17:

Dargestellt sind die Fluoreszenzwerte von Schweineseren aus dem Feld, des negativen IFAT-Kontrollserum, der polyklonalen PCV2-Kaninchen-Ak und des an Carboxy-Beads gekoppelten 6xHis-Thioredoxin-Proteins mit zugehörigem Antikörper. Getestet wurden die Seren ungeblockt sowie 1:50 in Blockpuffer (0,5% Polyvinylalkohol, 0,8 % Polyvinylpyrrolidon, 0,24% CBS-K) verdünnt (Versuch A). Nach der Verdünnung in Blockpuffer erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Zum Vergleich wurden die MFI-Werte der unbehandelten Seren aus einem weiteren Messansatz (Versuch B) mit in die Grafik aufgenommen.

Aufgrund der Erfahrungen mit einem Homogenat aus Schweineleber in anderen serologischen Verfahren, z.B. einem Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Borna-spezifischen Antikörpern, (MÜLLER, persönliche Mitteilung 2007), wurde versucht, die unspezifischen Bindungen durch Vorinkubation der Seren mit Schweineleberpulver zu minimieren. Zu diesem Zweck wurde Schweineleberpulver, das freundlicherweise von Prof. Dr. H. Müller, Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, zur Verfügung gestellt wurde, mit 1 ml PBS pro 100 mg Leberpulver vermischt und in 200 µl Aliquots auf 500µl Reaktionsgefäße verteilt. Nach einer Inkubation von 5 – 10 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 2500 g. Der Überstand wurde verworfen. Die Serumproben wurden im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt und das Leberpulver-Pellet in dem verdünnten Serum resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 – 15 min bei Raumtemperatur wurde die Serum-PBS-Leberpulver-Lösung für 5 min bei 2500 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Der LiquiChip-Reaktionsansatz wurde nach Standardprotokoll durchgeführt und die Seren in der durch die Vorinkubation erzielten Verdünnung von 1:5

eingesetzt. Getestet wurden zwei negative sowie zwei positive Feldseren, das negative und das positive IFAT-Kontrollserum sowie der polyklonale PCV2-Kaninchen-Antikörper. Die Seren wurden an spezifischen, mit PCV2 ORF2-gekoppelten Beads und an ungekoppelten Beads getestet. Nicht mit Leberpulver behandelte Seren dienten als Kontrolle.

Abbildung 4-18: Vorinkubation der Seren in Schweineleberpulver, Vergleich mit unbehandelten Seren an spezifisch gekoppelten und ungekoppelten Beads



Legende zu Abbildung 4-18:

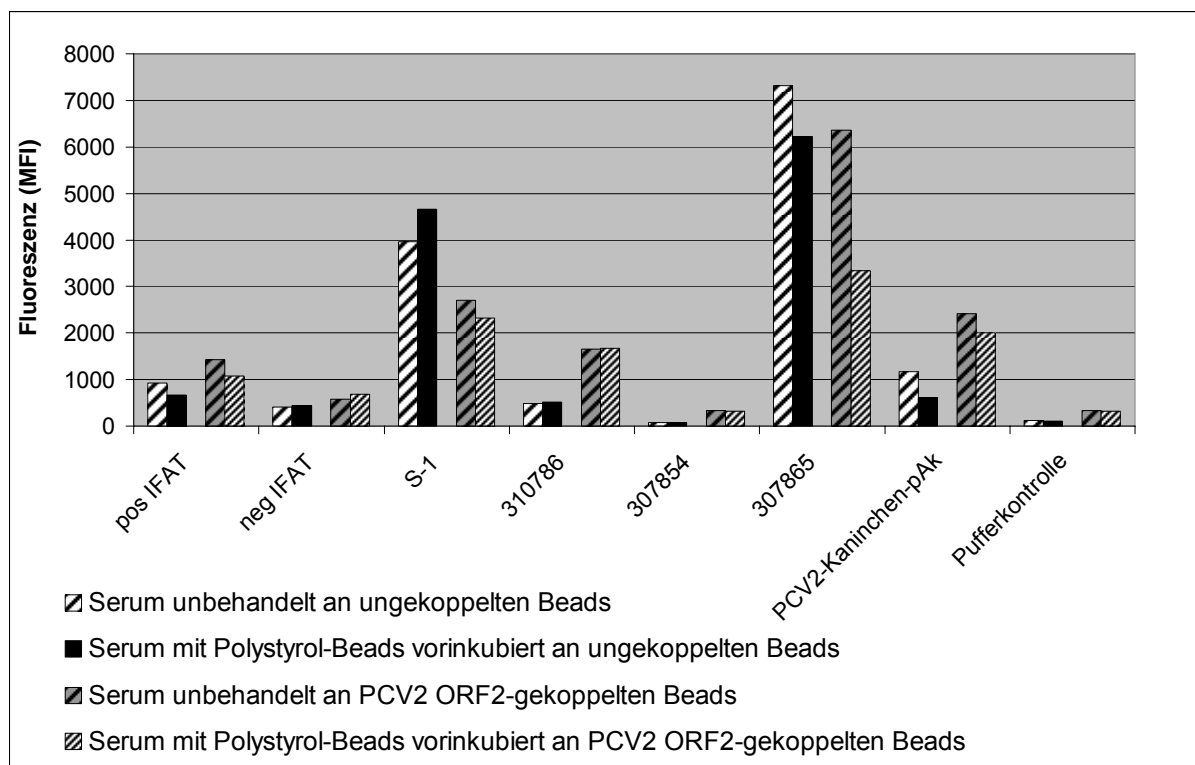
Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzwerte in MFI von positiven (S-1; 310786) und negativen (307854; 307865) Schweineseren aus dem Feld sowie von dem negativen und positiven IFAT-Kontrollserum und dem polyklonalen PCV2-Kaninchen-Antikörper. Die Seren wurden unbehandelt und im Anschluss an eine 10 – 15 minütige Vorinkubation mit Schweineleberpulver verwendet. Beide Versuchsansätze wurden jeweils an ungekoppelten und mit PCV2 ORF2-Protein gekoppelten Beads getestet.

Die Vorbehandlung mit Schweineleberpulver konnte die unspezifischen Signale weder an ungekoppelten noch an spezifisch mit PCV2 ORF2-Protein gekoppelten Beads verhindern. An den spezifisch gekoppelten Beads wurde die Fluoreszenz eines PCV2-negativen Feldserums (307865) um 30 % verringert. Derselbe Effekt zeigte sich jedoch auch bei einem der positiven Feldseren (S-1, Reduktion um 35 %). Auch an ungekoppelten Beads zeigten die Feldseren 307865 und S-1 nach der Vorinkubation mit Leberpulver eine Veränderung. Während das unspezifische Signal des Serums S-1 um 45 % verringert werden konnte, wurde jedoch das Signal des Serums 307865 um 53 % erhöht. Im Falle der weiteren Feld- und Kontrollseren lagen die Fluoreszenz-Signale an beiden Bead-Typen auf vergleichbarem Niveau wie die der Seren in unbehandeltem Zustand.

Dieselben Seren wurden in einem weiteren Versuch einer Vorinkubation mit Polystyrol-Beads unterzogen. Auf diese Weise sollten Komponenten aus dem Schweineserum, die unspezifisch an die Polystyrol-Oberflächen der LiquiChip-Beads binden, in einem vorbereitenden Schritt an irrelevante Beads gebunden und durch Abzentrifugation aus dem

Serum entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Teile Serum mit einem Teil Bead-Stocklösung und fünf Teilen PBS/1%BSA vermischt und 90 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bead-Stocklösung enthielt die ungekoppelten Polystyrol-Beads in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ beads/ml. Das Serum wurde demnach mit einem 10fachen Überschuss im Vergleich zu der im LiquiChip-Versuchsansatz verwendeten Bead-Menge vorinkubiert. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurde das Serum-Bead-Gemisch für 5 Minuten bei 10000 g zentrifugiert, das Serum wurde als weitgehend beadfreier Überstand abgenommen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die zur Absättigung verwendeten ungekoppelten Beads entsprachen der Klassifizierung des Bead-Sets 37, die für die Fluoreszenzmessung im LiquiChip eingesetzten, relevanten Beads trugen die Farbkodierung des Bead-Sets 21. Gemessen wurde die Fluoreszenz des Bead-Sets 21, so dass Interferenzen mit unspezifischen Signalen der zur Absättigung verwendeten Beads vermieden werden konnten. Die Testung im LiquiChip-Ansatz erfolgt wie bereits zuvor beschrieben nach Standardprotokoll und in der durch die Vorinkubation erzielten Serum-Verdünnung von 1:5. Getestet wurden sie an ungekoppelten und spezifisch an PCV2 ORF2-Protein gekoppelten Beads. Zum Vergleich wurden nicht mit Polystyrol-Beads abgesättigte Seren mitgeführt.

Abbildung 4-19: Vorinkubation der Seren mit Polystyrol-Beads, Vergleich mit unbehandelten Seren an spezifisch gekoppelten und ungekoppelten Beads



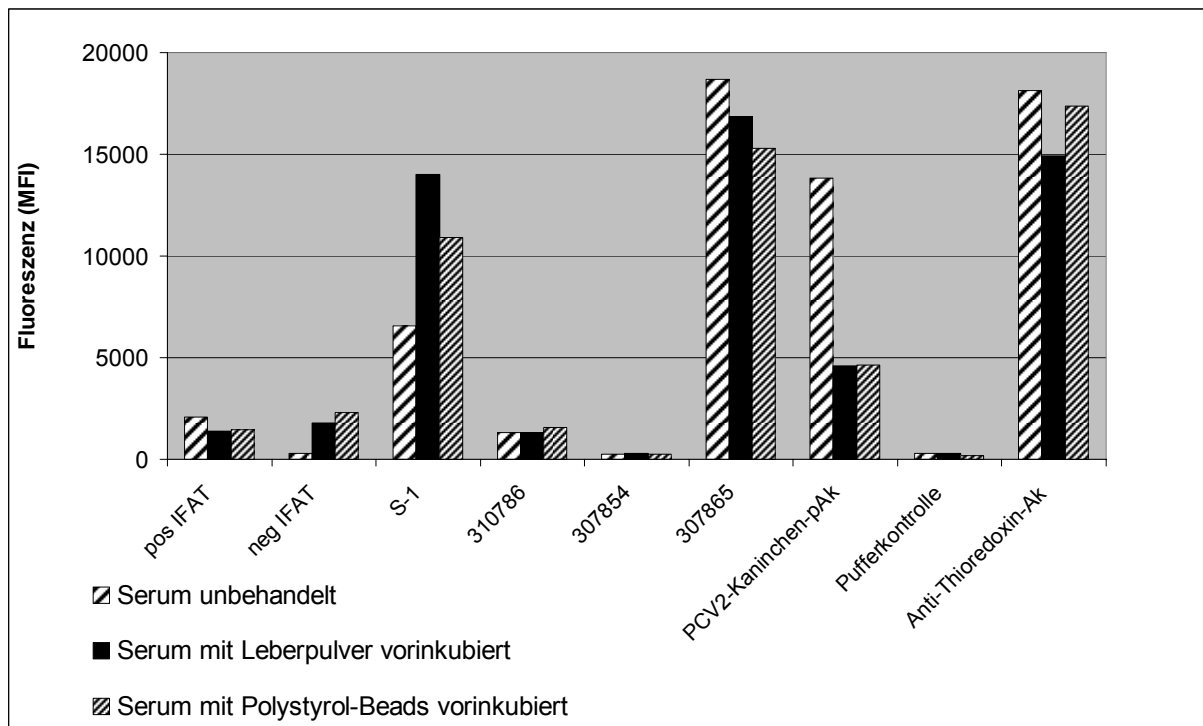
Legende zu Abbildung 4-19:

Positive und negative Feldseren vom Schwein (S-1, 310786 bzw. 307854, 307865), die IFAT-Kontrollseren und der polyklonale PCV2-Kaninchen-Antikörper wurden nach einer Vorinkubation mit ungekoppelten Polystyrol-Beads (Bead-Set 37) an spezifisch mit PCV2 ORF2-gekoppelten sowie ungekoppelten Beads (jeweils Bead-Set 21) getestet. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die Seren-Bead-Mischungen abzentrifugiert und der Überstand für den LiquiChip-Ansatz verwendet. Zum Vergleich wurden dieselben Seren ohne Vorbehandlung untersucht.

Nach der Vorinkubation mit Polystyrol-Beads konnte lediglich an einem Serum (307865) eine deutliche Veränderung beobachtet werden. Das Signal des PCV2-negativen Feldserums an spezifisch gekoppelten Beads konnte durch die Vorbehandlung um 47 % gesenkt werden. An ungekoppelten Beads betrug die Reduktion für dieses Serum 15 %. An den übrigen Seren konnten durch die Behandlung keine Veränderungen erzielt werden.

Sowohl die mit Schweineleberpulver vorinkubierten Seren als auch die durch Vorinkubation mit Polystyrol-Beads behandelten Seren wurden zusätzlich an irrelevanten 6-His-Thioredoxin-gekoppelten Beads getestet. Zum Vergleich wurden die Seren in unbehandeltem Zustand mitgetestet. Als Kontrolle wurde der relevante Anti-Thioredoxin-Antikörper in einer Konzentration von 2,5 µg/ml mitgeführt und ebenso wie die Schweineseren auch mit Leberpulver und Polystyrol-Beads vorinkubiert.

Abbildung 4-20: Vorinkubation der Seren mit Schweineleberpulver und Polystyrol-Beads, Testung an irrelevanten 6-His-Thioredoxin-gekoppelten Beads



Legende zu Abbildung 4-20:

Unbehandelte Seren wurden ebenso wie mit Leberpulver vorbehandelte und mit Polystyrol-Beads vorinkubierte Seren an irrelevanten, mit 6-His-Thioredoxin-Protein gekoppelten LiquiChip-Beads getestet. Zur Kontrolle wurde der relevante Anti-Thioredoxin-Antikörper bei allen Vorbehandlungen mitgeführt.

Die Fluoreszenzsignale des polyklonalen PCV2-Kaninchen-Antikörpers konnten sowohl durch die Vorbehandlung mit Schweineleberpulver als auch durch die Absättigung mit Polystyrol-Beads um 67 % bzw. 66% gesenkt werden. Die Vorbehandlungen führten jedoch bei dem positiven Feldserum S-1 zu einer Erhöhung der Fluoreszenzwerte um 113 % bzw. 66 %. Die übrigen Seren zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Die Versuche im Rahmen der Etablierung einer Methode zum Nachweis von PCV2-Antikörpern mittels LiquiChip®-Technologie führten zu unvorhersehbaren, nicht weiter spezifizierbaren Fluoreszenzwerten, die durch Bindungen der Schweineseren an die zur Verfügung stehenden Bead-Materialien hervorgerufen wurden. Diese unspezifischen Signale verhindern eine sichere Differenzierung zwischen negativen und positiven Schweineseren, die für einen Einsatz in der Routinediagnostik Voraussetzung ist. Die bestehende Problematik konnte weder durch Vorinkubation der Beads mit Pferdeserum noch durch Blockung der Schweineseren behoben werden. Aus diesem Grund ist die Methode unter Einsatz der zur Verfügung stehenden Reagenzien nicht für die Verwendung in der Routinediagnostik geeignet. Weitere Versuche erscheinen nur unter Einsatz neuer, weiterentwickelter Bead-Varianten Erfolg versprechend.

4.2 Multiplex-PCR zur simultanen Amplifikation von Genomfragmenten aus PCV2, FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2

4.2.1 Quantifizierung des Virusgehalts der Referenzisolate

Der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Referenzisolate wurde mittels Endpunkt-Verdünnungsmethode in Zellkultur bestimmt. Mit Hilfe der Formel nach SPEARMAN (1908) und KAERBER (1931) wurde der Virustiter als Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀/ml) berechnet. Für den Zellkulturüberstand von PCV2 ergab sich ein Gehalt von 10^{6,17} TCID₅₀/ml. Die PRRSV-Genotypen ergaben Werte von 10^{6,5} TCID₅₀/ml für den Referenzstamm Ingelvac MLV (PRRSV-Typ 2) respektive 10^{4,92} TCID₅₀/ml für das Referenzisolat 190131 von PRRSV-Typ 1.

4.2.2 Gehalt der extrahierten Nukleinsäuren an viralen Genomäquivalenten

Alle Verdünnungsreihen der verwendeten Templates gingen von extrahierten Nukleinsäuren aus. Da während der Nukleinsäureextraktion eine Aufkonzentrierung erfolgte, musste dies bei Bestimmung der Äquivalenzwerte entsprechend berücksichtigt werden. Die Extraktion der DNA ging von einem Ausgangsvolumen von 200 µl Zellkulturüberstand aus, die DNA wurde jedoch nur in 90 µl Puffer eluiert. Der theoretische Gehalt an PCV2-DNA im Eluat entsprach somit einem Äquivalent von 10^{6,52} TCID₅₀/ml zuzüglich entsprechender Anteile an nicht replikationsfähigen Virionen sowie subgenomischen Nukleinsäuren im Falle von PRRSV, die ebenfalls von einer PCR erfasst werden. In der RNA-Extraktion wurden 140 µl eingesetzter Zellkulturüberstand in 65 µl Puffer eluiert. Daraus ergibt sich für die PRRSV-Typ 1-RNA ein Äquivalent von 10^{5,25} TCID₅₀/ml, die PRRSV-Typ 2-RNA enthielt etwa ein Äquivalent von 10^{6,83} TCID₅₀/ml. Wird im Folgenden der Begriff TCID₅₀ verwendet, so beschreibt dieser Wert das TCID₅₀-Äquivalent.

4.2.3 Etablierungsversuche für die Multiplex-PCR

4.2.3.1 Funktionsüberprüfung

4.2.3.1.1 Multiplex-RT

Die Antisense-Primer der drei RNA-Viren FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2 wurden in einer Transkriptions-Reaktion zusammengefasst. Jeweils 5 µl der RNA von FLUAVsw-55180, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2 wurden zusammen als Template in einen Ansatz gegeben und transkribiert. Zur Überprüfung der Transkription wurde das Produkt im Anschluss in einer PCR mit den jeweiligen Primern aus der externen RT-PCR der Referenzdiagnostik amplifiziert. Die Influenza-Primer amplifizierten das für FLUAVsw spezifische, 981 bp lange Fragment. Die für PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2 spezifischen Primer amplifizierten Fragmente von 432 bp bzw. 396 bp, die jeweils spezifisch für den ORF7-Bereich von PRRSV-Typ 2 bzw. PRRSV-Typ 1 sind.

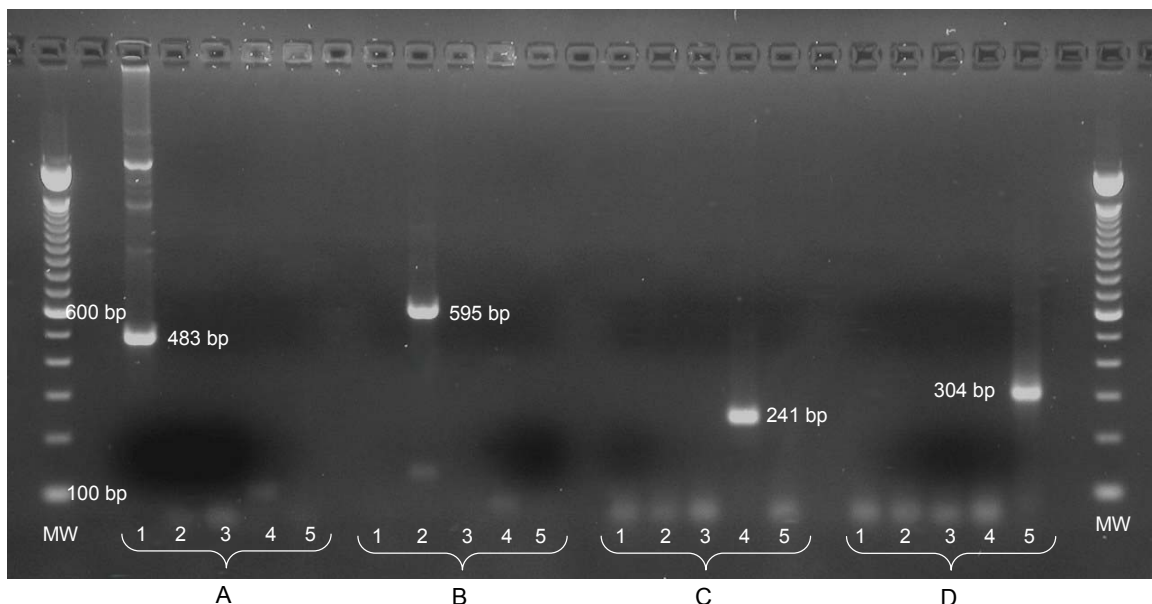
4.2.3.1.2 Untersuchung der Einzelparameter mittels reverser Transkription und PCR unter Multiplexbedingungen

Die PCR-Bedingungen wurden zunächst für jedes Primerpaar einzeln festgelegt. Erst nachdem alle Parameter erfolgreich amplifiziert worden waren, erfolgte die Zusammenführung der Primerpaare in einem Multiplex-Ansatz. Daher wurde zunächst die RNA der Isolate von FLUAVsw-55180 (Subtyp H3N2), PRRSV-Typ 1 bzw. -Typ 2 in der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese cDNAs wurden, wie auch DNA von PCV2, als Template in die jeweilige templatespezifischen PCRs eingesetzt.

Um sicherzustellen, dass die für die Multiplex-PCR konzipierten Primer für FLUAVsw alle beim Schwein relevanten Subtypen erfassen, wurden zuvor die cDNAs der Influenzavirusisolate H1N1, H1N2 und H3N2 als Template in die reverse Transkription mit nachfolgender PCR eingesetzt. Die FLUAVsw-Isolate zeigten für alle drei Subtypen gleichmäßige Banden mit einer Länge von 304 bp (ohne Abbildung).

Bei der Detektion im Agarosegel zeigte sich in jedem Einzelansatz nur das für das jeweilig enthaltene Primerpaar für PCV2, PRRSV-Typ1, -Typ 2 bzw. FLUAVsw spezifische PCR-Amplifikat. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-21 dargestellt.

Abbildung 4-21: Nachweis spezifischer Amplifikate in der Einzel-PCR unter Verwendung monospezifischer Templates unter Multiplexbedingungen



Legende zu Abbildung 4-21:

MW: Molekulargewichtsmarker, 100 - 1500 bp, 2071 bp

PCR mit Primern für: Größe des Amplifikates (RNA bzw. DNA):

A: PCV2 Spur 1: PCV2, 483 bp

B: PRRSV-Typ 2 Spur 2: PRRSV-Typ 2, 595 bp

C: PRRSV-Typ 1 Spur 3: Negativkontrolle (Aqua dest.)

D: FLUAVsw Spur 4: PRRSV-Typ 1, 241 bp

Spur 5: FLUAVsw-55180, 304 bp

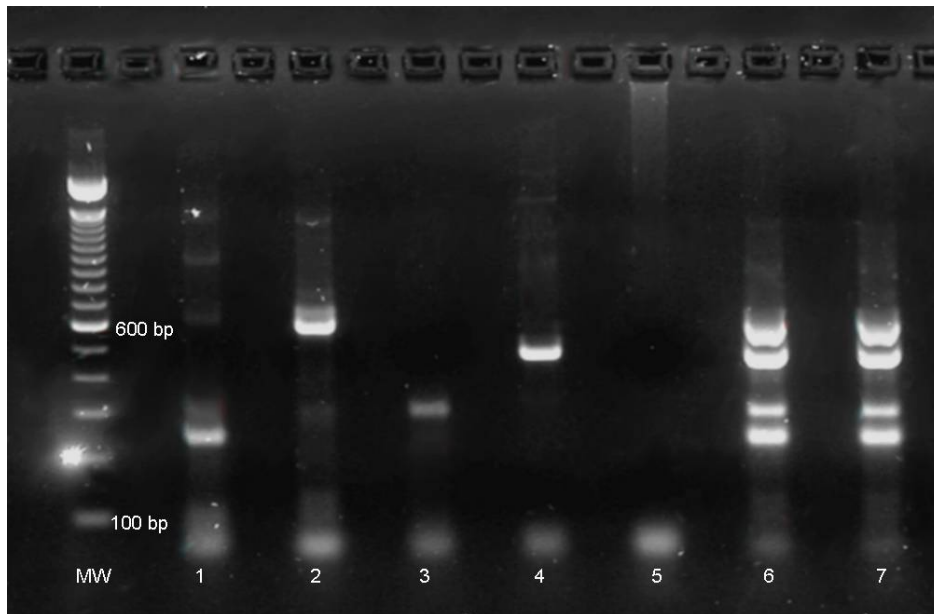
In dem Versuchsansatz konnte mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht mit dem PCV2-Primerpaar eine klar abgegrenzte Bande von 483 bp nachgewiesen werden (Spur A1). Im Molekulargewichtsbereich von 1500 bp und oberhalb von 2000 bp waren weitere Banden

sichtbar. Aufgrund ihrer Höhe waren diese jedoch eindeutig von dem zu erwartenden Amplifikat von 483 bp abgrenzbar. Mit dem PRRSV-Typ 2-spezifischen Primerpaar wurde ein Amplifikat von 595 bp erhalten (Spur B2). Die Produkte der PCR für PRRSV-Typ 1 und FLUAVsw ergaben im Gelbild deutliche Banden mit einer Molekulargewichtsgröße von 241 bp für PRRSV-Typ 1 (Spur C4) und 304 bp für FLUAVsw (Spur D5).

4.2.3.1.3 Untersuchung von Mehrfachtemplates mittels reverser Transkription und Multiplex-PCR

In der reversen Transkription wurden die RNAs der drei RNA-Viren als Einzelprobe und darüber hinaus in einer Probe gemischt (Templatemischung) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden diese RT-Produkte in einen Multiplex-PCR-Ansatz, der jeweils alle vier Primerpaare enthielt, eingesetzt. PCV2-DNA wurde zum einen als Einzelprobe, zum anderen auch als vierter Parameter der cDNA-Templatemischung hinzugefügt.

Abbildung 4-22: Spezifische Amplifikate in der Multiplex-PCR mit singulären Templates und Vierfachtemplates



Legende zu Abbildung 4-22:

MW: Molekulargewichtsmarker, 100 – 1500 bp, 2071 bp

Art des Templates (RNA bzw. DNA):

Spur 1: PRRSV-Typ 1, 241 bp

Spur 2: PRRSV-Typ 2, 595 bp

Spur 3: FLUAVsw-55180, 304 bp

Spur 4: PCV2, 483 bp

Spur 5: Negativkontrolle (Aqua dest.)

Spur 6 und 7: PRRSV-Typ 1-, PRRSV-Typ 2-, FLUAVsw-RNA, PCV2-DNA

Aus den Einzel-cDNAs wurde jeweils ein PCR-Produkt in der für den jeweiligen Parameter spezifischen Länge amplifiziert. Die Mischprobe aus cDNA von PRRSV-Typ 1, -Typ 2 und FLUAVsw-55180 sowie PCV2-DNA, zeigte bei der Auswertung vier deutliche Banden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichtsgrößen gut voneinander zu differenzieren waren. Aufgrund der Stärke der Bande und der durch die Verzerrung eingetretenen

Verbreiterung lag die PCV2-Bande lediglich im Bereich des oberen Randes auf der spezifischen Höhe von 483 bp. Die gesamte Bande erstreckte sich bis auf etwa 430 bp. Die Bande für PRRSV-Typ 2 lag auf der erwarteten Höhe von 595 bp. In den Proben, denen die cDNA von FLUAVsw-55180 bzw. PRRSV-Typ 1 als Einfachtemplates zugegeben wurden, erschienen beide Banden deutlich schwächer als in der Probe mit dem Mehrfachtemplate, waren aber dennoch gut erkennbar.

4.2.3.2 Optimierung der Multiplex-PCR

Um die qualitativen und quantitativen Eigenschaften der PCR-Produkte weiter zu verbessern, sollten die PCR-Reagenzien und Konditionen optimiert werden. Die für die Multiplex-PCR verwendete Reaktionslösung des Multiplex PCR Kits von Qiagen enthält neben der HotStarTaq™ DNA Polymerase, einen speziell auf die synchrone Amplifikation mehrerer Templates abgestimmten Puffer. Nach Herstellerangaben sind die Konzentrationen von Salzen (MgCl₂), dNTPs und anderen Additiven in diesem Puffer bereits aufeinander abgestimmt, so dass eine weitere Optimierung nicht erforderlich ist. Durch Variationen im Temperaturprofil sowie durch die Zugabe von Additiven kann jedoch unter Umständen die Amplifikationseffizienz verbessert oder vereinheitlicht werden. Das Temperaturprofil der Thermozykler wurde zunächst exakt auf die Standardbedingungen des Herstellers (Qiagen® Multiplex PCR Handbook) eingestellt.

Tabelle 4-2: Temperaturprofil der Multiplex-PCR, Standardbedingungen

Aktivierung der Polymerase:
15 min bei 95°C
Amplifikation (45 Zyklen):
30 s bei 94°C
90 s bei 60°C
90 s bei 72°C
Finale Extension:
10 min bei 72°C

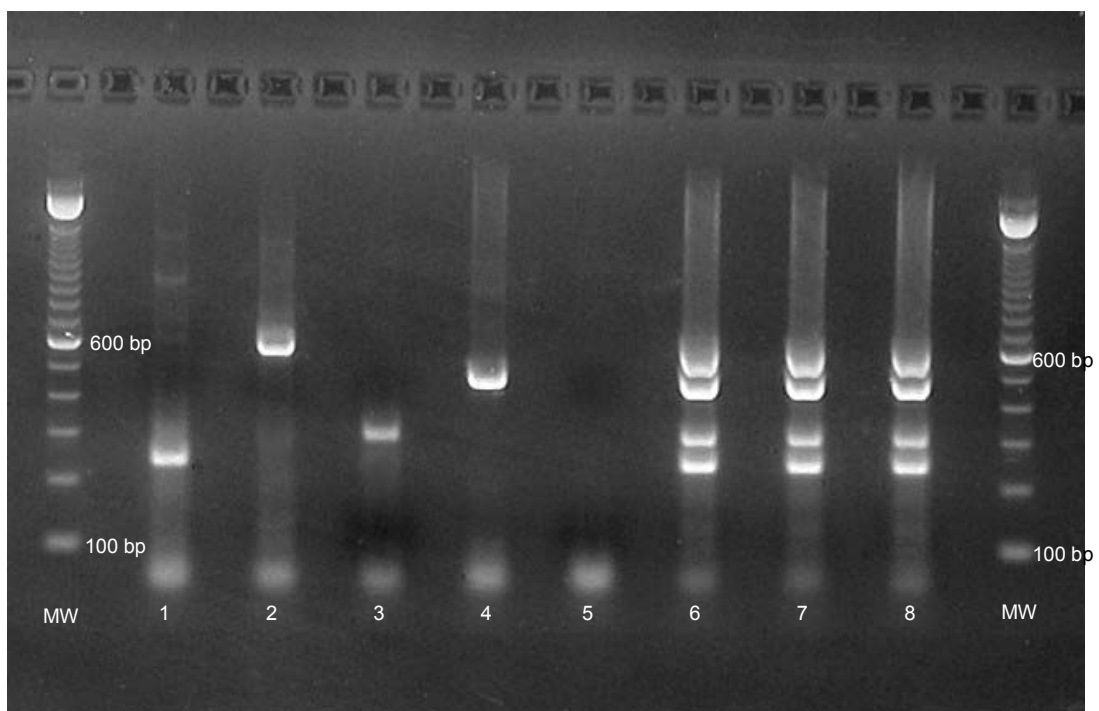
Im Anschluss an die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Primer im Multiplex-PCR-Ansatz (4.2.3.1) wurden PCRs unter abgeänderten Konditionen (Tabelle 4-3) durchgeführt. Als Templates wurden einfach und vierfach positive Multiplex-RT-Produkte der vier Isolate eingesetzt.

Eine Änderung der Annealingtemperatur führte sowohl bei Erhöhung als auch bei Absenkung um je 2°C zu geringgradig schwächeren, weniger gut abgegrenzten Banden. Auch die Zugabe von Q-Solution, dem von Qiagen empfohlenen Additiv, zeigte keine Verbesserung der Amplifikationseffizienz, die Banden waren wie auch bei der Variation der Annealingtemperatur weniger gut abgegrenzt und schwächer. Die Verkürzung der Elongationszeit hatte keine Veränderungen im Bandenbild zur Folge. Positive Auswirkungen auf die Homogenität der verschiedenen Banden hatte die Erhöhung der Primerkonzentration für die Parameter FLUAVsw und PRRSV-Typ 1. Obwohl noch immer ein Unterschied in der Bandenstärke von PCV2 und PRRSV-Typ 2 gegenüber FLUAVsw und PRRSV-Typ 1 erkennbar war (Abbildung 4-23), erschienen die Banden der letzteren Parameter stärker als in der Vergleichs-PCR mit ursprünglichen Primerkonzentrationen.

Tabelle 4-3: Parameter zur Optimierung der Multiplex-PCR

Parameter	Basiswerte	Variationswerte	erhaltene Effekte
Annealing Temperatur	60°C	58°C	Banden schwächer
		62°C	Banden schwächer
Elongationszeit	90 s	60 s	Keine
Additive	keine	Q-Solution	Banden weniger gut abgegrenzt
Primerkonzentration	0,2 µM	0,3 µM für FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 0,2 µM PCV2, PRRSV-Typ 2	Banden für FLUAVsw und PRRSV-Typ 1 etwas stärker als zuvor, Banden aller vier Parameter nahezu gleich stark

Abbildung 4-23: Spezifische Amplifikate in der Multiplex-PCR mit singulären Templates und Vierfachtempletes nach Optimierung der Primer-Konzentrationen (0,3 µM für FLUAVsw, PRRSV-Typ 1, 0,2 µM für PCV2, PRRSV-Typ 2)



Legende zu Abbildung 4-23:

MW: Molekulargewichtsmarker, 100 – 1500 bp, 2071 bp

Art des Templates (RNA bzw. DNA):

Spur 1: PRRSV-Typ 1, 241 bp

Spur 2: PRRSV-Typ 2, 595 bp

Spur 3: FLUAVsw-55180, 304 bp

Spur 4: PCV2, 483 bp

Spur 5: Negativkontrolle (Aqua dest.)

Spur 6 – 8: PRRSV-Typ 1-, PRRSV-Typ 2-, FLUAVsw-RNA, PCV2-DNA

Optimiert werden konnte die Qualität der Banden somit nur durch eine Anpassung der Primerkonzentration. Alle weiteren PCRs wurden unter den ursprünglichen PCR-Bedingungen (Annealingtemperatur 60°C, Extensionszeit 90 s, keine Additive) aber einer Primerkonzentration von 0,3 µM für PRRSV-Typ 1 und FLUAVsw bzw. von 0,2 µM für PRRSV-Typ 2 und PCV2 durchgeführt (Abbildung 4-23).

4.2.3.3 Validität der etablierten Multiplex-PCR

4.2.3.3.1 Spezifität

Die diagnostische Reinheit wurde anhand von Schweine-RNA überprüft. Hierzu wurde die RNA von Tupfer-, Serum- und Organmaterialien aus GCP-kontrollierten Studien, die in den validierten Referenz-PCRs für PRRSV-Typ 1, PRRSV-Typ 2, PCV2 und FLUAVsw keine Amplifikate ergaben, im Multiplexansatz transkribiert und im Anschluss in der Multiplex-PCR getestet. Keine der Proben führte zu spezifischen oder unspezifischen Banden. Das negative Ergebnis der Multiplex-PCR korrelierte somit mit den Voruntersuchungen und den Erwartungswerten.

Sequenzierung

Für den Nachweis der Spezifität der Multiplex-PCR wurden die Amplifikate aus der unter (4.2.3.2) beschriebenen Multiplex-PCR sequenziert. 25 µl Probe wurden mit 10 µl Auftragspuffer vermischt und in einem 1 %igen sowie 1,5 %igen präparativen Agarosegel aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die längeren Banden der PCV2-Amplifikate (483 bp) und der PRRSV-Typ 2-Amplifikate (595 bp) aus dem niedrigprozentigen, die Banden der FLUAVsw- (304 bp) und PRRSV-Typ 1-Amplifikate (241 bp) aus dem höherprozentigen Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Die extrahierte DNA wurde mit den jeweils spezifischen Primern, die mit einer M13-Sequenz verlängert waren, in einer vorbereitenden Sequenzierungs-PCR 1 amplifiziert. Zur Verifizierung wurden die extrahierte DNA sowie die Produkte der Sequenzierungs-PCR 1 erneut auf ein Agarosegel aufgetragen und im Anschluss sequenziert. Die Sequenzierung ergab für jede Bande eine Nukleotidsequenz in erwarteter Länge. Im anschließenden Alignment (9.1) wurde die so erhaltene Sequenz des PCR-Amplifikates mit der Sequenz des als Template in die PCR eingesetzten Referenzisolates und einer weiteren Referenzsequenz verglichen. Für PCV2 wurde die Sequenz mit der GenBank-Nummer AF201897 verwendet, das PRRSV-Typ 2-Amplifikat wurde mit der Sequenz des Ingelvac PRRS[®] MLV Impfstoffes und PRRSV-Typ 1 mit der Sequenz des Lelystad Virus aligned. Im Falle von Influenza kamen drei Sequenzen als Referenz zum Einsatz. Für den Subtyp H1N1 wurde die Sequenz mit der GenBank-Nummer DQ102483, für H3N2 AJ311509 bzw. AJ316054 für H1N2 verwendet. Ausgehend von diesen Referenzsequenzen haben die mittels Multiplex-PCR detektierten Amplifikate eine Nukleotidabweichung von 0,9 % für PCV2, von 0 % für PRRSV-Typ 2 und 5 % im Falle von PRRSV-Typ 1. Für FLUAVsw ergab sich eine maximale Nukleotidsequenzabweichung zum Influenza Subtyp H1N1 von 4 % und minimal von 2,4% gegenüber dem Subtyp H1N2. Somit zeigten die ermittelten Sequenzen der Amplifikate eine signifikante Übereinstimmung mit den zu erwartenden Sequenzen der jeweiligen Referenzisolate.

4.2.3.3.2 Sensitivität

Sensitivität der Multiplex-PCR

Anhand von Verdünnungsreihen wurde die Sensitivität der Multiplex-PCR bestimmt. Zunächst wurden die Titer der Isolate von PCV2, PRRSV-Typ 1 und -Typ 2 ermittelt. Eine Quantifizierung des Virusgehaltes des FLUAVsw-Isolat FLUAVsw-H1N1 wurde nicht durchgeführt, da die Möglichkeit einer Virustitration im Hühnerei nicht gegeben waren. Die RNA-Aufarbeitung der PRRSV-Typ 1 und –Typ 2-Isolate wurden jeweils auf ein Äquivalent von 10^5 TCID₅₀/ml eingestellt. Aufgrund vorausgegangener Versuche wurde die PCV2-DNA für die Sensitivitätsbestimmung von einem Konzentrationsäquivalent von $10^{2,5}$ TCID₅₀/ml der DNA-Aufarbeitung ausgehend verdünnt. Im Falle von FLUAVsw-H1N1 wurde die unverdünnte RNA-Aufarbeitung eingesetzt. Die RNAs beziehungsweise DNAs der vier Virusisolate wurden mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5 bis zur Stufe 1:15.625 verdünnt, dies entsprach einem Äquivalent von 6,4 TCID₅₀/ml bei PRRSV-Typ 1 und –Typ 2 bzw. von 0,02 TCID₅₀/ml für PCV2. Die Sensitivität wurde für jeweils einen Parameter bei Beibehaltung der Ausgangskonzentrationen der anderen Parameter ermittelt. In einer weiteren RT-Reaktion wurden alle RNA-Parameter in Verdünnungsreihen eingesetzt. (Tabelle 4-4)

Tabelle 4-4: Konzentrationen der Parameter in der Multiplex-RT-Reaktion zur Bestimmung der Sensitivität der Multiplex-PCR

RT-Reaktion	Art und Eq der Parameter (je 5 µl pro RT-Ansatz)			
Bezeichnung	FLUAVsw-H1N1	PCV2	PRRSV-Typ 1	PRRSV-Typ 2
a)	unverdünnt, 1:5 – 1:15.625	--	10^5 TCID ₅₀ /ml in allen Ansätzen	10^5 TCID ₅₀ /ml in allen Ansätzen
b)	unverdünnt in allen Ansätzen	--	10^5 TCID ₅₀ /ml, 1:5 – 1:15.625	10^5 TCID ₅₀ /ml in allen Ansätzen
c)	unverdünnt in allen Ansätzen	--	10^5 TCID ₅₀ /ml in allen Ansätzen	10^5 TCID ₅₀ /ml, 1:5 – 1:15.625
d)	unverdünnt, 1:5 – 1:15.625	--	10^5 TCID ₅₀ /ml, 1:5 – 1:15.625	10^5 TCID ₅₀ /ml, 1:5 – 1:15.625

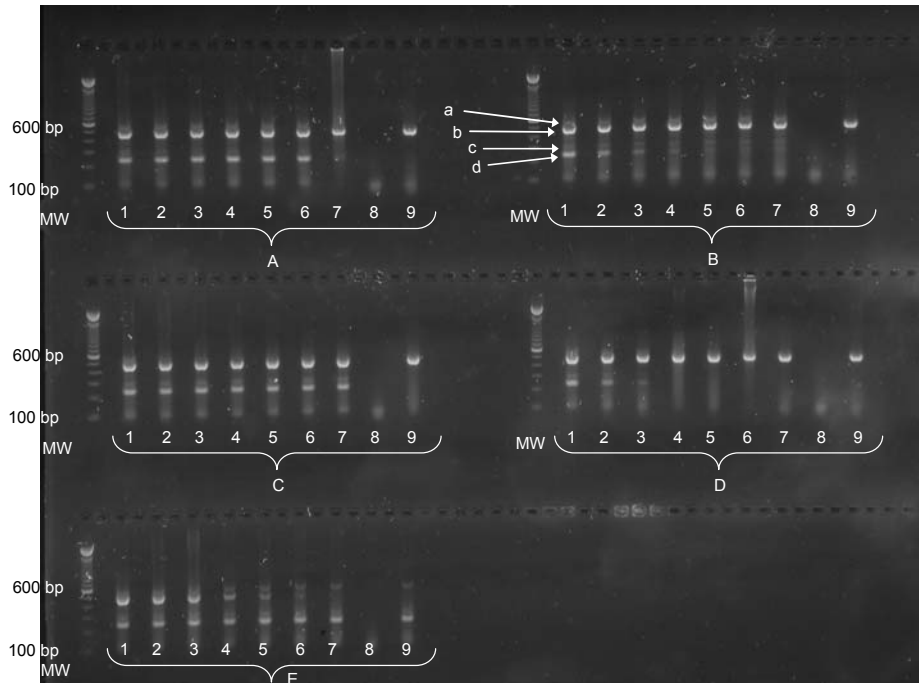
Die so erhaltenen RT-Produkte wurden unter Zusatz von PCV2-Template in der Ausgangskonzentration von $10^{2,5}$ TCID₅₀/ml in der PCR amplifiziert (Tabelle 4-5). Die Verdünnungsreihe der PCV2-DNA wurde mit den RT-Produkten der am höchsten konzentrierten RNAs kombiniert.

Tabelle 4-5: Konzentrationen der Parameter in der Multiplex-PCR-Reaktion zur Bestimmung der Sensitivität der Multiplex-PCR

PCR-Reaktion	Art und Eq der Parameter (je 2µl pro PCR-Ansatz)	
Bezeichnung	cDNA	PCV2-DNA
α)	Produkt aus RT a)	$10^{2,5}$ TCID ₅₀ /ml in allen Ansätzen
β)	Produkt aus RT b)	$10^{2,5}$ TCID ₅₀ /ml in allen Ansätzen
χ)	Produkt aus RT c)	$10^{2,5}$ TCID ₅₀ /ml in allen Ansätzen
δ)	Produkt aus RT d)	$10^{2,5}$ TCID ₅₀ /ml in allen Ansätzen
ε)	cDNA in der Ausgangskonzentration	$10^{2,5}$ TCID ₅₀ /ml, 1:5 – 1:15.625

Trotz der geringeren Konzentration des PCV2-Isolates zeigte sich bei der Auswertung im Agarosegel (Abbildung 4-24) die Dominanz des DNA-Amplifikates. Die Banden der RNA-Viren - insbesondere von PRRSV-Typ 2 und FLUAVsw - waren deutlich schwächer als die PCV2-spezifische Bande.

Abbildung 4-24: Nachweisgrenzen der Parameter in der Multiplex-PCR



Legende zu Abbildung 4-24:

MW: Molekulargewichtsmarker,
100 – 1500 bp, 2071 bp

Spezifität des austitrierten Templates
(RNA bzw. DNA):

- A: FLUAVsw-H1N1
B: PRRSV-Typ 1
C: PRRSV-Typ 2
D: FLUAVsw, PRRSV-Typ 1, PRRSV-Typ 2
E: PCV2

- a: PRRSV-Typ 2 = 595 bp,
b: PCV2 = 483 bp,
c: FLUAVsw-55180 = 304 bp,
d: PRRSV-Typ 1 = 241 bp,

Verdünnung des austitrierten Parameters:

- Spur 1: Ausgangskonzentration
Spur 2: 1:5
Spur 3: 1:25
Spur 4: 1:125
Spur 5: 1:625
Spur 6: 1:3.125
Spur 7: 1:15.625
Spur 8: Negativkontrolle (Aqua dest.) der PCR
Spur 9: Negativkontrolle (Aqua dest.) der
RT-Reaktion, nur PCV2-DNA enthalten

Während die Parameter mit konstanter Konzentration in jedem Ansatz eine Bande aufwiesen, konnten die Parameter, die in einer Verdünnungsreihe eingesetzt wurden, austitriert werden. Die cDNA von FLUAVsw-H1N1 konnte bis zu einer Verdünnung von 1:5 der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden (Abbildung 4-24, Spur A2) (Tabelle 4-6). PRRSV-Typ 1 zeigte Banden bis zur Verdünnungsstufe 1:125 (Spur B4). Unter Berücksichtigung des eingesetzten Äquivalents von 10^5 TCID₅₀/ml entspricht dieses Ergebnis einer Nachweisgrenze von 0,16 TCID₅₀. PRRSV-Typ 2 konnte nur in unverdünnter

Konzentration nachgewiesen werden (Spur C1), bei einem Ausgangsäquivalent von 10^5 TCID₅₀/ml war eine Konzentration entsprechend 20 TCID₅₀ in diesem Ansatz enthalten. PCV2 zeigte noch bei einer Verdünnung von 1:3.125 ein Amplifikat (Spur E6). Diese Verdünnung entspricht einem Äquivalent von 0,0002 TCID₅₀ im PCR-Ansatz. In der PCR, in der alle RNA-Viren in Verdünnungsreihen eingesetzt wurden und nur PCV2 einen konstanten Titer von $10^{2,5}$ TCID₅₀-Äquivalenten behielt, zeigte sich die Nachweisgrenze innerhalb der RNA-Viren homogener. Während FLUAVsw-H1N1 und PRRSV-Typ 2 konstant bis zu einer Verdünnung von 1:5 (Spur D2) bzw. unverdünnt (Spur D1) (entsprechend 20 TCID₅₀) Amplifikate ergaben, wies PRRSV-Typ 1 nur Banden bis zur Verdünnung 1:25 (Spur D3) auf. Dies entspricht einem Äquivalent von 0,8 TCID₅₀.

Tabelle 4-6: Nachweisgrenze der Parameter in der Multiplex-PCR-Reaktion

PCR	Titrierter Parameter	Ausgangs-Eq	niedrigstes Eq bzw. Verdünnungsstufe mit Amplifikat	absolute Menge an Eq (TCID ₅₀) im PCR-Ansatz
α)	FLUAVsw-H1N1	nicht quantifiziert	1:5	nicht quantifiziert
β)	PRRSV-Typ 1	10^5 TCID ₅₀ /ml	320 TCID ₅₀ /ml	0,16 TCID ₅₀
χ)	PRRSV-Typ 2	10^5 TCID ₅₀ /ml	10000 TCID ₅₀ /ml	20 TCID ₅₀
δ)	FLUAVsw	nicht quantifiziert	1:5	nicht quantifiziert
	PRRSV-Typ 1	10^5 TCID ₅₀ /ml	400 TCID ₅₀ /ml	0,8 TCID ₅₀
	PRRSV-Typ 2	10^5 TCID ₅₀ /ml	10000 TCID ₅₀ /ml	20 TCID ₅₀
ε)	PCV2	$10^{2,5}$ TCID ₅₀ /ml	0,1 TCID ₅₀ /ml	0,0002 TCID ₅₀

Sensitivität der Referenz – PCRs

Zu Vergleichszwecken wurde die Sensitivität der Referenz-PCRs aus der Einzelparameter-Diagnostik bestimmt (ohne Abbildung). Die Virusisolate, deren Titer mit Ausnahme der FLUAVsw-Isolate bekannt waren, wurden in Verdünnungsreihen jeweils 1:5 bis auf 1:1.953.125 verdünnt, dies entspricht einem Virusäquivalent von 1,7 TCID₅₀/ml für PCV2, 0,09 TCID₅₀/ml für PRRSV-Typ 1 und 3,46 TCID₅₀/ml für PRRSV-Typ 2. Im Falle von PRRSV-Typ 1 und -Typ 2 wurde auf eine nested PCR verzichtet. Die Nachweisgrenze der PCR für PCV2 lag bei einem Äquivalent von 3,2 TCID₅₀/ml. Bezogen auf den PCR-Ansatz von 50 µl Gesamtvolumen bedeutet dies, dass eine Menge entsprechend 0,025 infektiösen Viruspartikeln amplifiziert und damit auch detektiert werden konnte (Tabelle 4-7). Die externe PCR mit FLUAVsw-H1N1 als Template ergab sehr schwache Banden bis zu einer Verdünnung von 1:5, nach Durchführung der nested PCR jedoch waren deutliche, sehr kräftige Banden bis zu einer Verdünnungsstufe 1:125 erkennbar. Da eine Quantifizierung des Virusgehaltes nicht möglich war, ist dies Ergebnis nur eingeschränkt aussagekräftig, jedoch kann ein relativer Vergleich erfolgen. Die externe PCR der Routinediagnostik für PRRSV, die eine Detektion von PRRSV-Typ 1 bzw. PRRSV-Typ 2 mit demselben Primerpaar ermöglicht, detektierte PRRSV-Typ 1 bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:3125 und PRRSV-Typ 2 bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:78125. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Ausgangskonzentration ergibt sich daraus eine detektierbare, absolute Anzahl

entsprechend einem Äquivalent von 0,11 TCID₅₀ (56,9 TCID₅₀/ml) für PRRSV-Typ 1 bzw. 0,17 TCID₅₀ (86,5 TCID₅₀/ml) für PRRSV-Typ 2 pro PCR-Ansatz von 50 µl Volumen.

Tabelle 4-7: Nachweisgrenze der Parameter in der PCR-Reaktion der Routinediagnostik

Parameter	höchstes Eq	niedrigstes Eq bzw. Verdünnungsstufe mit erkennbarer Bande	absolute Menge an Eq [TCID ₅₀] im PCR-Ansatz
PCV2	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml	3,2 TCID ₅₀ /ml	0,025
FLUAVsw-H1N1	nicht quantifiziert	externe PCR: 1:5 nested PCR: 1:125	nicht quantifiziert
PRRSV-Typ 2	10 ^{6,83} TCID ₅₀ /ml	86,5 TCID ₅₀ /ml	0,17
PRRSV-Typ 1	10 ^{5,25} TCID ₅₀ /ml	56,9 TCID ₅₀ /ml	0,11

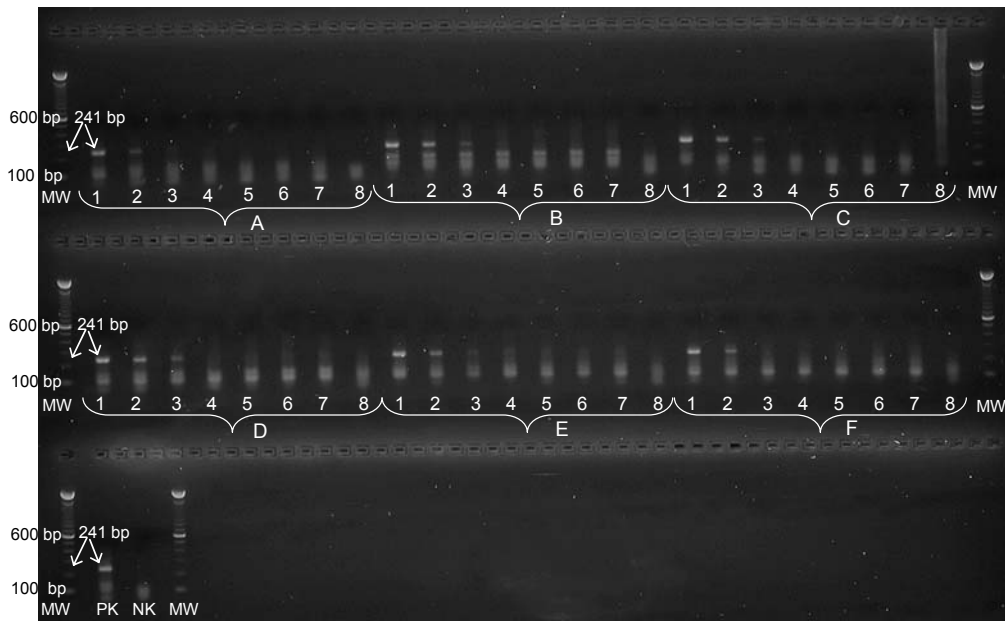
Abschließend betrachtet hat die Multiplex-PCR im Vergleich zu den Referenz-PCRs aus der Einzelparameterdiagnostik für PRRSV-Typ 1 eine vergleichbare Sensitivität. Die Nachweisgrenze für PRRSV-Typ 2 und FLUAVsw liegt etwa zwei log₁₀-Stufen niedriger, während PCV2 mit einer um zwei log₁₀-Stufen höheren Sensitivität nachgewiesen wird.

4.2.3.3 Einfluss von porziner Hintergrund-RNA

Der Effekt von porziner RNA auf die Sensitivität der Multiplex-PCR wurde am Beispiel von PRRSV-Typ 1 bestimmt. In der Referenzdiagnostik negativ getestetes Serum, Tupfermaterial sowie Lunge, Milz und mediastinale Lymphknoten aus GCP-kontrollierten Studien wurden der RNA-Extraktion unterzogen und im Anschluss in den Einzelparameter-RT-PCRs sowie in der Multiplex-RT-PCR auf das Freisein von PRRSV-Typ 1, -Typ 2, FLUAVsw und PCV2 getestet. Die RNA des Referenzisolates für PRRSV-Typ 1 wurde auf ein Virusäquivalent von 10⁵ TCID₅₀/ml eingestellt und in log₁₀-Stufen bis auf 10⁰ TCID₅₀/ml verdünnt. Mit dieser Verdünnungsreihe wurden unterschiedliche RT-Ansätze erstellt. Zum einen wurden 2 µl der jeweiligen Verdünnung zu 48 µl des RT-Reaktionsansatzes gegeben, zum anderen wurden 2 µl der Verdünnungen zu 15 µl Schweine-RNA und 33 µl RT-Reaktionsansatz hinzugefügt. Auf diese Weise wurde die PRRSV-Typ 1-RNA allein und in Anwesenheit von porziner Serum-, Tupfer-, Lungen-, Milz- bzw. Lymphknoten-RNA transkribiert. Es wurden jeweils 15 µl Schweine-RNA verwendet, um so die Mengenverhältnisse in der Multiplex-RT und -PCR mit klinischem Material nachzustellen. Nach erfolgter reverser Transkription wurden 2 µl des jeweiligen RT-Produktes zu 48 µl des Reaktionsansatzes der Multiplex-PCR hinzugegeben und im zugehörigen Temperaturprofil amplifiziert.

Die gelelektrophoretische Auswertung (Abbildung 4-25) ergibt ein sehr homogenes Bild, denn die Nachweisgrenze der Multiplex-PCR liegt für PRRSV-Typ 1 zwischen einem Äquivalent von 10⁴ und 10³ TCID₅₀/ml (Spuren A3, B3, C3, D3, E2 und F2) (Tabelle 4-8). Dies entspricht einer absoluten Menge von 0,8 und 0,08 Virusäquivalenten im PCR-Ansatz von 50 µl Volumen. Dieser Schwellenwert ist ebenso wie die Qualität der Banden unabhängig von der Anwesenheit porziner Hintergrund-RNA verschiedenster Herkunft.

Abbildung 4-25: Einfluss von porziner Hintergrund-RNA auf die Nachweisgrenze von PRRSV-Typ 1 in der Multiplex-PCR



Legende zu Abbildung 4-25:

MW: Molekulargewichtsmarker,
100 – 1500 bp, 2071 bp

PK: Positivkontrolle
(PRRSV-Typ 1-Isolat, 241 bp)

NK: Negativkontrolle (Aqua dest.)

Ursprung des Templates (RNA):

- A: PRRSV-Typ 1
 B: PRRSV-Typ 1 + porcine Nasentupfer
 C: PRRSV-Typ 1 + porcines Serum
 D: PRRSV-Typ 1 + porcine Milz
 E: PRRSV-Typ 1 + porciner
 Mediastinallymphknoten
 F: PRRSV-Typ 1 + porcine Lunge

Konzentrationen des Templates:

- Spur 1-6: PRRSV-Typ 1, $10^5 - 10^0$ TCID₅₀/ml
 Spur 7: porcine RNA ohne PRRSV-Typ 1
 Spur 8: Negativkontrolle (Aqua dest.)

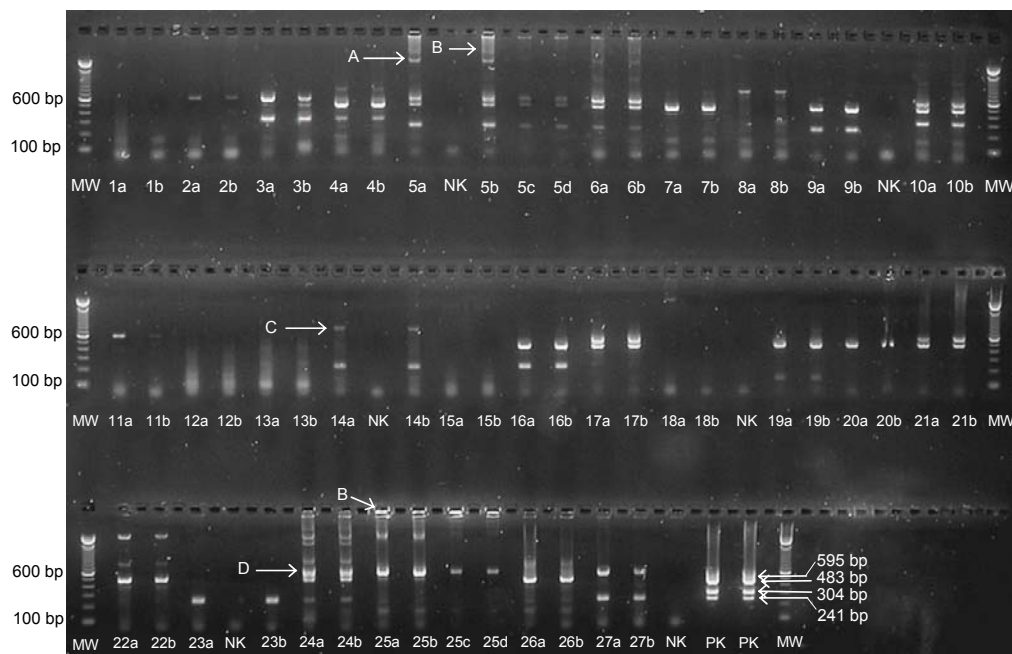
Tabelle 4-8: Nachweisgrenze von PRRSV-Typ 1 in Anwesenheit von porciner Schweine-RNA

	höchstes Eq an PRRSV-Typ 1-RNA	niedrigstes Eq mit erkennbarer Bande	absolute Menge an Eq [TCID ₅₀] im PCR-Ansatz
nur PRRSV-Typ 1-RNA	10^5 TCID ₅₀ /ml	1,6 TCID ₅₀ /ml	0,08 TCID ₅₀
PRRSV-Typ 1- + Serum-RNA	10^5 TCID ₅₀ /ml	1,6 TCID ₅₀ /ml	0,08 TCID ₅₀
PRRSV-Typ 1- + Tupfer-RNA	10^5 TCID ₅₀ /ml	1,6 TCID ₅₀ /ml	0,08 TCID ₅₀
PRRSV-Typ 1- + Milz-RNA	10^5 TCID ₅₀ /ml	1,6 TCID ₅₀ /ml	0,08 TCID ₅₀
PRRSV-Typ 1- + Lymphknoten-RNA	10^5 TCID ₅₀ /ml	16 TCID ₅₀ /ml	0,8 TCID ₅₀
PRRSV-Typ 1- + Lungen-RNA	10^5 TCID ₅₀ /ml	16 TCID ₅₀ /ml	0,8 TCID ₅₀

4.2.3.3.4 Einsatz der Multiplex-PCR bei der Untersuchung von Probenmaterial aus der Diagnostik

Aus einem in der Referenzdiagnostik getesteten, definierten Materialpool wurde Proben ausgewählt mit dem Ziel, ein möglichst großes Spektrum an Kombinationen der vier Parameter zu erhalten. Die Templates der vierzehn Kombinationen sollten - wenn möglich - sowohl aus Tupferproben als auch aus Serum und Organmaterial stammen. Das Material wurde als Duplikat in die PCR eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit der PCR zu überprüfen. Zunächst wurde die Proben-RNA in einer Multiplex-RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. 2 µl dieses RT-Produktes wurden mit 2 µl der Proben-DNA in 46 µl des Multiplex-PCR-Ansatzes gegeben und im entsprechenden Temperaturprogramm amplifiziert. Für die Gelauswertung (Abbildung 4-26) wurden die Proben 5 und 25 unverdünnt (a, b) und zur Prüfung einer besseren Trennschärfe der spezifischen Banden 1:5 verdünnt (c, d) auf das Gel aufgetragen.

Abbildung 4-26: Untersuchung diagnostischer Proben in der Multiplex-PCR



Legende zu Abbildung 4-26:

MW: Molekulargewichtsmarker,
100 – 1500 bp, 2071 bp

NK: Negativkontrollen (Aqua dest.)

PK: Positivkontrollen,
PRRSV-Typ 2 = 595 bp,
PCV2 = 483 bp,
FLUAVsw-55180 = 304 bp,
PRRSV-Typ 1 = 241 bp,

Spurbelegung: siehe Tabelle 4-9

A: unspezifische Bande, > 1500 bp

B: unspezifische Nebenfluoreszenzen

C: unspezifische Bande, ca. 800-900 bp

D: Bande in smile-Form

Das Ergebnis dieser Multiplex-PCR wurde mit dem der zuvor durchgeführten Referenz-PCRs verglichen und die Ergebnisse in Tabelle 4-9 und 4-10 aufgelistet.

Tabelle 4-9: Spurbelegung und Auswertung des Agarosegels aus Abbildung 4-26: Untersuchung diagnostischer Proben in der Multiplex-PCR

Spur	Proben-art	Vorergebnisse der Referenz-PCR				Ergebnisse der Multiplex-PCR			
		Typ 1 PRRSV-	Typ 2 PRRSV	FLUAV/sw	PCV2	Typ 1 PRRSV-	Typ 2 PRRSV	FLUAV/sw	PCV2
1a, 1b	Organ	+	-	-	-	-	-	-	-
2a, 2b	Organ	-	+	-	-	-	+	-	-
3a, 3b	Organ	-	+	+	-	-	+	+	+ / -
4a, 4b	Organ	-	+	+	+	-	+	+	+
5a, 5b, 5c, 5d	Organ	+	-	+	+	+	+	-	+
6a, 6b	Organ	+	+	-	+	+	+	-	+
7a, 7b	Tupfer	-	-	+	+	-	-	-	+
8a, 8b	Organ	-	-	+	-	-	-	-	-
9a, 9b	Serum	+	+	-	+	+	-	-	+
10a, 10b	Organ	-	-	+	+	-	+	+	+
11a, 11b	Serum	-	+	-	-	-	+	-	-
12a, 12b	Tupfer	-	-	-	-	-	-	-	-
13a, 13b	Organ	-	-	-	-	-	-	-	-
14a, 14b	Tupfer	+	-	-	-	+	-	-	-
15a, 15b	Serum	-	-	-	-	-	-	-	-
16a, 16b	Tupfer	+	-	-	+	+	-	-	+
17a, 17b	Tupfer	-	+	-	+	-	+	-	+
18a, 18b	Tupfer	-	-	+	-	-	-	-	-
19a, 19b	Organ	-	-	-	+	-	-	-	+
20a, 20b	Serum	-	-	-	+	-	-	-	+
21a, 21b	Serum	-	+	-	+	-	+	-	+
22a, 22b	Tupfer	-	-	-	+	-	-	-	+
23a, 23b	Serum	+	-	-	-	+	-	-	-
24a, 24b	Organ	+	-	-	+	+	+	-	+
25a, 25b, 25c, 25d	Organ	-	+	-	+	-	+	-	+
26a, 26b	Organ	-	-	-	+	-	-	-	+
27a, 27b	Serum	+	+	-	-	+	+	-	-

Legende zu Tabelle 4-9:

a, b: Doppelproben, unverdünntes PCR-Produkt

c, d: Doppelproben, PCR-Produkt, 1 in 5 mit Aqua dest. verdünnt

Tabelle 4-10: Ergebnisse der Multiplex-PCR im Vergleich zu den Ergebnissen der Referenz-PCRs

Parameter	Positive Proben %, positiv in Multiplex-PCR/Referenz-PCR (n/n)	Negative Proben %, negativ in Multiplex-PCR/Referenz-PCR (n/n)
PRRSV-Typ 1	88,8% (8/9)	100 % (18/18)
PRRSV-Typ 2	90 % (9/10)	82,3 % (14/17) ¹
SIV	42,9 % (3/7)	100 % (20/20)
PCV2	100 % (15/15)	95,8 % (11,5 ² /12)

Legende zu Tabelle 4-10:

1 = Proben, die in der Multiplex-PCR positiv, in der Referenz-PCR jedoch negativ für PRRSV-Typ 2 getestet worden waren, wurden erneut in Multiplex- und Referenz-PCR getestet. Bei der Wiederholungsuntersuchung wurde das negative Ergebnis auch in der Multiplex-PCR bestätigt.

2 = Eines von zwei Aliquots eines zuvor negativ getesteten Duplikats zeigte ein positives Ergebnis

88,8% der positiven PRRSV-Typ 1-Proben wurden auch in der Multiplex-PCR positiv getestet. Alle (100%) negativen PRRSV-Typ 1-Proben wurden als negativ erkannt. In 90% der zuvor für PRRSV-Typ 2 positiv getesteten Proben ergab auch die Multiplex-PCR ein positives Ergebnis. Entgegen den Erwartungen aus der Vortestung mit der Referenzmethode wurden in der Multiplex-PCR mit zuvor negativ getesteten Proben drei positive Ergebnisse ermittelt. Bei Nachtestung sowohl in der Referenzmethode als auch in der Multiplex-PCR ergaben auch diese drei Proben ein negatives Ergebnis. 42,9% der positiven FLUAVsw-Proben und alle (100%) zuvor negativ getesteten Proben wurden in der Multiplex-PCR entsprechend erkannt. 100% der positiven Ergebnisse und 95,8 % der negativen Ergebnisse für die PCV2-Proben bestätigten sich in der Multiplex-PCR. In einem geringen Teil der Proben sind schwach unspezifische Banden erkennbar, die aber aufgrund ihrer Position (ca. 800-900 bp sowie > 2000 bp) eindeutig von spezifischen Banden abgrenzbar sind. Ebenfalls zeigen sich vereinzelt die Laufspuren und Gelkavitäten geringfügig fluoreszierend (Spur 5a, A). In diesen Proben zeigt sich auch das unspezifische Amplifikat von > 2000 bp Länge (Spuren 5b und 25a, B). Zudem ist ein unspezifisches Amplifikat der Größe 800-900 bp erkennbar (Spur 14a, C), das aufgrund seiner Größe jedoch eindeutig von den spezifischen Banden abgegrenzt werden kann.

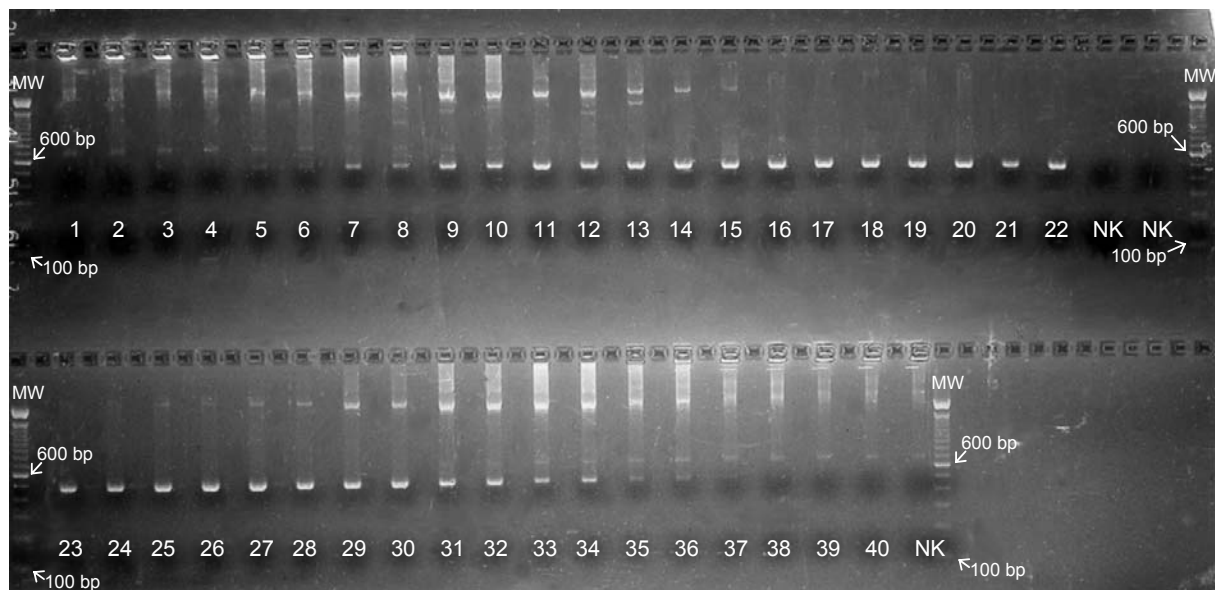
4.2.3.4 Schwierigkeiten bei der Auswertung der Multiplex-PCR

Die Agarosegelbilder der durchgeführten PCRs zeigten in Anwesenheit einer PCV2-Bande bisweilen Nebenfluoreszenzen in der Laufbahn sowie schwache unspezifische Banden auf einer Höhe von 800-900 bp bzw. > 2000 bp. Die PCV2-Bande selbst stellte sich zum Teil stark verbreitert und u-förmig dar, in näherer Umgebung positionierte Banden wie die PRRSV-Typ 2-Bande waren vereinzelt tiefer lokalisiert als ihre Amplifikatlänge erwarten ließ und ebenfalls verzerrt (Spur 24a, D).

Verhalten der PCV2-Amplifikation bei unterschiedlichen Templatekonzentrationen und steigenden Zykluszahlen

Zur Klärung der Ursachen dieser Beobachtung wurde aus Zellkulturüberstand gewonnene PCV2-DNA in verschiedenen Konzentrationen und mit unterschiedlichen Zykluszahlen amplifiziert. Der Einfluss der Konzentration des PCV2-Templates auf die Darstellung der Banden wurde untersucht. Eine Verdünnungsreihe in Stufen von 1:5 von einer Ausgangskonzentration von $10^{6,52}$ TCID₅₀/ml bis zu einem rechnerischen Endkonzentrationsäquivalent von 0,34 TCID₅₀/ml PCV2 wurde in den Reaktionsansatz der Multiplex-PCR, der nur die für PCV2 spezifischen Primern enthielt, pipettiert. Die Amplifikation erfolgte mit 45 Zyklen. Ein Reaktionsansatz mit PCV2-Template der Konzentration von $10^{6,52}$ TCID₅₀/ml wurde erstellt und in 18 Aliquots geteilt. Je zwei Proben wurden nach 20, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 bzw. 45 Zyklen aus dem Thermozykler entnommen und in einem zweiten Thermozykler 10 Minuten bei 72°C gehalten, um die finale Elongation zu gewährleisten (Abbildung 4-27). Hiermit sollte der Einfluss der Anzahl der Amplifikationszyklen auf das Amplifikat geprüft werden.

Abbildung 4-27: Vergleichende PCV2-Amplifikation bei konstanter und abnehmender PCV2-Templatekonzentration und unterschiedlicher Anzahl von Amplifikationszyklen



Legende zu Abbildung 4-27:

MW: Molekulargewichtsmarker, 100 – 1500 bp, 2071 bp

Art des Templates:

Spur 1 – 22: PCV2-DNA in fallender Konzentration
bei konstanter Zykluszahl (45x)

Spur 23 – 40: PCV2-DNA in konstanter Konzentration
($10^{6,52}$ TCID₅₀/ml) bei ansteigenden Zykluszahlen

PCV2 = 483 bp

NK: Negativkontrollen (Aqua dest.)

Tabelle 4-11: Spurbelegung des Agarosegels aus Abbildung 4-27: Vergleichende PCV2-Amplifikation bei konstanter und abnehmender PCV2-Templatekonzentration und unterschiedlicher Anzahl von Amplifikationszyklen

Spurnummer	Zykluszahl	Eq des PCV2-Template
1, 2	45	3311311 TCID ₅₀ /ml
3, 4	45	660693 TCID ₅₀ /ml
5, 6	45	132452 TCID ₅₀ /ml
7, 8	45	26490 TCID ₅₀ /ml
9, 10	45	5298 TCID ₅₀ /ml
11, 12	45	1060 TCID ₅₀ /ml
13, 14	45	212 TCID ₅₀ /ml
15, 16	45	42 TCID ₅₀ /ml
17, 18	45	8 TCID ₅₀ /ml
19, 20	45	1,7 TCID ₅₀ /ml
21, 22	45	0,34 TCID ₅₀ /ml
NK, NK	45	--
Spurnummer	Zykluszahl	Konzentration des PCV2-Template
23, 24	20	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
25, 26	24	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
27, 28	27	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
29, 30	30	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
31, 32	33	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
33, 34	36	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
35, 36	39	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
37, 38	42	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
39, 40	45	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml
NK	45	--

Klare, kräftige Banden auf PCV2-spezifischer Höhe (483 bp) traten bei einer Konzentration des Templates von 0,34 TCID₅₀/ml – 42 TCID₅₀/ml auf (Spuren 15 – 22). Bei steigender Konzentration waren zusätzliche unspezifische Banden auf einer Höhe von über 1500 bp bzw. in den Bandenspuren erkennbar. Ab einem Äquivalent von 10^{5,8} TCID₅₀/ml (Spuren 3 und 4) konnte keine spezifische Bande mehr nachgewiesen werden.

Bei geringen Zykluszahlen (20 und 24 Zyklen, Spuren 23 - 26) stellten sich die PCV2-Amplifikate als singuläre, starke Banden mit einer Länge von 483 bp ohne unspezifische Fluoreszenzen im Hintergrund dar. Mit steigender Zykluszahl wurde zunächst eine unspezifische Bande von über 1500 bp Länge sichtbar (ab Spur 27), ab 33 Zyklen (Spuren 31 und 32) traten die Nebenfluoreszenzen in den Bandenspuren auf. Die für PCV2 spezifische Bande war ab 42 Zyklen (Spuren 37 und 38) nicht mehr sichtbar.

4.2.4 Multiplex-RT-PCR

Nach der Etablierung der Multiplex-PCR sollte im weiteren geprüft werden, inwieweit die reverse Transkription der RNA Templates mittels einer One Tube-RT-PCR in einem Arbeitsschritt mit der Multiplex-PCR durchgeführt werden kann. Durch Kombination des RT-Enzyms und der DNA-Polymerase in einem Mastermix wird die Abfolge der reversen Transkription und der PCR ohne zwischenzeitliches Öffnen des Reaktionsgefäßes ermöglicht. Dies vereinfacht und verkürzt die Arbeitsschritte und vermindert das Kontaminationsrisiko im Labor.

4.2.4.1 Funktionsüberprüfung

Auch im Falle der Multiplex-RT-PCR wurden die Parameter zunächst im Einfachansatz auf Funktionsfähigkeit und Zuverlässigkeit getestet. Jedes Isolat wurde in einer Verdünnungsreihe 1:5 bis zu einer Endverdünnung von 1: 1.953.125 bzw. einem Virusäquivalent von 1,7 TCID₅₀/ml für PCV2, 0,09 TCID₅₀/ml für PRRSV-Typ 1 und 3,46 TCID₅₀/ml für PRRSV-Typ 2 verdünnt und als Template eingesetzt. Auf diesem Wege konnte zeitgleich die Sensitivität der Multiplex-RT-PCR ausgetestet werden. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen sind der Tabelle 4-12 zu entnehmen.

Tabelle 4-12: Funktionsüberprüfung und Sensitivitätsbestimmung der Multiplex-RT-PCR; Konzentrationen der in die Verdünnungsreihen eingesetzten Parameter

Parameter	Ausgangs Eq	niedrigstes Eq
PCV2	10 ^{6,52} TCID ₅₀ /ml	1,7 TCID ₅₀ /ml
FLUAVsw-55180	Unverdünnt	1:1.953.125
PRRSV-Typ 1	10 ^{5,25} TCID ₅₀ /ml	0,09 TCID ₅₀ /ml
PRRSV-Typ 2	10 ^{6,83} TCID ₅₀ /ml	3,46 TCID ₅₀ /ml

Die RT-PCR mit Primern spezifisch für PRRSV-Typ 2 zeigte sehr kräftige, deutlich abgegrenzte Banden auf einer Höhe von 580 – 610 bp. Die Nachweisgrenze lag bei einer Verdünnung von 1:625, das entspricht einer Menge von 22 TCID₅₀/ml für PRRSV-Typ 2. Die Banden in der RT-PCR mit Primern für PRRSV-Typ 1 erschienen weniger stark, dennoch deutlich und klar abgegrenzt. Die letzte Bande war schwach bei einer Verdünnung von 1:625 (0,57 Eq) erkennbar. Die FLUAVsw-spezifischen Primer führten zu Amplifikaten bis zu einer Verdünnung von 1:125. In keinem PCR-Ansatz waren unspezifische Amplifikate oder Nebenfluoreszenzen sichtbar.

In vorbereitenden Versuchen zur One Tube-Multiplex-RT-PCR hatte sich gezeigt, dass PCV2 mit geringer Effizienz und vielen unspezifischen Nebenprodukten amplifiziert wurde. Aus diesem Grunde wurde die PCV2-Verdünnungsreihe als Doppelansatz erstellt. Ein Ansatz wurde ohne RT-Enzym und RNase Inhibitor erstellt und erst nach Durchlaufen der Transkriptionsphase von zwei Stunden bei 37°C zu den übrigen Ansätzen in den Thermozykler gestellt (Abbildung 4-28). Der zweite Ansatz enthielt alle Komponenten der RT-PCR und durchlief die Inkubationsphase bei 37°C für die Reverse Transkription (Abbildung 4-29). Auf diese Weise konnte der Einfluss der RT-Phase auf die Sensitivität der PCV2-Amplifikation bestimmt werden.

Abbildung 4-28: PCV2-Verdünnungsreihe in Multiplex-PCR ohne RT-Phase und RT-Reagenzien

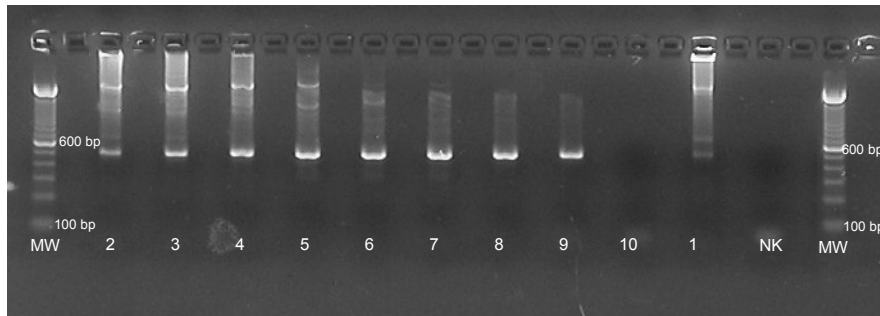
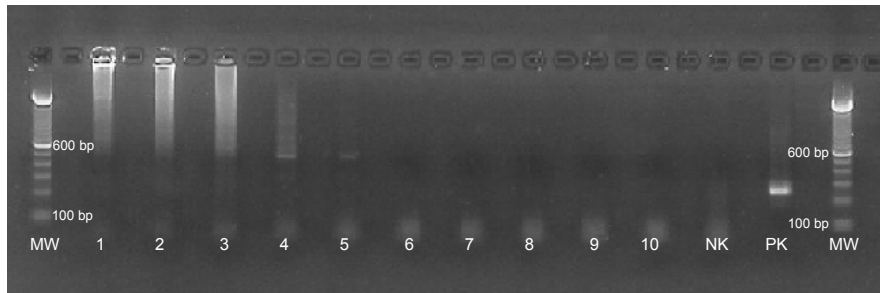


Abbildung 4-29: PCV2-Verdünnungsreihe in vollständiger Multiplex-RT-PCR



Legende zu Abbildung 4-28 und Abbildung 4-29:

- MW: Molekulargewichtsmarker, 100 – 1500 bp, 2071 bp
 NK: Negativkontrollen (Aqua dest.)
 PK: Positivkontrolle (PRRSV-Typ 1-RNA + -Primer, 241 bp),
 Art des Templates:
 Spur 1 – 10: PCV2-DNA ($10^{6,52}$ TCID₅₀/ml – 0,34 TCID₅₀/ml), 483 bp

Die Multiplex-RT-PCR, die keine reverse Transkriptionsphase durchlaufen hatte, wies bereits in deutlich höheren Verdünnungsstufen (ab einem Eq von 8 TCID₅₀/ml) Banden auf, die in den entsprechenden Proben der Multiplex-RT-PCR mit Transkriptionsphase nicht erkennbar waren (Abbildung 4-28, Spur 9). Die PCV2-spezifische Amplifikate in der höchsten Konzentration waren etwas schwächer sichtbar. Mit steigender Konzentration entstand zudem eine unspezifische Zusatzbande (Abbildung 4-28, Spur 5) in einer Höhe von über 1500 bp und die Laufspuren der Banden (Abbildung 4-28, Spuren 1 – 5) zeigten mäßige Nebenfluoreszenzen. Die PCV2-spezifischen Banden der Multiplex-RT-PCR, die die Transkriptionsphase durchlaufen hatte, waren lediglich in den Konzentrationsäquivalenten 1060 TCID₅₀/ml und 212 TCID₅₀/ml und dort nur sehr schwach erkennbar (Abbildung 4-29, Spuren 4 und 5). In den niedrigeren Verdünnungsstufen zeigten sich weder spezifische noch unspezifische Banden. Bei hoher Templatekonzentration waren starke Nebenfluoreszenzen in der Bandenlaufspur und den Gelkavitäten erkennbar, jedoch keine PCV2-spezifischen Banden (Abbildung 4-29, Spuren 1 – 3).

4.2.4.2 Effizienz der PCV2-Amplifikation

4.2.4.2.1 Inhibition der PCV2-Amplifikation durch RNA

Die Ursachen für die in 4.2.4.1 festgestellte, deutliche Minderung der Sensitivität des PCV2-Nachweises durch die RT-PCR sollte in weiteren Versuchsansätzen untersucht werden. Um den Einfluss von Proben - RNA auf die PCV2-Amplifikation zu bestimmen, wurden exemplarisch zwei Feldproben, die in der Referenzdiagnostik zuvor positiv auf PCV2 getestet worden waren, einem RNase-Verdau unterzogen. Der Reaktionsansatz wurde vergleichend mit und ohne RNase- Verdau des Proben templates durchgeführt. Als Amplifikationskontrolle wurden DNA des PCV2-Referenzisolates und als Kontrolle der reversen Transkription RNA des PRRSV-Typ 1-Referenzisolates mit nachgelagerter PRRSV-Typ 1-spezifischer PCR mitgeführt. Ein Ansatz durchlief die vollständige Multiplex-RT-PCR, ein zweiter Ansatz wurde unter Auslassen der Phase der reversen Transkription amplifiziert. Das Ergebnis ermöglichte einen Hinweis darauf, ob die Anwesenheit von RNA die Amplifikationseffizienz einschränkt. In dem Ansatz mit RT-Transkriptionsphase sind weder für die unbehandelten noch die mit RNase verdauten Proben Banden sichtbar. Die integrierte Kontrolle mit PRRSV-Typ 1-Primern und PRRSV-Typ 1-RNA zeigt kräftige spezifische Banden, die belegen, dass die RT-PCR-Reaktion erfolgreich abgelaufen ist. Während mit den Proben ohne reverse Transkriptionsphase eine deutliche PCV2-spezifische Bande von 483 bp nachweisbar war, führte die reverse Transkription zu einer deutliche Abschwächung der PCV2-Amplifikation. Die RNase-Behandlung der Proben führte zu keine Verstärkung der PCV2-Amplifikation.

4.2.4.2.2 Inhibition der PCV2-Amplifikation durch Komponenten des Reaktionsansatzes

Um auszuschließen, dass eine Komponente des Reaktionsansatzes oder des Temperaturprofils den Rückgang der Sensitivität für den Nachweis von PCV2 in der Multiplex-RT-PCR bewirkt, wurde aus identischen Reaktionsansätzen jeweils eine Komponente entfernt bzw. die Dauer der Inkubation für die Reverse Transkription verändert. Ein Reaktionsansatz, der nur Multiplex-Primer für PCV2 enthielt, wurde für zehn Proben erstellt. Fünf der Proben enthielten als Template DNA des PCV2-Referenzisolates in einem Konzentrationsäquivalent von $10^{3,25}$ TCID₅₀/ml, fünf weiteren Proben wurde anstelle von PCV2-DNA Aqua dest. zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde im Temperaturprofil der Multiplex-RT-PCR amplifiziert. Eine PCV2-Probe und eine Negativkontrolle mit Aqua dest. durchliefen die vollen 60 Minuten der Transkriptionsphase bei 37°C. Jeweils nach fünfzehn Minuten wurden eine weitere PCV2-Probe und eine Negativkontrolle in den Thermozykler gestellt. Auf diese Weise entstanden identische Proben, die sich durch Transkriptionszeiten von 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten unterschieden. Zusätzlich wurden zwei Aliquots für je zwei Proben des Reaktionsansatzes abgeteilt. In einem wurde das Sensiscript-RT-Enzym, in dem anderen der RNase Inhibitor durch Aqua dest. ersetzt. Einem Aliquot wurde PCV2-DNA, dem anderen Aliquot Aqua dest. als Kontrolle zugegeben. Beide Versuchsansätze durchliefen das Temperaturprogramm der Multiplex-RT-PCR mit einer vollständigen Inkubationsphase bei 37°C. Auf diese Weise konnte abgeklärt werden, ob die Länge der Transkriptionsphase beziehungsweise die Anwesenheit eines der RT-Reagenzien ausschlaggebend für die verminderte Amplifikationseffizienz von PCV2 in der RT-Multiplex-

PCR war. Ein Reaktionsansatz mit PRRSV-Typ 1-Multiplex-Primern und PRRSV-Typ 1-RNA diente als Kontrolle der erfolgreichen reversen Transkription und Amplifikation. Diese Kontrolle bestätigte in der Gelauswertung durch kräftige Banden in spezifischer Höhe den Erfolg sowohl der reversen Transkription als auch der PRRSV-spezifischen Amplifikation. Alle Proben der Multiplex-RT-PCR, die PCV2-Template enthielten, zeigten eine Bande auf PCV2-spezifischer Höhe von 483 bp, diese Banden unterschieden sich jedoch deutlich in Qualität und Intensität. Mit steigender Dauer der Transkriptionsphase wurde die Bande deutlich schwächer und schmaler. Die Bande im Reaktionsansatz ohne RNase Inhibitor erschien deutlich schwächer als in dem vergleichbaren Ansatz mit voller Transkriptionsphase und enthaltenem RNase Inhibitor. Die stärkste Bande zeigte sich in dem Reaktionsansatz, der die vollen 60 Minuten Transkriptionsphase durchlaufen hatte, jedoch kein Sensiscript RT-Enzym enthielt. In dieser Probe war nicht nur die Bande sehr stark, zusätzlich wies die Laufspur Nebenfluoreszenzen auf und die bereits zuvor beobachteten unspezifischen Nebenbanden in Höhen von 800-900 bp bzw. > 2000 bp waren sichtbar. In der PCR zur Funktionsüberprüfung der Multiplex-RT-PCR (4.2.4.1) konnte dargestellt werden, dass die im selben Reaktionsgefäß vorgelagerte Reverse Transkription (One Tube RT-Multiplex-PCR) die Effizienz des PCV2-Nachweises signifikant verschlechtert.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Eignung von Multiplex PCR-Verfahren in der Diagnostik ausgewählter Infektionskrankheiten beim Schwein erfolgte zunächst die Prüfung der erfolgreichen Amplifikation von Einfach- und Mehrfachtemplates unter Multiplex-PCR-Bedingungen mit getrennt durchgeführter reverser Transkription. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen wurde die Validität der Multiplex-PCR in Bezug auf Spezifität und Sensitivität untersucht. Die Nukleinsäurefolge der Amplifikate wurden durch Sequenzierung ermittelt. Die Sensitivität für PRRSV-Typ 1 ist vergleichbar mit der Referenz-PCR für PRRSV-Typ 1. Die Sensitivität für PRRSV-Typ 2 und FLUAVsw ist um etwa zwei log₁₀-Stufen herabgesetzt, die Sensitivität für PCV2 ist um zwei log₁₀-Stufen erhöht. Die Anwesenheit von porziner RNA hat keinen Einfluss auf die Nachweisgrenze der Parameter in der Multiplex-PCR. Bei einer vergleichenden Untersuchung von Probenmaterial aus der Diagnostik konnte in 94,7 % (63,5/67) der Proben die negativen Ergebnisse der Referenz-PCR bestätigt werden. Die positiv getesteten Proben wurden in einer zweiten Testung mit Multiplex-PCR und Referenz-Methode als negativ verifiziert. 100 % der in der Referenz-PCR positiv für PCV2 getesteten Proben erzielten in der Multiplex-PCR ein übereinstimmendes Ergebnis (90% für PRRSV-Typ 2, 88,8 % für PRRSV-Typ 1 und 42,9 % für FLUAVsw). Die in den Agarosegelbildern bisweilen auftretenden unspezifischen Banden und Verzerrungen der spezifischen PCV2-Banden, konnten mit einer hohen Konzentration des PCV2-Templates sowie einer hohen Zahl von Amplifikationszyklen in Verbindung gebracht werden.

Zur Vereinfachung und Verkürzung der Arbeitsschritte im Labor wurde die Machbarkeit einer One Tube-RT-Multiplex-PCR überprüft. Die Amplifikationseffizienz für PCV2-PCR war um etwa zwei log₁₀ Stufen verringert und die Banden nur schwach erkennbar. Die im Anschluss durchgeführten Versuche zeigten, dass zum einen die Inkubationsphase bei 37°C, zum anderem die Anwesenheit des Transkriptionsenzym für diese Beeinträchtigung verantwortlich ist. Der RT-PCR-Ansatz wurde nicht weiterverfolgt und die zu Anfang der Arbeit beschriebene zweiphasige Multiplex-PCR genutzt.

5 Diskussion

5.1 Detektion von Antikörpern gegen PCV2 mittels Flüssigchip-Technologie

Verfahren zum parallelen Nachweis mehrerer pathogenspezifischer Antikörper haben Vorteile für die schnelle Diagnose multifaktorieller Erkrankungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Möglichkeit geprüft werden, eine bisher nur für humanmedizinische Anwendungen etablierte Chipmethode an veterinärmedizinische Fragestellungen zu adaptieren. Die Vorteile der Chipmethoden liegen in der Möglichkeit Mehrparameteranalysen durchzuführen, die eine schnelle und kosteneffiziente Diagnostik mit geringem Materialverbrauch ermöglichen. Mikrochips in Festphasenform, bei denen die Capture-Moleküle auf Nylonmembranen oder Glasträgern fixiert sind, sind kommerziell erhältlich. Das Spektrum der auf den einzelnen Chips nachweisbaren Parameter ist jedoch nicht flexibel. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte LiquiChip[®]-System beruht auf einer Flüssigchip-Technologie, die eine individuelle Anpassung an die zu untersuchenden Parameter erlaubt. Dies entspricht den Anforderungen an ein veterinärmedizinisches Nachweissystem, mit dem eine definierte Anzahl von Parametern in variablen Kombinationen nachgewiesen werden sollte.

Im humanmedizinischen Bereich wird die Flüssigchip-Technik unter anderem in Systemen zum Nachweis von Genmutationen erfolgreich eingesetzt. IANNONE et al. (2000) hybridisierten zwei Oligonukleotidsequenzen, eine Capture- und eine Reporter-Sequenz, deren 3'- und 5'-Ende direkt benachbart sind, an die Template-DNA und amplifizierten diese mittels PCR. Die allel-spezifische Base befindet sich an der Verbindungsstelle der beiden Oligonukleotidsequenzen. Eine Amplifikation ist nur dann erfolgreich, wenn das 3'-Ende der Oligonukleotidsequenz diejenige Nukleotidbase enthält, die für das in der Template-DNA enthaltene Allel spezifisch ist, und mittels DNA-Ligase mit dem Reporter-Molekül verknüpft werden kann. Die Reporter-Sequenz ist fluoreszenzmarkiert und die Capture-Sequenz besteht am 5'-Ende aus einer artifiziellen Nukleotidsequenz. Die zu dieser Verlängerung komplementäre Oligonukleotidsequenz wird an Carboxy-Beads gekoppelt. Enthält die Capture-Sequenz das allel-spezifische 3'-Ende, kommt es zu einem Bindungskomplex aus Reporter-, Capture-Molekül und Carboxy-Bead und somit zu einem positiven Signal im LiquiChip[®]-Gerät. Durch Einsatz verschiedener artifizieller Sequenzen an Beads und Capture-Molekül, die bei jedem allel-spezifischen Nukleotidaustausch an ein andersfarbiges Bead binden, können zahlreiche Genmutationen parallel in einem Multiplex-Ansatz nachgewiesen werden. Eine weitere Einsatzmöglichkeit ist der Nachweis von Zytokinen, wie er zum Beispiel von MARTINS et al. (2004a) und KELLAR et al. (2001) publiziert wurde. In diesen Systemen werden Antikörper gegen die humanen Interleukine 2, 4, 6, 8, 10, 12, sowie gegen IFN- γ und TNF- α an Beads gekoppelt. Die Antikörper binden das jeweilige spezifische Interleukin bzw. IFN- γ und TNF- α aus humanem Serum. Die positive Bindungsreaktion wird im Anschluss durch biotinylierte, monoklonale Antikörper gegen die Interleukine bzw. IFN- γ und TNF- α in Verbindung mit Streptavidin-Phycoerythrin nachgewiesen. Auch in der Pathogendiagnostik finden Chipmethoden Anwendungen. OPALKA et al. (2003) setzten die dem LiquiChip[®]-System zugrunde liegende xMAP[®]-Technologie zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen humane Papillomaviren (HPV) ein. In diesem Ansatz konkurrieren Antikörper aus Patientenseren mit monoklonalen

Antikörpern, die gegen neutralisierende Epitope der humanen Papillomaviren 6, 11, 16 und 18 gerichtet sind. In Bezug auf Sensitivität, Genauigkeit und Präzision erzielte das Testverfahren eine gute Vergleichbarkeit mit einem kompetitiven Radioimmunoassay als Referenzsystem.

Bei der Etablierung eines Testsystems ist eine Validierung Voraussetzung, um die Aussagefähigkeit des Testverfahrens überprüfen und dokumentieren zu können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Nachweis von Antikörpern gegen PCV2 mittels der LiquiChip®-Methode etabliert und in Anlehnung an die Richtlinien des VICH validiert werden. Aus diesem Grund wurden bei der Auswertung der Versuchsergebnisse die Parameter Spezifität, Genauigkeit, Wiederholbarkeit, Linearität berücksichtigt. Als Vergleichsmethode wurde ein nach VICH-Richtlinien validierter IFAT für den Nachweis von PCV2-Antikörpern hinzugezogen. Ebenso dienten Seren aus GCP kontrollierten Studien als Referenzmaterial.

Nach Kopplung eines rekombinanten PCV2 ORF2-Proteins an Carboxy- und Activated-Beads wurden mit PCV2-spezifischen Kontrollseren Fluoreszenzwerte bis zu 2500 MFI für Activated-Beads sowie 1000 MFI für Carboxy-Beads und signifikant niedrigere Werte für die negativen Feldseren erzielt. Die Qualität und Plausibilität der Kopplung wurde durch die Eigenschaften des Fluoreszenz-Histogrammes einer Messung des PCV2-Kaninchen-pAk überprüft. Das Histogramm lässt aufgrund der gut abgegrenzten Fläche der MFI-Signale und der eindeutigen Spitze auf eine homogene Kopplung des PCV2 ORF2-Proteins an die Carboxy-Beads (QIAGEN, persönliche Mitteilung 2006) schließen. Derartige Fluoreszenz-Histogramme werden bei der spezifischen Interaktion zwischen Antikörpern und zugehörigem Antigen erhalten. Da das Protein in der SDS-PAGE Analyse einen ausreichend hohen Aufreinigungsgrad von 95% (M. SCHAEFFER, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., USA, persönliche Mitteilung 2005) zeigte, wurden die erhaltenen Signale als spezifische Indikatoren für die Anwesenheit der PCV2-spezifischen Antikörper im Serum gewertet. Die auf Hintergrundniveau liegenden Messwerte der negativen Feldseren unterstützten diese Annahme. Zur Kontrolle und Überprüfung des gewählten Kopplungsverfahrens wurden Reagenzien eines vom Hersteller etablierten Systems zur Detektion von 6xHis-Thioredoxin-Protein als Capture-Molekül (QIAGEN, persönliche Mitteilung 2006) mittels spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Titrationskurve mit dem erwarteten hohen Bestimmtheitsmaß und reproduzierbaren MFI-Werten, die deutlich höher lagen als die der PCV2-Antikörper-Messungen, bestätigte den Erfolg und die Spezifität der verwendeten Kopplungs- und Messmethoden.

An Carboxy-Beads ergaben sich sowohl bei monoklonalen als auch bei polyklonalen Referenzseren signifikante Unterschiede zwischen PCV2-spezifischen und irrelevanten Antiseren. Ebenso konnte mit PCV2-positivem IFAT Referenzserum gegenüber dem negativem IFAT-Referenzserum ein signifikant höherer Fluoreszenzwert (MFI) gemessen werden. Im Falle der Activated-Beads lagen die MFI-Werte des irrelevanten polyklonalen Kaninchen-IgGs signifikant unter denen des PCV2-Kaninchen-pAk. Entgegen dieser zu erwartenden Beobachtung zeigte der irrelevante monoklonale Antikörper aber höhere Fluoreszenzwerte als der PCV2-spezifische monoklonale Antikörper. Die mit Activated-Beads gemessenen irrelevanten Kontrollseren und Pufferkontrollen zeigten mit Werten über 1500 MFI sehr hohe Hintergrundwerte. SKOGSTRAND et al. (2005) führten Zytokin-Nachweise im Blut von Neugeborenen in Form eines Sandwich-Immunoassays durch. Antikörper gegen

23 humane Zytokine wurden an 23 Bead-Sets gekoppelt. Gebundene Zytokine aus dem Testmaterial wurden mittels biotinyliertem Sekundärantikörper und Streptavidin-Phycoerythrin nachgewiesen. Gelegentlich beobachteten sie sehr hohe Fluoreszenzreaktionen, die sie auf eine unspezifische Bindungsreaktionen der biotinylierten Sekundärantikörpern mit den Capture-Antikörpern auf den Beads zurückführten. Da in der vorliegenden Arbeit ähnliche Beobachtungen gemacht wurden, muss das Vorliegen einer unspezifischen Bindungsreaktion von Antikörpern oder Fremdprotein aus dem Schweineserum an die Activated-Beads in Betracht gezogen werden. Aus diesem Grund wurden für die weitere Etablierung und Optimierung des LiquiChip[®]-Systems Carboxy-Beads bevorzugt und in die weiteren Versuche eingesetzt.

Bei der Titration des PCV2-Kaninchen-pAk konnte bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:2000 ein Anstieg der Fluoreszenzwerte beobachtet werden, ab einer Verdünnung von 1:2500 erfolgte ein Abfall der MFI-Werte. Diese Entwicklung der Fluoreszenzsignale gibt Hinweise auf die Anwesenheit inhibitorischer Substanzen, deren Einfluss durch die Verdünnung abnehmen. Der Abfall der spezifischen Signale ist auf eine Verdünnung der spezifischen Antikörper zurückzuführen, die ab einer bestimmten Verdünnungsstufe ebenfalls eintritt. Um die Bedeutung dieser Beobachtung für die Testung von Schweineseren zu überprüfen, wurden sowohl Feldseren als auch durch Untersuchung im PCV2-IFAT bestätigte Referenzseren vom Schwein in einer Vorverdünnung von 1:1000 eingesetzt. Auch hier zeigten sich signifikante Erhöhungen der MFI-Werte gegenüber den unverdünnten Seren. Ursache für die Hemmung der Fluoreszenz in niedrigen Verdünnungen kann die Anwesenheit von endogenen Serumbestandteilen sein, die mit den übrigen Reaktionskomponenten reagieren. Für Humanserum ist beschrieben, dass im Serum enthaltene Albumine, Bestandteile der Komplementreaktion, Lysozyme, Serumlipide und Fibrinogen in allen Arten von Antikörperbindungsreaktionen an die Testantikörper und die Detektionsantikörper binden oder das Capture-Molekül maskieren können (RAUCH et al. 2005). Hierdurch kann die Reaktion durch Hemmung der Interaktion von Detektionsantikörper, spezifischen Serumantikörpern und gekoppeltem Capture-Molekül herabgesetzt werden oder gar vollständig unterbunden werden. Durch eine Verdünnung des Serums werden sowohl solche Serumbestandteile als auch die spezifischen Antikörper verdünnt. Liegen die spezifischen Antikörper in einer höheren Konzentration vor, so werden die inhibitorischen Substanzen stärker verdünnt als die spezifischen Antikörper, die Überlagerung wird herabgesetzt und es können spezifische Nachweise durchgeführt werden. Bei steigenden Verdünnungen kann sich der positive Effekt wieder relativieren, da es durch die Abnahme der spezifischen Antikörper zu einer Reduktion des spezifischen Signals kommen kann. Durch Verdünnung des Testserums kann auch der „Hook“-Effekt reduziert werden, der durch eine sehr hohe Konzentration des Testanalyten entstehen kann. Dabei bindet der im Überschuss vorhandene Analyt entweder an das gebundene Capture-Molekül oder an den Detektionsantikörper, wobei es nicht oder nur in sehr geringem Umfang zu einer Bindung an beide Reaktionspartner kommt und damit eine Verknüpfung von Detektions- und Capture-Reagenz ausbleibt. In Folge dessen kommt es zu einem herabgesetzten oder negativen Ergebnis (SELBY 1999).

Die Reduktion der spezifischen Signale durch steigende Verdünnung des Testserums kann durch die Einführung von Waschschritten umgangen werden (Qiagen, persönliche Mitteilung 2005). Der „Hook-Effekt“ kann durch Waschschriffe nicht reduziert werden, so dass

zusätzlich eine Titration der Testseren durchgeführt werden sollte, um die optimale Verdünnungsstufe zu ermitteln. Waschschritte stellen eine Möglichkeit dar, die inhibitorischen Substanzen ohne Einfluss auf die spezifische Reaktion herauszufiltern. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Einführung von Waschschritten bereits bei einer geringen Verdünnungen von 1:2,6 zu einer 50 bis 100fachen Erhöhung der MFI-Werte (von 200 - 300 auf 20000 MFI) führte.

Die erhaltenen Werte entsprachen durch den Anstieg der Fluoreszenzwerte in der Tendenz der Antikörperentwicklung nach PCV2-Infektion. Nach experimenteller PCV2-Infektion wird ab dem 14. Tag nach Infektion mittels Immunperoxidase Monolayer Assay (IPMA) ein Anstieg des Antikörpertiters nachgewiesen (LADEKJAER-MIKKELSEN et al. 2002). Innerhalb von 3 - 4 Wochen nach natürlicher Infektion im Feld, die nach Abfall der maternalen Antikörper im Alter von 8 - 11 Wochen erfolgt, zeigt sich ein Antikörper-Anstieg, der nach weiteren 3 - 4 Wochen mit IFAT-Titerwerten von 1:5120 bis 1:20480 Höchstwerte erreicht (LAROCHELLE et al. 2003). Die Antikörpertiter bleiben bis zu 14 Wochen konstant (LADEKJAER-MIKKELSEN et al. 2003). Die mittels LiquiChip[®]-System erhobenen Antikörperwerte zeigten eine Serokonversion in der Verdünnung 1:1000 ab dem Tag 38 nach Infektion. Allerdings war der Anstieg der Fluoreszenzwerte erst 23 Wochen nach Infektion signifikant gegenüber der negativen IFAT-Referenz und der nicht infizierten Kontrolle. Damit erweist sich das LiquiChip[®]-System beim Nachweis einer Serokonversion gegenüber PCV2 durch den sehr langsamen Anstieg des Antikörpertiters und die niedrigen Fluoreszenzwerte (maximal 2000 MFI) mit geringer Spreizung gegenüber IFAT oder IPMA vergleichsweise insensitiv. Eine deutlich Spreizung der Messwerte von Antikörpergehalten in Feldseren ist notwendig, um akute und persistierende PCV2-Infektionen differenzieren zu können. Antikörper gegen PCV2 haben eine hohe Prävalenz in der Schweinepopulation und können mehrere Monate lang nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu akuten Infektionen, die anhand eines Titeranstieges innerhalb eines kurzen Zeitraumes und hohen Antikörpertitern erkennbar sind, zeigen persistent infizierte Tiere jedoch niedrigere Antikörpertiter mit geringgradigen Titterschwankungen. Aus diesem Grund ist eine träge reagierende Methode mit geringer Spreizung für den Nachweis PCV2-spezifischer Antikörper nicht geeignet.

Während Waschschritte bei konventionellen Seren in geringen Verdünnungen (1:2,6 oder 1:4) zu einem bis zu 100fachen Anstieg der Fluoreszenzwerte führten, konnte dieser Effekt bei den Referenzseren aus Maus, Kaninchen und aus SPF-Schweinen nicht in vergleichbarem Maße beobachtet werden. Gegenüber unverdünnt und ohne Waschschritte eingesetzten Referenzseren ergab sich in einer Messung mit 1:4 verdünnten Seren unter Einbeziehung von Waschschritten eine 20 bis 30fache Steigerung. Bei höheren Verdünnungen (1:1000) zeigten sich weder für Referenz- noch für Feldseren Steigerungen gegenüber Messungen in Versuchsansätzen ohne Waschschritte. In Folge der unterschiedlichen Fluoreszenzsteigerung durch die Waschschritte zeigten die Referenzseren deutlich niedrigere Werte als die konventionellen Seren. Ähnlich wie bei den Ergebnissen der vorliegende Arbeit zeigten Waschschritte in den Versuchen von OPALKA et al. (2003) keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzwerte der Standardkurve, die mit einem Referenzserum aus einem Infektionsversuch gemessen wurde. Allerdings lagen die maximalen Messwerte dieser Standardkurve bei 25000 MFI und damit eine log-Stufe über den MFI-Werten, die mit den PCV2-Referenzseren erhalten werden konnten. Die Ursachen

für die unterschiedlichen Fluoreszenzniveaus von konventionellen und Referenzseren können in der Struktur des Capture-Proteins liegen. Die Sequenz der Aminosäuren nativer Proteine wird als Primärstruktur bezeichnet. Abhängig von den physikalisch-chemischen Gegebenheiten ergibt sich durch die räumliche Anordnung nahe beieinander liegender Aminosäurereste eine spezifische Faltung, z.B. α -Helix oder β -Faltblatt, die so genannte Sekundärstruktur. Durch die Interaktion weiter entfernter Aminosäurereste und die Bildung von Disulfidbrücken wird die räumliche Anordnung der gesamten Polypeptidkette des Proteins, die Tertiärstruktur, bestimmt (STRYER 1996). Bei der Kopplung wurden freie Aminogruppen des ORF2-Proteins über kovalente Bindungen an die zu S-NHS-Gruppen aktivierten Carboxy-Gruppen gebunden. Es ist möglich, dass durch diese chemische Reaktion eine Umformung der Tertiärstruktur des PCV2 ORF2-Proteins erfolgte. Die für die Bindung bestimmter Antikörper relevanten Strukturbereiche, die Epitope, könnten dadurch ebenfalls eine Änderung erfahren (LOTTSPEICH U. ZORBAS 1998). Antikörper wie der monoklonale PCV2-Maus-mAk, die nur gegen ein definiertes Epitop gerichtet sind, würden auf diese Weise ihre Reaktivität verlieren, andere spezifische Antiseren, die nur gegen wenige Epitope gerichtet sind, in ihrer Reaktivität abgeschwächt werden. Feldseren beinhalten Antikörper gegen verschiedene PCV2-spezifische Epitope, so dass die Änderung einzelner Epitope die Reaktivität nicht vollständig beeinflusst, sondern nur einen mehr oder weniger großen Einfluss auf die Reaktivität hat. Aus diesem Grund könnten die hohen Signale von konventionellen Schweineseren spezifisch sein, auch wenn die Referenzseren ein deutlich niedrigeres Fluoreszenzniveau zeigen. Unterstützt wird diese Annahme, dadurch, dass die Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Testserum titrierbar waren.

Neben der Veränderung der antigenen Strukturen des PCV2 ORF2-Proteins durch den Kopplungsprozess an die Beads ist auch die Möglichkeit des Auftretens alterungsbedingter Effekte bei der eingesetzten Proteincharge in Betracht zu ziehen. Da zu Anfang der Methodenetablierung und -optimierung sehr homogene und schlüssige Ergebnisse erhalten wurden, könnte eine abnehmende Qualität des bereits gekoppelten oder aber des nativen Antigens Ursache für das Auftreten unspezifischer Bindungen sein. Mögliche Instabilitäten könnten neben konformatorischen Veränderungen im Epitopbereich auch zu einer geringeren Belastbarkeit der Kopplungsbindung bei bereits gecoateten Beads geführt oder eine Kopplung des gealterten Proteins an Beads verhindert haben. Im Laufe der Versuche waren regelmäßig neue Kopplungen durchgeführt und die in jedem Versuch verwendete Charge protokolliert worden. Die Fluoreszenz-Histogramme der getesteten Seren wurden regelmäßig überprüft. Die gut abgegrenzte Fläche und eindeutige Spitze der Histogramme sprachen für eine homogene Kopplung. Plausible Ergebnisse konnten sowohl mit wenige Tage als auch mit zwei bis drei Wochen alten Chargen erzielt werden. Nach Herstellerangaben hängt die Stabilität der gekoppelten Carboxy-Beads von der Stabilität des gekoppelten Moleküls ab, wird aber auch von den Kopplungsbedingungen und der Art der Puffer beeinflusst (QIAGEN, persönliche Mitteilung 2003). Bei Lagerung des PCV2 ORF2-Protein bei 4°C über einen Zeitraum von einem Jahr wurden in vorausgegangenen Stabilitätsanalysen mittels real time-PCR keine Beeinträchtigung durch die Lagerung nachgewiesen (M. SCHAEFFER, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., USA, persönliche Mitteilung 2005). Zur Abklärung möglicher, nicht direkt ersichtlicher Alterungseffekte wurde eine neue Expressionscharge des PCV2 ORF2-Proteins von Boehringer Ingelheim

Vetmedica Inc., USA, hergestellt, elektronenmikroskopisch auf das Vorliegen und die Reinheit virusähnlicher Partikel überprüft (M. SCHAEFFER, E. VAUGHN, Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., USA, persönliche Mitteilung 2006) und nach dem bestehenden Protokoll an Carboxy-Beads gekoppelt. Hierdurch sollten Hinweise auf die Stabilität und mögliche Degradation des Proteins während der Lagerung bei 4°C überprüft werden. Mit beiden Expressionschargen des PCV2 ORF2-Proteins konnten unter Verwendung definierter Seren übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Eine durch die Lagerung beziehungsweise Alterung bedingte verminderte Qualität des PCV2 ORF2-Proteins kann demnach als Ursache für unzureichenden Signalintensitäten der Seren und unerwartet hohe Fluoreszenzwerte aufgrund unspezifischer Bindungen ausgeschlossen werden.

Eine ineffiziente Kopplung des PCV2 ORF2-Proteins kann Ursache für eine unzureichende Sensitivität und Spezifität der Methode sein. Ineffiziente Kopplungen könnten aufgrund fehlender Kopplungseignung des PCV2 ORF2-Proteins auftreten. Das als Antigen eingesetzte PCV2 ORF2-Protein ist ein in Baculoviren exprimiertes rekombinantes Protein. NAWAGITGUL et al. (2000) beobachteten eine Aneinanderlagerung von rekombinantem PCV2 ORF2-Protein zu so genannten Virus-like particles (VLP). Denkbar wäre eine derart starke Aggregation der Protein-Moleküle, dass eine Kopplung der einzelnen Partikel nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß möglich ist. OPALKA et al. (2003) beschrieben die erfolgreiche Kopplung von Virus-like particles des L1 Kapsidproteins des humanen Papillomavirus (HPV) an Luminex® Carboxy-Beads. Obwohl die Konformation der HPV-Partikel empfindlich gegen reduzierende Bedingungen, alkalischen pH-Wert und Ionen-Gehalt ist (MCCARTHY et al. 1998), hatten weder die Kopplungsbedingungen noch die eingesetzten Lagerpuffer PBS, Column A Puffer und Histidin-Puffer mit und ohne Zusatz von 1% BSA negative Auswirkungen auf die Bindungsreaktivität des monoklonalen HPV-Antikörpers an die HPV-Partikel. Derartige Erfahrungsberichte lassen sich nicht *per se* auf andere Proteine übertragen, so dass aus den Ergebnissen von OPALKA et al. (2003) keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Eignung von PCV2 ORF2-Protein gezogen werden können. Allerdings konnte die prinzipielle Bindungsfähigkeit des vorliegenden PCV2 ORF2-Proteins zuvor durch die Titrierbarkeit von Testanalyten bestätigt werden.

Weiterhin wäre es möglich, dass sich das rekombinante PCV2 ORF2-Protein in Tertiärstruktur und Größe und damit auch antigenen Eigenschaft vom nativen PCV2-Virion so stark unterscheidet, dass die in Feldseren enthaltenen PCV2-Antikörper keine Bindungsreaktivität mehr zeigen. Da das PCV2 ORF2-Protein in verschiedenen ELISA-Tests (BLANCHARD et al. 2003, NAWAGITGUL et al. 2002) zum Einsatz kommt, ist eine prinzipielle Eignung als diagnostisches Antigen erwiesen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete ORF2-Protein wurde im Rahmen eines Prototyp-ELISAs zum Nachweis von PCV2-Antikörpern ebenfalls erfolgreich eingesetzt (interne Daten 2006). Eine Funktionsfähigkeit respektive eine Reaktivität des eingesetzten ORF2-Proteins mit PCV2-Antikörpern aus Feldinfektionen konnte somit in anderen Nachweisverfahren nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht erwiesen, dass die Eigenschaften und Bedingungen eines ELISAs direkt auf das LiquiChip®-System übertragbar sind. Jedes im LiquiChip®-System eingesetzte Antigen verhält sich anders und erfordert eine individuelle Anpassung der Reaktionsbedingungen.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte geprüft werden, inwieweit sich Virionen aus PCV2-infizierten Zellkulturen im Hinblick auf ihre Antigenen Eigenschaften und kopplungstechnisch unterschiedlich zu rekombinantem PCV2 ORF2-Protein verhalten. Die

Kopplung der Virionen erfolgte in Anlehnung an KHAN et al. (2005), die den Zellkulturüberstand verschiedener mäuse-pathogener Virustypen unter anderem Mouse Hepatitis Virus, Mouse Minute Virus und Sendai-Virus, nach Zentrifugation und Filtration mit einer 1:1 Mischung aus 0,5 % Triton-X-100 und Protease-Inhibitoren inkubierten und anschließend an Beads koppelten. Testanalyten waren Antikörper gegen die gekoppelten Viruspartikel, die in Testserum vorlagen und mittels biotinyliertem Anti-Maus-IgG und Streptavidin-Phycoerythrin detektiert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde anstelle des rekombinanten PCV2 ORF2-Proteins Virionen aus PCV2-infizierten Zellkulturen in die Kopplung eingesetzt, die mit der zuvor beschriebenen Triton-X-100 Mischung aufgeschlossen worden waren (KHAN et al. 2005). Das nichtionische Detergenz Triton-X-100 bewirkt eine Micellenbildung, die eine Aggregation von Proteinpartikeln verhindert. Dadurch kann die Kopplung unterstützt werden, da die Verfügbarkeit der zur Reaktion mit den Carboxy-Gruppen benötigten Aminogruppen im Capture-Molekül erhöht wird. In dem mit PCV2-Virionen durchgeführten Messansatz konnte eine sechsfache Erhöhung der Signalwerte mit PCV2-Kaninchen-pAk festgestellt werden. Allerdings wiesen die parallel getesteten konventionellen Seren keine veränderten Werte auf, so dass auch mit PCV2-Virionen als Capture-Molekül Spezifität und Sensitivität des Testansatzes nicht verbessert werden konnten.

Weitere Ursachen für ineffiziente Kopplungen könnten zum Beispiel physikalisch-chemische Parameter in der Kopplungsreaktion oder in den Messansätzen sein. In weiteren Ansätzen wurde deshalb versucht, die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Die zuvor erläuterte und an PCV2-Virionen getestete Wirkung des Triton-X-100 wurde an rekombinantem PCV2 ORF2-Protein getestet. Die Behandlung des rekombinanten ORF2-Proteins mit Triton-X-100 führte jedoch sowohl bei den PCV2-Kaninchen-pAk als auch bei einem Feldserum zu einer Reduktion der Fluoreszenzwerte. Da bei den anderen Seren keine substantielle Änderung festgestellt werden konnte, beeinflusste diese Modifikation der Kopplung die Differenzierbarkeit der Seren demnach sogar negativ. Zur Optimierung der Kopplungsreaktion empfiehlt der Hersteller Änderungen der Konzentration des zu koppelnden Antigens in einem Bereich von 25 – 250 µg/ml. Auch in der Literatur sind sehr unterschiedliche Angaben über die eingesetzte Konzentration des zu koppelnden Antigens zu finden. PANG et al. (2005) koppelten humane Autoantigene in einer Konzentration von 5 µg/ml an Carboxy-Beads. Im Falle einer Bindung der im Testserum enthaltenen Autoantikörper an das gekoppelte Antigen, wurden diese mittels biotinyliertem Anti-Human-IgG Antikörper und Streptavidin-Phycoerythrin detektiert. JONES et al. (2002) wiesen Antikörper gegen zwei variable Regionen des G-Proteins des Respiratorischen Synzytial Virus nach, indem sie 250 µg/ml der g1 bzw. g2-Region an unterschiedliche Beads koppelten und eine Bindung der spezifischen Antikörper durch biotinylierte Antispezies-Antikörper und fluoreszenz-konjugiertes Alexa-Streptavidin darstellten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kopplung des PCV2 ORF2-Antigens zusätzlich zur Basiskonzentration von 100 µg/ml in höherer (250 µg/ml) sowie niedrigerer (25 µg/ml) Konzentration durchgeführt. Die Modifikationen der Antigenstruktur und der Konzentration des zu koppelnden PCV2 ORF2-Protein führten nicht zu einer Verstärkung der spezifischen Signale und somit ebenfalls nicht zu einer verbesserten Differenzierbarkeit von PCV2-positiven und negativen Seren.

Die bisher diskutierten Ergebnisse, die mit Schweineseren aus kontrollierten Studien ermittelt wurden, korrelieren tendenziell mit den Ergebnissen aus der IFAT-Referenzmethode. Das

LiquiChip®-System erscheint jedoch aufgrund der unbefriedigenden Fluoreszenzintensität und der langsamen Reaktionszeit für den Einsatz in der Diagnostik ungeeignet. Verschiedene PCV2-positive und negative Schweineseren aus dem Feld wurden getestet, um zu überprüfen, ob die bisherige Einschätzung auf die Untersuchung von Feldseren ebenfalls zutrifft.

Hierzu wurden die Feldseren vergleichend im IFAT und im LiquiChip®-System getestet. Es ergaben sich keine Korrelationen zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden. Im LiquiChip®-System konnten MFI-Werte von 120 bis 10100 gemessen werden, die nicht mit der IFAT-Klassifizierung in PCV2-positive und negative Schweineseren korrelierten. Nur zwei von fünfzehn im IFAT negativ getesteten Seren erzielten im LiquiChip®-Gerät MFI-Werte in Höhe der negativen Referenzseren aus dem IFAT und der Pufferkontrollen. Die übrigen im IFAT negativ getesteten Seren ergaben sehr hohe MFI-Werte, die zum Teil sechsfach über den positiv getesteten Feldseren und den positiven Referenzseren lagen. Es kann sich hierbei um falsch positive Messergebnisse des LiquiChip®-Systems oder aber um falsche negative Werte des IFAT handeln. Die Verwendung von negativen Kontrollseren aus GCP-kontrollierten Versuchen ergab jedoch in keinem Fall Hinweise auf positive Reaktionen im IFAT (Validierungsbericht IFAT, bioScreen / Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc. 2006). Im IFAT wird das native PCV2-Virus in der Zellkultur eingesetzt und schonend in Methanol-Azeton-Lösung fixiert. Die Struktur des Virus-Partikels bleibt auf diese Weise weitgehend erhalten, was sich in Spezifität und Morphologie der Fluoreszenzfärbung zeigt. Die vergleichenden Ergebnisse des LiquiChip®-Versuches legen somit nahe, dass es sich bei den hohen Fluoreszenzsignalen, die mit Seren konventionell gehaltener Schweine gemessen wurden, um unspezifische Signale handelt. Komponenten aus dem Testserum können neben den zuvor beschriebenen Effekten der Inhibition von Antikörperreaktionen auch zu Kreuzreaktionen und / oder unspezifischen Bindungen führen. Die Folge sind falsch positive Messergebnisse oder bei Erhöhung des Schwellenwertes falsch negative Beurteilungen (RAUCH et al. 2005). Das als Kontrollen in die vergleichende Untersuchung eingeschlossene irrelevante Kaninchenserum und der L. intracellularis-mAk lieferten Werte, die mit 600 bzw. 300 MFI geringfügig über denen der Pufferkontrolle (150 MFI) und des negativen IFAT-Referenzserums (230 MFI) lagen. Im Gegensatz zu dieser geringen Reaktivität, die sich mit irrelevanten Testseren zeigt, bei denen Sekundärantikörper und Primärantikörper spezifisch aufeinander abgestimmt sind, zeigen Seren, die mit irrelevanten Sekundärantikörpern kombiniert wurden (FKS + Biotin-Anti-Schwein-Ak, Schweineserum 307139 + Biotin-Anti-Kaninchen-Ak), Fluoreszenzwerte auf Niveau der Pufferkontrolle. Dies lässt darauf schließen, dass die unspezifischen Reaktionen der Feldseren in den getesteten Systemen nur dann nachweisbar sind, wenn das Vorhandensein aller zum Nachweis erforderlichen Reaktionskomponenten dies ermöglicht. Dass Seren aus dem Kaninchen, die eigentlich irrelevant für das PCV2-Capture-Antigen sind, geringe Fluoreszenzwerte ergeben, wenn sie mit einem Kaninchen-spezifischen Detektionsantikörper eingesetzt werden, erlaubt Rückschlüsse auf mögliche primärantikörperspezifische Unspezifitäten.

Die Testung der Feldseren an einer Charge ungekoppelter Carboxy-Beads sollte dazu dienen, zu prüfen, ob die Signale unabhängig von dem Capture-Molekül entstehen. Die Carboxy-Gruppen an der Oberfläche ungekoppelter Beads liegen als negativ geladene, freie Carboxy-Gruppen vor. Sie können sich über van der Waals-Kräfte an die in der Reaktionslösung befindlichen Moleküle mit positiver Ladung anlagern. Durch ebenfalls im

Serum vorhandene, spezifische Antikörper käme ein Fluoreszenzsignal zustande (QIAGEN, persönliche Mitteilung 2006). Ein Fluoreszenzsignal in einem Ansatz mit ungekoppelten Beads wäre folglich damit zu erklären. Auffällig ist, dass die Höhe der Fluoreszenzwerte für die einzelnen Seren in Versuchen mit ungekoppelten Beads und PCV2-gekoppelten Beads vergleichbar waren. Die erhaltenen Ergebnisse können unter anderem so interpretiert werden, dass eine Kopplung des PCV2 ORF2-Proteins nur in geringem Maße erfolgt ist und weiterhin Carboxy-Gruppen in signifikantem Umfang ungebunden vorliegen. Da bei der Testung eines Serums immer dieselben Bestandteile an die freien Gruppen angelagert würden, wäre eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erklärbar. Die in Relation zu den MFI-Werten der Feldseren niedrigen Fluoreszenzen der Referenzseren wären damit zu erklären, dass diese – insbesondere der PCV2-Kaninchen-pAk und der PCV2-Maus-mAk – hochaufgereinigt waren oder nicht aus dem Schwein stammten. Im Vergleich zu Feldseren vom Schwein deuten die geringeren MFI mit diesen Seren auf keine oder nur geringgradige unspezifische Bindungsaktivitäten gegenüber den Beads hin.

Unspezifische Signale können auch durch Fremdproteine in der gekoppelten Proteinpräparation verursacht werden. Im Falle der eingesetzten PCV2 ORF2-Proteinchargen wurde eine Aufreinigung mittels Größen-Ausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) durchgeführt, die zu einem Reinheitsgrad von nahezu 95 % führte. Dies bedeutet, dass in der Proteinpräparation noch bis zu 5% Fremdbestandteile wie z.B. zelluläre Proteine des Expressionssystems und Bestandteile des Mediums enthalten sind. Bei einer direkten Kopplung über Carboxy-Gruppen wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, werden unselektiv alle Proteine, die Aminogruppen enthalten, gebunden. Je nach Testsystem können sich so hohe Hintergrundfluoreszenzen ergeben (WATERBOER, persönliche Mitteilung 2006). In diesem Falle würden Serumbestandteile mit den gekoppelten Fremdproteinen binden. Da in den vorliegenden Untersuchungen die unspezifischen Signale auch mit Beads ermittelt wurden, die keinen Kontakt mit der Proteinpräparation hatten - z.B. mit 6xHis-Thioredoxin-Beads oder ungekoppelten Beads - kann ein Zusammenhang mit Bestandteilen der Proteinpräparation als wesentliche Ursache der unspezifischen Reaktionen weitgehend ausgeschlossen werden. Lediglich der im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Versuchansätze ungewöhnlich hohe Fluoreszenzwert des PCV2-Kaninchen-pAk an Beads gekoppelt mit PCV2-Virusmaterial könnte auf diese Weise erklärt werden, da in dieser Viruspräparation sicherlich Fremdproteine enthalten waren. Da das polyklonale Referenzserum durch Immunisierung von Kaninchen mit rekombinantem PCV2 ORF2-Protein erhalten wurde, ist eine Reaktivität von gegen Fremdprotein gerichteten Antikörpern gegen diese Komponenten nicht auszuschließen.

Die Tatsache, dass die Fluoreszenzen auch an Beads erzeugt werden konnten, die mit 6xHis-Thioredoxin gekoppelt waren, spricht prinzipiell gegen die Möglichkeit, dass das ORF2-Protein alleinige und wesentliche Ursache der Problematik ist. Das Thioredoxin-Protein ist Teil eines etablierten Nachweis- und Kontrollsystems der Firma Qiagen. Die Titrierbarkeit des Sekundärantikörpers und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse belegen eine erfolgreiche Kopplung des 6xHis-Thioredoxin-Proteins. Feldseren, die an ungekoppelten und PCV2 ORF2-gekoppelten Beads Fluoreszenzwerte mit unzureichender Spezifität und Sensitivität ergeben hatten, zeigten an derselben Kopplungscharge des 6xHis-

Thioredoxin-Proteins, die zuvor ihre Spezifität anhand von Anti-Thioredoxin-Ak gezeigt hatte, ebenfalls unspezifische MFI-Signale.

Unspezifische Reaktionen der Versuchsreagenzien können ebenfalls Signale erzeugen, die spezifische Fluoreszenzen überlagern oder verhindern. Möglich ist zum Beispiel, dass im Rahmen der Nachweisreaktion eingesetzte Komponenten eine unspezifische Bindung mit den Beads oder dem gekoppelten Antigen eingehen. Überprüft wurden im Rahmen dieser Arbeit der Detektionsantikörper und das Streptavidin-R-Phycoerythrin. Hohe Fluoreszenzwerte in den Proben, in denen der Sekundärantikörper gegen Puffer ausgetauscht wurde, hätten auf eine Anlagerung des SA-PE an das Antigen oder direkt an die Beads hingedeutet. Ein Signal in den Versuchsansätzen, bei denen das Testserum durch Puffer substituiert wurde, wäre ein Hinweis auf eine direkte Bindung des Sekundärantikörpers an Beads, PCV2 ORF2- oder Fremdprotein gewesen. Da aber in beiden Versuchsvarianten Fluoreszenzwerte unter 100 MFI, also auf Hintergrundniveau erhalten wurden, entfielen diese Reaktionskomponenten als wesentliche Verursacher. Somit konnte eine Eingrenzung der Herkunft der unspezifischen Fluoreszenz auf das Serum bzw. die Testantikörper erfolgen.

Es konnte gezeigt werden, dass die MFI-Signale unabhängig von der Art des Kopplungsmaterials erhalten wurden und auch nicht durch eine unspezifische Reaktion mit dem Capture-Antigen selbst bedingt waren. Daher liegt der Fokus auf der Möglichkeit, dass im Schweineserum Bestandteile enthalten sind, die direkt an die Beads binden. Es ist auch denkbar, dass derartige Serumbestandteile unselektiv an gekoppelte Capture-Moleküle bzw. an Moleküle binden, die sich durch Elektronenwechselwirkung an Beads angelagert haben. Auf diese Weise lassen sich auch unspezifische Signale erklären, die z.B. mit den an 6xHis-Thioredoxin gekoppelten Beads entstanden sind. Welche Reaktionskomponenten für diese unspezifische Bindung verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Die niedrigen Fluoreszenzwerte der Referenzseren, insbesondere der monoklonalen und polyklonalen Antikörper lassen vermuten, dass hauptsächlich Bestandteile des konventionellen Schweineserums für die Fluoreszenzen verantwortlich sind. Alle bislang publizierten Beobachtungen über unspezifische Bindungen in dem LiquiChip[®]-Verfahren beziehen sich auf Applikationen aus der humanmedizinischen Diagnostik. Eine Übertragbarkeit dieser Beobachtungen auf die Spezies Schwein ist nicht zwingend möglich, aber auch nicht auszuschließen.

Im humanmedizinischen Bereich werden verschiedene Ursachen für unspezifische Signale in Immunoassays beschrieben. Interferenzen sind die von einer Substanz in einem Testsystem hervorgerufenen Effekte, die eine Abweichung des gemessenen Wertes vom wirklichen Wert hervorrufen (SELBY 1999). Darunter fallen unspezifische Bindungen an Gefäß- oder Membranoberflächen und an Substanzen, die in höheren Konzentrationen als der Zielanalyt vorhanden sind. Hierzu zählen unter anderem Albumine und Immunglobuline. Ein weiteres Phänomen, das unspezifische Signale in Immunoassays verursachen kann, ist die Anwesenheit von humanen „Anti-Tier-Antikörper“ im Testmaterial. Diese entstehen durch Tierkontakt oder durch die therapeutische Gabe von Antikörpern, z.B. wird bei Transplantationen zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen OKT3, ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen die CD3-Moleküle von menschlichen T-Lymphozyten gerichtet ist, gegeben (MARTINS et al. 2004a). Bisweilen entwickeln Menschen Antikörper gegen diese monoklonalen Mausantikörper. Da kommerziell hergestellte Antikörper häufig

aus der Maus oder anderen Tierspezies stammen, können die oben beschriebenen Anti-Tier-Antikörper aus dem Testserum Epitope auf den Testantikörpern erkennen und so unter Umständen durch Brückenbildung zwischen Capture-Molekül und Detektionsantikörper zu falsch positiven Signalen führen. Alternativ können diese an die Capture-Moleküle binden und so eine spezifische Reaktion des Testanalyten verhindern. Es kommt zu einem falsch negativen Ergebnis. Auf ähnliche Weise führen auch heterophile Antikörper zu unspezifischen Signalen. Es handelt sich hierbei um rudimentäre Antikörper der frühen Immunantwort, die eine geringe Avidität besitzen und multispezies-spezifisch sind. MARTINS et al. (2004a) zeigten, dass diese Antikörper bei der Messung von Zytokinen im humanen Serum zu signifikant erhöhten oder falsch negativen Messwerten führen können.

JOHANNISSON et al. (2006) halten die Anwesenheit solcher heterophilen Antikörper auch im Schweineserum für möglich. Sie etablierten eine Nachweismethode für Zytokine aus dem Schwein mittels LiquiChip®-System, indem sie kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen die porzinen Zytokine TNF- α , IL-8 und IL-1 β als Capture-Antigen verwendeten. Diese Antikörper wurden über einen Komplex mit an die Beads gekoppelten anti-Maus IgGs aus der Ziege an den Beads fixiert. Als Testanalyten wurden die kommerziell erhältlichen Zytokine in definierten Konzentrationen von 0,01 – 100 ng/ml mit Waschpuffer, Schweineserum und Schweineplasma verdünnt und zu den Beads gegeben. Eventuelle Bindungsreaktionen der Zytokine an die Beads wurden über biotinylierte Detektionsantikörper und Streptavidin-Phycoerythrin nachgewiesen. Es konnten spezifische MFI-Signale für die drei Zytokine sowohl in Waschpuffer, als auch in der Schweinematrix gemessen werden. Das Detektionslimit lag mit 0,9, 1,3, und 12 ng/ml in den Proben, die in Schweineserum und – plasma verdünnt waren, jedoch 5 – 10fach höher als in den mit Waschpuffer verdünnten Proben (0,23, 0,18, 1,6 ng/ml). Als Begründung wird die Anwesenheit von heterophilen Antikörpern im Schweineserum erörtert. Da es sich bei dieser Publikation um eine reine Forschungsarbeit handelt und nicht um eine Methode, die unter Feldbedingungen validiert wurde, stehen die spezifischen Ergebnisse nicht im Widerspruch zu denen der vorliegenden Arbeit. JOHANNISSON et al. (2006) verwendeten zwar Material aus dem Schwein, jedoch nur aus einem Tier. Da zudem nicht bekannt ist, ob es sich um ein SPF-Tier oder ein unter Feldbedingungen gehaltenes Schwein handelt, kann es durchaus in die Gruppe Schweine gehören, die keine unspezifischen Signale hervorrufen. Auch in der vorliegenden Arbeit liegen vergleichbare Daten von Schweinen ohne „bead-binder“-Eigenschaften vor.

Um diese unspezifischen Bindungen zu reduzieren, können Blocksubstanzen eingesetzt werden. MARTINS et al. (2004a) testeten den Zusatz von 10 % Mäuseserum, 10 % Rattenserum, 10 % fetalem Kälberserum (FBS), 50 μ g/ml nonimmune Ratten IgG / ml und 50 nonimmune Maus IgG μ g / ml. Mit einer Reduktion der unspezifischen Signale in 48 % der Reaktionen erzielte der Zusatz von 10% FBS die besten Ergebnisse. Gleichzeitig zeigten sie auch, dass ein Blockreagenz nicht das gesamte Spektrum unspezifischer Bindungsreaktionen verhindern kann, sondern dass im optimalen Fall eine individuelle Mischung von Substanzen verwendet werden sollte. WATERBOER et al. (2005) entwickelten einen direkten Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene HPV-Typen, indem sie aus den E6, E7 und L1 Proteinen der Humanen Papillomaviren Typ 6b, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 und 58 Fusionsproteine mit Gluthathion-S-Transferase herstellten und diese über eine an LiquiChip®-Beads gekoppelte Glutathion-Casein-Gruppe an die Beads banden. Die Methode

zeigte höhere Sensitivität als der als Vergleichssystem eingesetzte ELISA, es wurden jedoch unspezifische Signale von über 500 MFI in bis zu 20 % der Messansätze (WATERBOER et al. 2005) beobachtet. In einer weiteren Untersuchung beurteilten WATERBOER et al. (2006) die Wirksamkeit verschiedener Blocksubstanzen in Bezug auf Unterdrückung des unspezifischen Hintergrundes und Reduktion der spezifischen Signale. Sie gingen von Serumproben aus indischen und afrikanischen Populationen aus, deren unspezifische Fluoreszenzreaktionen von 250 MFI bis zu mehr als 5000 MFI betrogen. Diese unspezifischen Bindungen wurden auch an Beads beobachtet, die nicht mit Antigen gekoppelt waren. Die ursächlichen Substanzen wurden nicht genauer definiert; vielmehr wurden Humanseren, die diese Eigenschaften besitzen, als „bead-binder“-Seren bezeichnen. Die Anteile an „bead-bindern“ in der Bevölkerung schwanken stark und können bis zu 59% zum Beispiel bei afrikanischen Seren betragen. Die Versuche, die unspezifische Bindung mit der Hilfe verschiedener Blocksubstanzen zu reduzieren oder zu verhindern, führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Kombination von Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon und Super ChemiBlock™ Heterophile Blocking Agent (CHEMICON International, Inc, Temecula, CA, USA) erzielt. Die unspezifischen Hintergrundreaktionen an gekoppelten und ungekoppelten Beads wurden auf MFI-Werte von unter 70 MFI reduziert. Die Höhe der spezifischen Fluoreszenzsignale wurde um etwa 37% reduziert, durch den auf ein Minimum reduzierten Hintergrund konnte das Signal-Hintergrund-Verhältnis verbessert werden. Die Vielfalt der von MARTINS et al (2004a) und WATERBOER et al. (2006) getesteten Substanzen und die wenig vorhersehbaren Ergebnisse machen deutlich, dass keine generellen Aussagen oder Empfehlungen zum Einsatz von Blocksubstanzen getroffen werden können. Es gibt eine Vielfalt von verschiedenen Blocksubstanzen, die unterschiedlich wirksam sind, so dass eine individuelle Anpassung an die jeweiligen Testsysteme erfolgen muss.

Die Herstellerfirma der Beads erwähnt ebenfalls die Möglichkeit, dass bestimmte Serumbestandteile zu einem hohen Fluoreszenzhintergrund in den xMAP®-Versuchsansätzen führen kann. Eine spezielle Bead-Art, die SeroMAP-microspheres, wurden eigens zu dem Zweck entwickelt, den unspezifischen Hintergrund in serologischen Versuchsansätzen mit Luminex xMAP®-Technologie zu reduzieren (LUMINEX CORPORATION 2006). WATERBOER et al. (2006) prüften die Eignung der SeroMAP-Beads für die Reduktion des unspezifischen Hintergrundes. Sie stellten eine Reduktion des unspezifischen Hintergrundes um 35 % fest, jedoch lag das Fluoreszenzniveau noch immer bei über 250 MFI und damit im Definitionsbereich eines „bead-binders“. Zudem zeigten zwei von zehn Testseren mit MFI-Werten von über 2900 keinerlei Veränderung im Vergleich zu den herkömmlichen LiquiChip®-Beads. Die Berichte über Interferenzen und falsch-positive Ergebnisse in Versuchsansätzen mit der Luminex xMAP®-Technologie am LiquiChip®-System durch Serumbestandteile beschränken sich bisher auf die Applikationen bei Seren menschlichen Ursprungs. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen deutlich, dass unspezifische Bindungen an Beads und so genannte „bead-binder“-Seren auch bei der Spezies Schwein nachweisbar sind.

Eine sinnvolle Weiterentwicklung der Nachweismethode erfordert zuvor die Bestimmung der für die unspezifischen Signale verantwortlichen Komponenten oder die sichere Blockierung der reaktiven Komponenten durch Kompetition oder chemisch-physikalische Inaktivierung der Bindungsaktivitäten. Zum einen können die unspezifischen Bindungsstellen an den

Beads durch Inkubation mit proteinhaltigen Substanzen abgesättigt werden, zum anderen können die unspezifischen Reaktionskomponenten selbst durch Zugabe von Blocksubstanzen in das Testserum abgefangen werden. Da eine Vorhersage über die Wirksamkeit solcher Maßnahmen nicht möglich ist, müssen die einzelnen Substanzen individuell ausgetestet werden.

In der vorliegenden Arbeit, sollten durch Inkubation der spezifisch gekoppelten Beads mit Pferdeserum, freie Bindungsstellen an den Beads durch positiv geladene Bestandteile im Pferdeserum vor der Zugabe der Testseren abgesättigt werden. Die Bestandteile aus den im Anschluss zugegebenen Testseren sollten dann nur noch mit den spezifischen Capture-Molekülen reagieren. Entgegen den Erwartungen führte die Vorinkubation der Beads mit Pferdeserum zu einer Erhöhung der MFI-Werte. MARTINS et al (2004a) erwähnten in der oben erläuterten Untersuchung unspezifischen Erhöhungen der Fluoreszenzwerte, die auf eine unspezifische Reaktion der Detektionsantikörper und der an die Beads angelagerten Blocksubstanz, z.B. Pferdeserum, zurückzuführen ist. Zum Vergleich wurden Beads ohne gekoppeltes Antigen in Pferdeserum vorinkubiert und parallel mit denselben Seren getestet. Die Fluoreszenzwerte beider Bead-Arten zeigten eine maximale Differenz von 500 - 1000 MFI. Demzufolge hat eine Vorinkubation der Beads ebenso wie die Art des gekoppelten Moleküls offensichtlich keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Fluoreszenzsignale.

In einem weiteren Versuch wurde die Blockung nach WATERBOER et al. (2006) mit Polyvinylpyrrolidon und Polyvinylalkohol in Kombination mit CBS-K, Super Chemiblock™ Heterophile Blocking Agent, durchgeführt, um deren Eignung zur Reduktion der unspezifischen Bindungsaktivitäten beim Nachweis von PCV2-spezifischen Antikörpern in Schweineseren zu prüfen. Die Vorinkubation der Seren mit dem Blockreagenz führte in keinem Fall zu einer Verbesserung der Differenzierung von positiven und negativen Feldseren vom Schwein. Der Einsatz dieser Substanzen führte zu einer generellen Reduktion der MFI-Werte um 20 – 80 %. Diese Absenkung könnte zum Teil Folge der stärkeren Verdünnung sein, denn die geblockten Seren wurden gemäß der beschriebenen Methode 1 in 50 mit Blockpuffer verdünnt, während die ungeblockten Seren in einer 1 in 4 Verdünnung mit PBS/1%BSA eingesetzt wurden. Das Niveau der Reduktion ist jedoch nicht homogen, bei einem Teil der Proben größer und beim anderen Teil kleiner als der Unterschied zwischen den beiden Verdünnungsstufen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die eingesetzten Blocksubstanzen zu einer generellen Maskierung sowohl der spezifischen, als auch der unspezifischen Bindungsstellen geführt haben.

Die Vorinkubation der Seren mit Schweineleberpulver sowie ungekoppelten Polystyrol-Beads führte nur an Einzelseren zu deutlichen Änderungen der Fluoreszenzwerte. In einem Teil der Messungen zeigten die Änderung den erwarteten Effekt. So führte die Vorinkubation mit Leberpulver bei einem negativen Feldserum zu einer Reduktion der Fluoreszenz. Allerdings konnte nach Vorbehandlung mit Leberpulver und Polystyrol-Beads eine Erhöhung der Fluoreszenzwerte an unspezifisch gekoppelten Beads gemessen werden. Zudem wurde nach Absättigung durch Polystyrol-Beads eine Verringerung der Messwerte an einem positiven Feldserum beobachtet. Insgesamt konnte daher keine Verbesserung in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Differenzierung von negativen und positiven Seren erzielt werden. In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Schweineseren zu einem hohen Anteil so genannte „bead-binder“-Seren gegenüber den hier getesteten Beads für die LiquiChip®-Technologie beinhalten. Diese Eigenschaft konnte weder durch Modifikationen

des Antigens, der Kopplungsreaktion, der Nachweisbedingungen noch durch unterschiedliche Verfahren der Vorinkubation oder Blockierung überwunden werden. Es ist durchaus denkbar, dass andere Varianten von Blockreagentien, z.B. andere Immunglobuline, zu dem erwünschten Ergebnis führen. Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz der LiquiChip®-Methodik in der serologischen Routineuntersuchung sollte jedoch der zusätzliche Aufwand, der sich durch die Vorinkubation der Seren ergibt, berücksichtigt werden. Wünschenswerter wäre die Weiter- oder Neuentwicklungen des Bead-Materials, um Materialien zur Verfügung stellen zu können, die keine unspezifischen Bindungsaktivitäten von Schweineserum mehr ermöglichen. Weiterhin muss kritisch hinterfragt werden, ob die hier nachgewiesenen unspezifischen Bindungseigenschaften von Schweineseren, die insbesondere bei Schweinen aus der kommerziellen Tierhaltung auftraten, wenn auch in geringerem Umfang auch in anderen serologischen Testverfahren auftreten können. Falsch positive Ergebnisse, die insbesondere in der Routinetestung auf Freiheit von bestimmten Pathogenen (z.B. PRRSV, Aujeszkyvirus, ESPV) immer wieder auftreten und in den meisten Fällen durch weitergehende Untersuchungen nicht verifizierbar sind, könnten durch ähnliche Effekte verursacht werden. Als beeinflussende Faktoren im Feld können Haltung, Fütterung, Genetik, und therapeutische sowie prophylaktische Maßnahmen nicht ausgeschlossen werden. Der hohe Anteil an „bead-binder“-Seren in dem hier getesteten Schweineserumpool offenbarte sehr schnell, dass das Nachweisverfahren keine ausreichende Sicherheit für die Testung bestimmter Parameter aufwies. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen jedoch auch, dass intensive Untersuchungen und Validierungsmaßnahmen auch und insbesondere im Forschungs- und Entwicklungsbereich notwendig sind, um derartige Effekte auch dann weitestgehend ausschließen zu können, wenn die Frequenzen an falsch positiven Ergebnissen nur sehr gering sind.

Die im ersten Teil der Arbeit untersuchten Einflussfaktoren zwischen Probenmatrix und einzelnen oder mehreren Testkomponenten gewinnen bei modernen Verfahren der Mehrparameterdiagnostik aufgrund der komplexen Probenmatrix und der erforderlichen Vielzahl und Vielfalt an Reaktionsparametern zusätzlich an Bedeutung. Dies insbesondere dann, wenn Mehrparameterdiagnostik verschiedensten Probenmatrizes und Untersuchungsanforderungen unter Feldbedingungen gerecht werden muss. In den letzten Jahren wird zum Beispiel die Multiplex-PCR zum schnellen und kostengünstigen Nachweis verschiedenster Erreger in der Schweinepraxis stark nachgefragt. Aus diesem Grunde sollte in einem zweiten Teil der Untersuchungen geprüft werden, ob und wenn ja welche Faktoren die Aussagefähigkeit eines Testverfahrens zum Nachweis mehrerer Parameter unter Feldbedingungen beeinflussen.

5.2 Multiplex-PCR zur simultanen Amplifikation von Genomfragmenten aus PCV2, FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2

Für sämtliche in dieser Arbeit verwendete Primer wurden bereits etablierte Primersequenzen entsprechend den besonderen Anforderungen an einen Multiplex-Primer modifiziert. Auf diese Weise konnte das Risiko, ein nicht funktionsfähiges Primerpaar zu konzipieren, auf ein Minimum reduziert werden. Als Zielsequenz wurde die Konsensussequenz einer möglichst großen Anzahl von Isolaten verwendet, mit dem Anspruch, das Spektrum an erfassten Virusstämmen zu maximieren. Für eine homogene Amplifikationseffizienz aller Parameter ist nicht nur die optimale Homologie von Primer und Zieltemplate (DIEFFENBACH et al. 1993)

sondern auch eine nahezu identische Annealingtemperatur (ELNIFRO et al. 2000) der Primerpaare ausschlaggebend. Aus diesem Grunde wurden die einzelnen Primer durch Verlängerung so modifiziert, dass ihre Schmelztemperatur zwischen 55,1°C und 60,5°C betrug. Da zusätzliche Bedingungen, etwa eine definierte Primer- oder Amplifikatlänge und ein GC-Gehalt von 50 % zu beachten waren, mussten Kompromisse eingegangen werden. Für die Etablierung von Primern gilt allgemein, dass die für die jeweiligen Kriterien optimalen Primersequenzen nicht immer exakt eingehalten werden können (SHIGEMORI et al. 2005). Dieses trifft auch für die Homologie zwischen Primer und Primerbindungsstelle des Templates zu. Optimal ist eine Übereinstimmung der Sequenzen von 100%. In der vorliegenden Arbeit wurden die Primersequenzen gegen spezifische Isolate aus GenBank und bei bioScreen sequenzierter Virusisolate aligned. In einigen Fällen zeigten die Primer nach Anpassung an andere Kriterien nicht mehr zu allen Isolaten vollkommene Homologie. Da aber auch Primer, die eine gewisse Anzahl an nicht komplementären Nukleotiden aufweisen, in der PCR zu Amplifikationen führen (CHA et al. 1993), wurden bis zu vier Nukleotidabweichungen akzeptiert. Im Falle von FLUAVsw handelte es sich allerdings in zwei Positionen nicht - wie bei den anderen Parametern - um Austausch in einem geringen Teil der Virusisolate, sondern um eine Variation, die mehr als die Hälfte der Isolate aufwies. Aus diesem Grunde wurde durch eine Randomisierung der Basenposition erreicht, dass beide Alternativen in der Primerpräparation enthalten waren. In Folge der Nukleotidabweichungen war es nicht möglich, maximal stringente PCR-Bedingungen festzulegen, da dies unter Umständen die Amplifikation einzelner Influenza-Isolate verhindert hätte. Es wurden weniger stringente Bedingungen festgelegt, was in der Regel eine verringerte Spezifität der PCR zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit wurde einem breiten Spektrum erfasster Isolate den Vorzug gegenüber einer maximalen Spezifität gegeben.

Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen zeigte sich, dass die bisherigen Modifikationen bei PRRSV-Typ 2 und FLUAVsw zu Amplifikaten mit ähnlichen Längen (366 bp und 335 bp) führten. Eine Detektion der Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese ist in einem solchen Fall nur schwer möglich, da es zu Überlagerungen kommt. Um eine klare Differenzierung zu ermöglichen und dennoch alle zuvor erwähnten Bedingungen in gewissem Maße berücksichtigen zu können, musste ein Primer so verändert werden, dass es möglich war, das PRRSV-Typ 2-Fragment sowohl von FLUAVsw als auch von den weiteren Parametern PCV2 und PRRSV-Typ 1 eindeutig zu differenzieren. Primer für Influenza sind aufgrund der starken Variabilität der Isolate sehr schwer festzulegen. Es bieten sich wenig Alternativen, insbesondere wenn - wie in der vorliegenden Arbeit - mehrere Subtypen erfasst werden sollen. Da PRRSV-Typ 2 im europäischen Raum geringeren Veränderungen unterliegt, wurde die Amplifikatlänge von PRRSV-Typ 2 angepasst. Hierzu wurde der Antisense-Primer vollständig in den Bereich des ORF 6 verlegt. Unter Einbeziehung aller angeführten Parameter wurden Primer etabliert, die als ein Kompromiss aus den verschiedenen Bedingungen zu sehen sind.

Die Funktionsfähigkeit der Multiplex-Primer sowie der Reversen Transkription unter Multiplex-Bedingungen und der Multiplex-PCR wurde für alle Parameter bestätigt. Allerdings wurden für PCV2 zwei unspezifische Amplifikate auf einer Höhe von etwa 1500 bp sowie > 2000 bp in dem Reaktionsansatz, der PCV2-spezifische DNA enthielt, festgestellt. Eine wesentliche Ursache könnten suboptimal konzipierte Primer sein. Derartige Primer weisen Sequenzhomologien zu anderen Primern (DIEFFENBACH et al. 1993) oder aber zu anderen

als den erwünschten Bereichen der Nukleinsäuren auf (CHOU et al. 1992, SHIGEMORI et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit liegen die Gründe für dieses Phänomen vermutlich nicht in der Primerkonzeption, da die Primer bei der Etablierung für die Multiplex-PCR mit Hilfe der Software „FastPCR“ (V3.04.11) auf mögliche Dimerisierung untereinander überprüft wurden. Teilhomologien zu den Sequenzen von FLUAVsw, PRRSV-Typ 2 und PRRSV-Typ 1 können ebenfalls ausgeschlossen werden, da in Reaktionsansätzen zur Überprüfung der Spezifität keine Banden detektiert wurden. Darüber hinaus handelte es sich bei den Zusatzamplifikaten nicht um ein permanent zu beobachtendes Phänomen, vielmehr trat es ausschließlich dann auf, wenn PCV2-spezifische DNA, insbesondere in hohen Konzentrationen, in der Probe vorhanden war.

ELNIFRO et al. (2000) beobachteten eine höhere Inzidenz von Fehlbindungen bei steigenden Konzentrationen von Pufferbestandteilen, dNTPs oder PCR-Polymerase. Diesbezügliche Variationen sollen gewöhnlich zur Verbesserung der PCR-Eigenschaften beitragen, zeigen aber häufig nur schwachen oder sogar nachteiligen Effekt. Auf eine Anpassung der von ELNIFRO et al. (2000) publizierten Parameter wurde verzichtet, da bereits mit einem speziell auf die Anforderungen von Mehrfachamplifikationen ausgerichteten Testkit (Qiagen® Multiplex PCR Kit) gearbeitet wurde. Die in dem Reagenz enthaltene HotStarTaq®-Polymerase wird erst bei einer Erhitzung auf 95°C über 15 min aktiviert, bei Raumtemperatur ist sie inaktiv. Somit erfüllt sie die Anforderungen an absolut stringente Temperaturbedingungen zur Vermeidung von Zusatzbanden (CHOU et al. 1992). Weiterhin können längere Annealing- und Extensionszeiten (HENEGARIU et al. 1997), eine zu hohe Annealingtemperatur (DIEFFENBACH et al. 1993) und auch eine hohe Konzentration an Polymerase (SAIKI et al. 1988) die Entstehung von unspezifischen Produkten fördern. JEFFREYS et al. (1988) erstellte DNA Fingerprints von humaner DNA indem er hypervariable Minisatellitenregion in einer PCR amplifiziert und im Anschluss über Southern Blot Hybridisierung detektiert. Er beobachtete, dass steigende Zykluszahlen unspezifische Amplifikate hervorrufen können, und diskutiert die unspezifische Bindung von Amplifikationsprodukten gefolgt von einem vorzeitigem Abbruch der Amplifikationsreaktion als Ursache. Die Folge sind kurze, unspezifische Amplifikate, die zu einem Fluoreszenzschmier ohne spezifische Bande führen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Abklärung des Einflusses PCV2-spezifischer DNA unter verschiedenen Templatekonzentrationen und einer steigenden Anzahl von Amplifikationszyklen bestätigte die These von JEFFREYS et al. (1988). Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass ansteigende Templatekonzentrationen einen identischen Effekt haben können. Zunehmende Zykluszahlen führen ebenso wie hohe Templatekonzentrationen zunächst zu unspezifischen hochmolekularen Amplifikaten, bei steigenden Werten verschwinden die spezifischen Banden zugunsten der unspezifischen und es entsteht ein fluoreszierender Schmier. CHA et al. (1993) beobachteten dieses Phänomen in Fällen, in denen die PCR über das Ende der exponentiellen Amplifikationsphase hinaus fortgesetzt wurde. Vergleichbare Ergebnisse entstehen, wenn definierte Zykluszahlen bei sehr hoher Ausgangskonzentration des Templates eingesetzt werden (ROUX 1995). BELL et al. (1991) beobachteten in ihrer PCR zur Amplifikation der Mutationsvariante hisD3052 von Salmonella typhimurium TA98 ebenfalls fluoreszierenden Schmier bei mehr als 26 Amplifikationszyklen und ein Verschwinden der spezifischen Bande ab 44 Zyklen. Sie erklären dieses Phänomen damit, dass ab dem Zeitpunkt, an dem sämtliche Primer verbraucht sind, die 3'OH-Enden des PCR-Produktes an

genomisches Template oder sich selbst binden und anschließend zu hochmolekularer DNA verlängert werden. Unterstützt wird dieses Verhalten durch äußerst prozessive Polymerasen wie sie im Multiplex-Reagenz vorhanden sind (H. BESSERT, Qiagen, Hilden, D, persönliche Mitteilung 2005). Die gelegentlich auftretenden Zusatzamplifikate könnten ebenso wie Nebenfluoreszenzen in der Laufspur (Abbildung 4-26: Untersuchung diagnostischer Proben in der Multiplex-PCR, A, B, C) durch die Verwendung klar definierter Mengen an PCV2 vermieden werden. Die Umsetzung dieser Bedingung ist jedoch unter klinischen Bedingungen nicht möglich. Eine Vorabquantifizierung der Templatemengen in klinischem Probenmaterial ist im Rahmen der Infektionsdiagnostik nicht praktikabel. Darüber hinaus kommt PCV2-spezifische DNA in Proben klinisch erkrankter Tiere in großen Mengen (ab 10^7 Genomäquivalente / ml Serum) vor (SEGALÉS et al. 2005), während die Konzentration der anderen Parameter deutlich geringer ist. Bei Veränderung der Templatemenge zugunsten einer geringen Konzentration von PCV2-spezifischer DNA besteht die Gefahr, dass die Sensitivitätsgrenze für die weiteren Parameter unterschritten wird und diese nicht mehr nachzuweisen sind. Aus demselben Grund ist eine Reduktion der Zykluszahlen und der Zeitintervalle zugunsten des PCV2-Parameters nicht möglich. Um eine effiziente Amplifikation von FLUAVsw, PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2 zu gewährleisten, wurde ein Thermozyklerprogramm mit hohen Zykluszahlen und langen Zeitintervallen gewählt.

Da die unspezifischen Banden jedoch gut von allen spezifischen Amplifikaten zu unterscheiden sind, stellen sie kein Problem bei der eindeutigen Beurteilung des PCR-Ergebnisses dar. In Fällen, in denen unspezifische Nebenfluoreszenzen in der Laufspur eine Aussage über eventuell vorhandene Banden erschweren, kann eine erneute Auftrennung auf dem Agarosegel nach vorheriger 1:5 Verdünnung in Aqua dest. die Beurteilung erleichtern (Abbildung 4-26: Untersuchung diagnostischer Proben in der Multiplex-PCR, 5c, 5d; 25c, 25d). Die für PRRSV-Typ 2 beobachtete Positionsverschiebung der Bande in Richtung der PCV2-Bande (4.2.3.1.3) kann unter Umständen durch eine Art Adhäsionseffekt der Bande hin zur dominierenden PCV2 Bande entstehen. Abhilfe könnte möglicherweise eine Auftrennung bei sehr geringer Voltzahl und langer Dauer sein. Da aber die niedermolekularen Banden durch eine derart langsame Auftrennung an Schärfe verlieren, wurde darauf verzichtet. Mit der Kenntnis, dass die PRRSV-Typ 2 Bande unter Umständen geringfügig tiefer positioniert war, stellte die Auswertung der PCRs auch im Falle der Feldproben (4.2.3.3.4) kein Problem dar.

Zusatzamplifikate sind nicht nur unerwünscht, weil sie spezifische Banden überlagern können. Sie verbrauchen Reaktionskomponenten, so dass die erwünschten Amplifikate auf diese Weise weniger effizient amplifiziert werden (ELNIFRO et al. 2000). In der vorliegenden Multiplex-PCR konnte in der Tat eine Imbalance der Bandenintensität beobachtet werden.

Die Amplifikationsbedingungen und der Gehalt an TCID₅₀-Äquivalenten der Isolate wurden so eingestellt, dass sich die Banden der vier Parameter in der Einfach-PCR unter Multiplex-Bedingungen in nahezu identischer Stärke und Qualität zeigten.

Nach Zugabe aller für die Multiplex-PCR erforderlichen Primerpaare konnten allerdings deutliche Unterschiede in der Amplifikationseffizienz einzelner Parameter beobachtet werden. Die Bande für PRRSV-Typ 2 fiel ähnlich stark aus wie die für PCV2 während PRRSV-Typ 1 und FLUAVsw geringfügig respektive deutlich schwächere Banden ergaben.

Durch eine Erhöhung der Konzentration der Primer für FLUAVsw und PRRSV-Typ 1 von 0,2 μ M auf 0,3 μ M konnte eine bessere Angleichung der Bandenintensitäten erzielt werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden von HENEGARIU et al. (1997) bei der Etablierung von vier Multiplex-PCRs zum Nachweis von verschiedenen Bereichen des Y-Chromosoms gemacht. Zunächst wurden die Primerpaare je nach PCR in equimolaren Konzentrationen von 0,4 bis 0,6 μM eingesetzt. Nach Anpassung der Bandenintensität ergaben sich Konzentrationen von 0,004 bis 0,6 μM .

In den durchgeführten Versuchen war die Konzentration des eingesetzten FLUAVsw-Templates unbekannt, wurde aber als relativ niedrig angenommen. Hinzu kommt, dass bei den Primern für FLUAVsw, die in dem für das Matrix-Proteins codierenden Bereich positioniert waren, deutlich mehr Sequenzvarianten in Kauf genommen werden mussten, da die Sequenz der Influenza-Viren sehr variabel ist und mindestens drei Influenza-Subtypen erfasst werden sollten. Austausch, die in bis zur Hälfte der untersuchten Isolate vorzufinden waren, wurden durch eine Randomisierung der Basenposition ausgeglichen. Weniger häufig vorkommende Nukleotidaustausche ließen sich jedoch nicht vermeiden, so dass im Bereich der 3'Enden an drei bis vier Positionen Inkongruenzen auftreten konnten. Die dadurch entstandene verminderte Leistung der Polymerase trug zur geringeren Produktausbeute bei. Die physikochemischen Eigenschaften der FLUAVsw-Primer förderten durch einen relativ geringen GC-Gehalt von 46 bzw. 50 % die Amplifikationseffizienz vermutlich nur geringfügig. Optimal für eine schnelle und starke Bindung der Primer ist ein hoher GC-Gehalt im Primerbindungsbereich und ein niedriger GC-Gehalt der verbleibenden Sequenz.

Die PCRs zur Funktionsüberprüfung und Optimierung enthielten weniger Virusmaterial des PRRSV-Typ 1-Isolates als der PCV2- bzw. PRRSV-Typ 2-Isolate. Dies allein kann die geringere Stärke der Bande in diesen PCRs bereits erklären. Allerdings wurden PCR-Bedingungen und Templatmenge so eingestellt, dass in den Einfach-PCRs unter Multiplex-Bedingungen alle Parameter Banden in vergleichbarer Qualität zeigten. Da sich in der Multiplex-PCR in Anwesenheit aller vier Parameter jedoch deutliche Unterschiede in der Bandenintensität zeigten, obwohl die Templates in den Konzentrationen verwendet wurden, die auch im vorausgegangenen Versuchsansatz eingesetzt worden waren, kann von einer Konkurrenzsituation unter den Parametern ausgegangen werden. Parameter wie PCV2, die eine sehr starke Bande zeigen, verbrauchen bei der Amplifikation Reaktionskomponenten, die den schwächeren Parametern, z.B. PRRSV-Typ 1 nicht mehr zur Verfügung stehen. Es kommt zu einer herabgesetzten Intensität der Banden. Weiterhin beinhalten die Primer für PRRSV-Typ 1 an ihrem 3'Ende einige Positionen mit Nukleotidvariationen. Die Isolate von PRRSV-Typ 1 haben den höchsten GC-Gehalt der vier Parameter. Da dies für die gesamte Sequenz gilt, relativiert sich der positive Effekt des hohen GC-Gehaltes der Primer vermutlich wieder.

PRRSV-Typ 2 und PCV2 zeigen in den meisten Fällen starke Banden. Die hohen Konzentrationen, in denen sie vorhanden sind, verschaffen beiden Parametern bereits einen Amplifikationsvorteil. Darüber hinaus sind ihre Primersequenzen gut konserviert. In allen untersuchten Sequenzen wurden am 3'Ende der Primer maximal zwei Positionen mit möglichem Nukleotidaustausch gefunden, die Variation konnte aber jeweils nur in ein bzw. zwei Isolaten beobachtet werden. Das sporadische Auftreten einer schlechteren Ausbeute des PRRSV-Typ 2-Amplikons wird dem PCR-Drift zugeschrieben. ELNIFRO et al. (2000) beschreibt mit dem PCR-Drift eine Form der Amplifikationsimbilanz, die während der ersten Zyklusdurchgänge entsteht und nicht reproduzierbar ist

Die Sensitivität der Multiplex-PCR wurde im Vergleich zur Referenz-PCR ermittelt. Hierzu wurden in der Multiplex-PCR die Parameter in Anwesenheit der vier Primerpaare und der konstant gehaltenen Templates der übrigen drei Parameter verdünnt. Auf diese Weise sollten auch eventuelle inhibitorische Effekte der beteiligten Nukleinsäuren abgeklärt werden. Während die Amplifikation von FLUAVsw im Vergleich zur Referenz-PCR keine Minderung erfährt, ist die Sensitivität des Nachweises von PRRSV-Typ 1 bzw. PRRSV-Typ 2 um eine bzw. zwei \log_{10} -Stufen herabgesetzt. Demgegenüber ist das Detektionslimit von PCV2 um zwei \log_{10} -Stufen sensitiver geworden. Eine gleich bleibende bzw. um eine bis zwei \log_{10} -Stufen herabgesetzte Sensitivität ist ein häufig beobachteter Effekt der Multiplex-Reaktionen. SUH et al. (2005) erhielten in ihrer Multiplex-PCR zum Nachweis von *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* und *Salmonella spp.* zwar eine gleich bleibende Sensitivität für *Lawsonia intracellularis* und *Brachyspira hyodysenteriae*, die Sensitivität für *Salmonella spp.* war jedoch um eine \log_{10} -Stufe herabgesetzt. HUANG et al. (2004) beobachteten Vergleichbares beim Nachweis von Porzinem Circovirus Typ 1 und 2, Porzinem Parvovirus und Aujeszkyvirus. Die Nachweisgrenze aller vier Parameter war um ein bis zwei \log_{10} -Stufen herabgesetzt. Aber auch eine verbesserte Sensitivität, wie sie in der vorliegenden Multiplex-PCR für PCV2 festgestellt wurde, ist beschrieben worden. BELLAU-PUJOL et al. (2005) etablierten drei Multiplex hemi-nested RT-PCRs für den simultanen Nachweis von zwölf humanen, respiratorischen RNA-Viren. Sie bestimmten die Sensitivität der Multiplex-PCRs für Influenzavirus A, für das humane respiratorische Synzytialvirus, für Parainfluenzavirus Typ 3, für das humane Coronavirus OC43 und Rhinovirus. Während Influenza-, Synzytial- und Rhinoviren eine gleich bleibende Sensitivität in Multiplex-PCR und monospezifischer RT-PCR zeigten, wurde die Sensitivität von Parainfluenza- und Coronavirus um eine \log_{10} -Stufe erhöht. Eine Erklärung hierfür können die im Vergleich zur Referenz-PCR verlängerten Extensions- und Annealingzeiten sein. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Temperaturprogramm für die Multiplex-PCR eingesetzt, das eine Annealingzeit von 30 s und eine Extensionszeit von 90 s umfasste. Während die Annealingzeit vergleichbar mit denen der Referenz-PCRs (30 – 60 s) war, betrug die Extensionszeit 15 s mehr als in den Referenz-PCRs. Ebenso können verlängerte Primersequenzen zu einer verstärkten und spezifischeren Bindung des Zieltemplates führen. Die Antisense-Primer für PRRSV-Typ 1 wurde nicht verändert, der Sense-Primer für PRRSV-Typ 1 sowie die Primerpaare für PCV2, PRRSV-Typ 2 und FLUAVsw wurden mindestens um ein, maximal um sechs Basenpaare im Vergleich zu den Primern der Referenz-Methode verlängert. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Sensitivität stellt die Erhöhung der Zyklusanzahl dar. HENEGARIU et al. (1997) beobachteten einen stufenweisen Anstieg an PCR-Produkt bei steigender Zykluszahl. Jedoch kann die Anzahl nicht beliebig erhöht werden, da ein Sättigungsplateau erreicht wird, das von Parameter zu Parameter unterschiedlich ist. Wie zuvor diskutiert nimmt mit steigender Zyklusanzahl auch das Risiko von unspezifischen Produkten zu und eine eventuell vorhandene Imbalanz der Bandenintensität wird noch zusätzlich verstärkt (SUH et al. 2005, EDWARDS et al. 1994). Da in der vorliegenden PCR sowohl eine Tendenz zur inhomogenen Amplifikationsstärke als auch zu unspezifischen Nebenprodukten in PCV2-positiven Proben vorhanden ist, wurde von einer weiteren Erhöhung der Zykluszahl abgesehen.

Die zweistufige Amplifikation mittels (semi-)nested PCR dient ebenfalls der Steigerung der Sensitivität (BELLAU-PUJOL et al. 2005, JUNG et al. 2003). Durch die zweite, anschließende

Amplifikation wird das Risiko einer Kreuzkontamination allerdings stark erhöht, die Dauer der PCR bis zum Ergebnis verlängert sich und die Automatisierung wird noch zusätzlich erschwert (ELNIFRO et al. 2000). Für die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Multiplex-PCR wäre eine selektive nested PCR ohne die Amplifikation von PCV2 zu erwägen, da die PCV2-Fragmente bereits sehr dominant und mit verbesserter Sensitivität nachgewiesen wurden. Eine nested PCR mit PCV2-Primern hätte die Konkurrenzsituation zu Ungunsten der schwächeren Parameter weiter verstärkt. Weiterhin erfordert eine nested PCR für jeden Parameter ein zweites Primerpaar, das innerhalb des zuvor amplifizierten Fragmentes liegen muss. Wie bereits erläutert, stand bereits bei der Etablierung von Primern für die durchgeführte Multiplex-PCR nur eine sehr begrenzte Anzahl von Primeralternativen zur Verfügung. Insbesondere traf dies für die sehr variablen Influenza- und PRRSV-Typ 1 Viren zu. Wird eine weitere Amplifikation in Form einer nested-PCR durchgeführt, gelten die oben erläuterten Bedingungen der Primerauswahl für die acht Primerpaare von externer und nested PCR. Dies bedeutet, dass sich die Amplifikatlängen der Produkte der nested PCR nicht nur innerhalb der nested PCR, sondern auch von denen der externen PCR unterscheiden müssen. Es dürfen keine Dimerisierungen unter den acht Primerpaaren stattfinden und keine wesentlichen Unterschiede in der Amplifikationseffizienz entstehen. Aufgrund der erschwerten Bedingungen der Primeretablierung und der Tatsache, dass die vorliegende Multiplex-PCR bereits zwei getrennte Reaktionsschritte in Form einer reversen Transkription und PCR-Amplifikation beinhaltet, wurde auf die Entwicklung einer nested-PCR verzichtet.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Multiplex-PCR soll zur Untersuchung von Probenmaterial aus klinischen Erkrankungsfällen dienen. Im Hinblick auf diesen Einsatzbereich liegen die Detektionsgrenzen der einzelnen Parameter im akzeptablen Bereich. Die Virusmenge in einer Serumprobe aus akut klinisch erkrankten Tieren liegt bei bis zu 10^5 bzw. 10^9 Viruspartikeln pro ml Serum für PRRSV-Typ 2 bzw. PCV2 (CHUNG et al. 2005, SEGALÉS et al. 2005). In einem Gramm Lungenmaterial sind etwa $10^{7,77}$ PRRSV-Typ 2 Viruspartikel enthalten (CHUNG et al. 2005). Demzufolge werden in einem Ansatz der Multiplex-PCR etwa 130 Viruspartikel von PRRSV-Typ 2 bzw. $10^{6,6}$ Partikel von PCV2 aus einer Serumprobe enthalten sein. In Lungenproben sind entsprechend 11000 Viruspartikel von PRRSV-Typ 2 pro Multiplex-PCR-Ansatz vorhanden. BRUNBORG et al. 2004 detektierten 10^{10} PCV2 Viruspartikel in 500 ng DNA, die aus Lungengewebe vom Schwein extrahiert wurde. Leider liegen für die Parameter PRRSV-Typ 1 und FLUAVsw keine vergleichbaren Daten vor. Im Falle von PRRSV-Typ 1 kann jedoch mit zu PRRSV-Typ 2 vergleichbaren Mengen gerechnet werden. Natürlich ist der Virusgehalt im Gewebe bzw. Serum abhängig vom Infektionserreger, vom Erkrankungsgrad (OLVERA et al. 2004), dem Virusisolat (JOHNSON et al. 2004), der Genetik (VINCENT et al. 2006), physiologischen Gegebenheiten (SHIN et al. 2002) und beteiligten Sekundärinfektionen. So kann bei Doppelinfektionen mit PCV2 und PRRSV-Typ 1 ein deutlich höherer PCV2-Gehalt im Serum festgestellt werden als bei einer Einzelinfektion mit PCV2 (ROVIRA et al. 2002). Die oben angeführten Werte zeigen, dass auch bei einem relativ hohen Detektionslimit der Multiplex-PCR von 20 TCID₅₀-Äquivalenten für PRRSV-Typ 2 die Proben eines klinisch erkrankten Tieres mit ausreichend hoher Sicherheit erkannt werden. Alles in allem bestätigen die Versuche, dass die Sensitivität einer Multiplex-PCR im Gegensatz zur Einfach-PCR zwar etwas geringer sein

kann, dieses den diagnostischen Nutzen aber nicht beeinträchtigt, soweit nicht auf Erregerfreiheit getestet werden soll.

Teil dieser Arbeit war es, eine Multiplex-PCR für die Untersuchung von Probenmaterialien aus dem Feld zu entwickeln. Die Eignung der Multiplex-PCR für den Nachweis klinischer Erkrankungen sollte im Rahmen eines Vergleiches der Multiplex-PCR mit den Referenz-PCRs an Probenmaterial aus dem Feld überprüft werden. In der Multiplex-PCR wurden alle Proben, die in der Referenz-PCR für PCV2 positiv getestet worden waren, erneut positiv getestet. 90 % der zuvor positiv für PRRSV-Typ 1 und 88,8 % der für PRRSV-Typ 2 positiv getesteten Proben wurden in der Multiplex-PCR bestätigt. Nur in 42,9 % der Fälle wurde jedoch das positive Ergebnis aus der Referenz-PCR für FLUAVsw in der Multiplex-PCR reproduziert.

Die Nachweisrate für die einzelnen Parameter steht in Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Sensitivitätsbestimmung der Multiplex-PCR. Für PCV2 konnte eine um eine \log_{10} -Stufe verbesserte Sensitivität festgestellt werden, während die Sensitivität von PRRSV-Typ 2 und FLUAVsw um zwei \log_{10} -Stufen herabgesetzt war. Für PRRSV-Typ 1 konnte eine gleich bleibende Sensitivität nachgewiesen werden.

Die Variabilität der einzelnen Isolate kann bei Feldproben insbesondere im Bereich der Primerbindungsstellen deutlich ausgeprägt sein. Dies könnte die geringere Nachweisrate für PRRSV-Typ 1 und FLUAVsw erklären. Die Sensitivität einer PCR wird weiterhin von der Qualität und der Menge des Templates beeinflusst. Je nach Art und Dauer des Transportes variiert die Qualität von klinischem Probenmaterial stark und beeinflusst somit auch die Menge der Nukleinsäuren, die in der Probe enthalten ist. Da für die diagnostischen Probenmaterialien kein klinischer Vorbericht vorlag, konnte bei der Auswahl der Proben für den PCR-Test an Feldmaterialien nicht nach dem Kriterium einer klinischen Erkrankung selektiert werden. Dementsprechend sind unter Umständen Proben enthalten, die von subklinisch infizierten Tieren stammen und so wenig Template enthalten, dass sie unter die Nachweisgrenze der einzelnen Parameter fallen.

In drei Fällen wurde eine Probe positiv für PRRSV-Typ 2 getestet, die in der Einfach-PCR der Routinediagnostik negativ ausfiel. Ebenso wurde in einem Aliquot aus einem Duplikat einer PCV2-negativen Probe eine Bande auf PCV2-spezifischer Höhe festgestellt. Eine Erklärung wäre eine höhere Sensitivität oder ein anderes Erfassungsspektrum der Primer. Denn der Sense-Primer für PRRSV-Typ 2 ist im Gegensatz zu dem Antisense-Primer oder der Primer für PCV2 und PRRSV-Typ 1 kein modifizierter Primer der Referenz-PCR, sondern in einen anderen Sequenzbereich der Virussequenz verlagert. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass andere Varianten von PRRSV-Typ 2 erfasst werden als durch die Routine-Primer. Bei erneuter Testung der entsprechenden Proben in Referenz- und Multiplex-PCR konnte das positive Ergebnis allerdings nicht reproduziert werden.

Neben der geringeren Nachweisrate konnten in den bislang durchgeführten Untersuchungen von Feldmaterial in einzelnen Fällen eine Divergenz der Bandenintensität beobachtet werden. Dieses Phänomen ist zu erwarten, da bereits unter Einfach-Bedingungen mit Referenzisolaten geringfügige Inhomogenitäten auftreten, die durch die suboptimalen Multiplex-Bedingungen verstärkt werden. Schwache Banden können außerdem durch geringe Template-mengen verursacht werden. Proben aus klinischem Untersuchungsmaterial können unter Routinebedingungen nicht auf eine definierte Templatekonzentration gebracht werden. Daher müssen Inhomogenitäten in gewissen Ausmaß in Kauf genommen werden.

Eine Optimierung der Bandenstärke durch Anpassung der Primerkonzentration ist nicht praktikabel, da die Verteilung der Virusnukleinsäuren im Tier nur in geringem Maße vorhersehbar ist (XIAO et al. 2004). Auch wenn wie oben erläutert gewissen Richtwerte für Virustiter publiziert sind, können verschiedene Einflussfaktoren die Werte verändern. Insbesondere bei Mehrfachinfektionen konnten variierende Mengen der jeweiligen Parameter nachgewiesen werden (CHUNG et al. 2005, ROVIRA et al. 2002). Die Interpretation von Ergebnissen des Probenmaterials aus dem Feld wird von dieser Inhomogenität nicht wesentlich beeinträchtigt, wenn man bei der Interpretation eines negativen Ergebnisses die Sensitivität der Multiplex-PCR berücksichtigt und den Vorbericht des Probenmaterials mit einbezieht. In zweifelhaften Fällen bietet sich eine Nachuntersuchung in einer sensitiveren Einfach-PCR an.

Die Multiplex-PCR ist eine schnelle Nachweismethode und bietet den Vorteil mehrere Parameter zeitgleich amplifizieren zu können. Bislang wurden jedoch die Schritte der reversen Transkription und der Amplifikation noch in getrennten Versuchsschritten durchgeführt. Wünschenswert war es Transkription und PCR in einer One Tube-Methode zu etablieren. Die Konzeption einer Multiplex-PCR als RT-PCR bietet weitere Vorteile im Hinblick auf Zeit- und Materialersparnis, aber auch durch Minderung des Kontaminationsrisikos. Die Tatsache, dass sich die Enzyme für die reverse Transkription und für die Amplifikation in demselben Reaktionsansatz befinden, ermöglicht die Abfolge der Reversen Transkription und der PCR ohne zwischenzeitliches Öffnen des Reaktionsgefäßes. Die Wahrscheinlichkeit eventueller Kontaminationen durch Pipettierschritte, Instrumente etc. wird dadurch verringert. Die Template-RNA wird zunächst bei niedriger Temperatur (37°C) transkribiert, es folgt ein Inkubationsschritt bei 95°C durch den zum einen die reverse Transkriptase inaktiviert und zum anderen die Polymerase - idealerweise eine Hot Start Taq-Polymerase – aktiviert wird.

Für die Multiplex-RT-PCR mit RNA-Viren gibt es vor allem aus dem humanmedizinischen Feld Beispiele. BELLAU-PUJOL et al. (2005) wiesen zwölf humanen, respiratorischen RNA-Viren, die Inflenzaviren A, B, C, humanes respiratorisches Synzytialvirus, humanes Metapneumovirus, die Parainflenzaviren Typ 1, 2, 3 und 4, die humanen Coronaviren OC43 und 229E und humanes Rhinoviren, mit Hilfe von drei Multiplex hemi-nested RT-PCRs, die jeweils 4 RNA-Viren amplifizierten, nach. Aber auch veterinärmedizinische Multiplex-RT-PCRs sind beschrieben. JUNG et al. (2003) führten den simultanen Nachweis der Erreger der Transmissiblen Gastroenteritis und der epizootischen Virusdiarrhoe aus formalin-fixierten, paraffinisiertem Organgewebe durch.

Während in diesen Publikationen die Multiplex-PCRs lediglich RNA-Viren beinhalteten, werden in der vorliegenden Arbeit drei RNA-Viren PRRSV-Typ 1, PRRSV-Typ 2, FLUAVsw mit dem DNA-Virus PCV2 kombiniert. Bei einer derartigen Konzeption muss die DNA von Beginn des Ansatzes enthalten sein. Dies bedeutet, dass die DNA mit der reversen Transkriptase und anderen RT-spezifischen Reagenzien kompatibel sein und zudem das Temperaturprogramm der Transkription ohne Beeinträchtigung durchlaufen muss.

Aber auch Multiplex-RT-PCRs, in denen RNA- und DNA gemeinsam amplifiziert werden, sind beschrieben (COIRAS et al. 2003, CASAS et al. 1999). Ein Beispiel aus dem tiermedizinischen Bereich ist der Simultannachweis von Afrikanischer und Klassischer Schweinepest, durchgeführt von AGÜERO et al. (2004). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass eine Zugabe der PCV2-DNA während der

Transkriptions-Reaktion mit deutlichen Sensitivitätseinbußen verbunden ist. Neben diesen Verlusten entstanden starke unspezifische Nebenfluoreszenzen, die eine Detektion der PCV2-spezifischen Bande nahezu unmöglich machten. Im Ausschlussverfahren zeigte sich, dass die Anwesenheit des Sensiscript®-RT-Enzyms die Amplifikation von PCV2 negativ beeinflusst. Aufgrund der vorliegenden Daten wurde auf eine RT-PCR verzichtet und eine separate Reverse Transkription der RNA-Viren der Multiplex-PCR vorangestellt.

Intention der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeit einer Multiplex-PCR für Nachweis respiratorischer Krankheitserreger beim Schwein zu untersuchen. Als Nachweisspektrum wurden ein DNA-Virus - das Porzine Circovirus 2 - und drei RNA-Viren - das Influenzavirus des Schweins und das Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Typ1 und Typ2 - gewählt. Wie zuvor diskutiert, war die Multiplex-PCR nicht als One Tube-PCR unter gleichzeitiger Einbeziehung der reversen Transkription zu etablieren. Es entstand eine Multiplex-PCR mit separater, vorangestellter Multiplex-RT für die RNA-Viren. Weiterhin zeigte die Multiplex-PCR sowohl gegenüber negativem Material aus dem Feld, den jeweils anderen Parametern und dem Zielpathogen die erwartete Spezifität. Durchaus nicht ungewöhnlich ist die Tatsache, dass die Sensitivität der einzelnen Parameter im Gegensatz zur Einfach-PCR um ein bis zwei log-Stufen herabgesetzt oder verbessert wurde. Auch bei herabgesetzter Sensitivität ist die PCR für den Einsatz zum Nachweis von Krankheitserregern in klinischen erkrankten Tieren sehr gut verwendbar, da die Konzentration im Feldmaterial deutlich über der Nachweisgrenze liegt. Allerdings ist bekannt, dass PCV2 einen negativen Einfluss auf andere Parameter haben kann. Insbesondere da in klinisch erkrankten Tieren sehr hohe Titer von bis zu 10^{9-10} Viruspartikel pro ml Serum vorkommen können (SEGALÉS et al. 2005), ist die Diagnose von Koinfektionen z.B. mit PRRSV stark erschwert und es besteht das Risiko falsch negativer Ergebnisse. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sehr hohe Konzentrationen von PCV2-Template den Nachweis der PCV2-spezifischen Banden verschlechtert oder sogar verhindert. Aufgrund der gegenseitigen Beeinflussung der Parameter ist es nicht möglich, anhand der Bandenstärken eine Aussage über das relative Konzentrationsverhältnis der Parameter in der Ausgangsprobe zu treffen. Für spezielle Fragen, wie z.B. den Ausschluss bestimmter Pathogene im klinisch nicht erkrankten Tier, ist es daher ratsam auf eine Einfach-PCR mit höherer Sensitivität, z.B. einer nested PCR, zurückzugreifen. Ein Schwerpunkt lag darauf, möglichst viele Pathogenkombinationen in einem breiten Spektrum von verschiedenen Materialien zu erhalten. Aus diesem Grund können auch die wenigen falsch-negativen Proben weniger kritisch beurteilt werden, da es sich möglicherweise um Proben nicht erkrankter Tiere mit niedrigem Virustiter gehandelt hat. Vielmehr bestätigt der Feldproben test, dass es sich um eine robuste PCR handelt, die beim Einsatz in der Routinediagnostik zu schnellen und materialsparenden Ergebnissen führen kann. Die Methode ist von hoher klinischer Relevanz, da sie die Möglichkeit bietet, in klinisch erkrankten Schweinebeständen schnell und ökonomisch eine Diagnostik der derzeit wichtigsten viralen Erreger respiratorischer Krankheitsbilder durchzuführen. Vor allem in Bezug auf das Erregerspektrum bieten sich Erweiterungspunkte. Zum Beispiel die Integration bakterieller, respiratorischer Krankheitserreger wie *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Hämophilus parasuis* oder *Actinobacillus pleuropneumonia*. Allerdings muss deutlich darauf hingewiesen werden, dass sich eine Multiplex-PCR nicht dazu eignet, die Freiheit von Erregern zu testen oder durch quantitative Abwägung eine Aussage über die Relevanz oder

Priorität einzelner Erreger im Krankheitsbild zu erzielen. Zuletzt gibt es im Bereich der Detektion von PCR-Produkten Forschungsmöglichkeiten. Durch Alternativmethoden, wie z.B. die Flüssigchip-Technologien, könnten mehr Parameter mit höherer Sensitivität nachgewiesen werden. Gleichzeitig bieten sie die Möglichkeit, besser geeignete Primer zu verwenden, da der Faktor der Amplifikatlänge, der oft die Positionierung an günstigeren Sequenzbereichen verhindert, entfällt.

6 Zusammenfassung

Wiebke Schulze Esking

Einflussfaktoren bei der Etablierung, Validierung und praktischen Umsetzung von Testverfahren zur Mehrparameterdiagnostik von Infektionskrankheiten beim Schwein am Beispiel von Flüssigchip-Technologie und Multiplex-PCR

Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und bioScreen, European Veterinary Disease Management Center GmbH, Münster

Eingereicht im Februar 2008

106 Seiten, 34 Abbildungen, 14 Tabellen, 118 Literaturangaben, Anhang mit 22 Seiten, 4 Abbildungen und 15 Tabellen

Schlüsselwörter: Mehrparameterdiagnostik, Flüssigchip-Technologie, Multiplex-PCR, Infektionsdiagnostik Schwein, PRRSV, PCV2

Respiratorische Krankheitsbilder, an denen mehr als ein Pathogen ursächlich beteiligt ist, gewinnen in der Schweinepopulation zunehmend an Bedeutung. Diagnostische Methoden zum simultanen Nachweis mehrerer Erreger sind Bestandteil einer schnellen und effizienten Therapie und tragen zum ökonomischen Bestandsmanagement bei. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Methoden für den Multiplex-Nachweis von Antikörpern und Nukleinsäuren viraler Erreger von respiratorischen Krankheitsgeschehen des Schweins entwickelt werden.

Die Methode für den Multiplex-Nachweis von Antikörpern sollte auf Basis der xMAP[®] Flüssigchip-Technologie (Luminex Corporation, Austin, T, USA) an der LiquiChip[®]-Workstation (Qiagen, Hilden, D) etabliert werden. Da es sich um eine für den Antikörpernachweis im veterinärmedizinischen Bereich bislang nicht genutzte Methode handelte, erfolgte die Prüfung der Machbarkeit zunächst im Einfach-Format am Beispiel des Porzinen Circovirus Typ 2. Im Laufe der Arbeit wurde deutlich, daß die Kopplung des PCV2 ORF2-Proteins als Capture-Molekül sowie die Erstellung der Versuchsansätze mit akzeptablem Aufwand ohne Spezialtechniken durchführbar war. Aufgrund der Anordnung der Proben auf Platten im 96-well-Format und der vollautomatischen Messung war ein hoher Probendurchsatz möglich. Nach der Einführung von Waschschritten in die Versuchsansätze konnten hohe Fluoreszenzsignale erzeugt werden. Im Laufe der Optimierungsversuche wurde allerdings die fehlende Korrelation dieser Fluoreszenzsignale mit den Ergebnissen der Referenzmethode deutlich. Aufgrund der unbekanntesten Testeigenschaften sowie fehlender Kontrollmöglichkeiten wurden diese nicht sogleich als unspezifische bzw. falsch positive Signale erkannt. Erst durch die Testung von positiven und negativen Feldseren an verschiedensten Bead-Arten wurde ersichtlich, daß die Fluoreszenzen nicht ausschließlich durch die spezifische Bindung der PCV2-Antikörper an das Capture-Protein entstanden. Im Ausschlussverfahren konnte die Ursache eingegrenzt werden. Bestandteile aus dem

Schweineserum führten vermutlich durch unspezifische Bindungen an die LiquiChip®-Beads zu einem Fluoreszenzereignis. Durch Vorinkubation der Beads in Pferdeserum und der Feldseren mit einem Block-Puffer wurde versucht, diese Serumbestandteile abzusättigen und so eine Bindung an die Beads zu verhindern. Die Inkubationsvarianten führten weder zu einer Minimierung der unspezifischen Bindung noch zu einer verbesserten Differenzierung PCV2-positiver und negativer Seren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bead-Arten sind für den Nachweis von Antikörpern gegen das PCV2 ORF2-Protein nicht geeignet. Alternative Bead-Arten für einen vergleichbaren Versuchsansatz stehen derzeit nicht zur Verfügung.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, eine bereits in der Diagnostik von Schweineviren etablierte Methode, die PCR, zu einer Multiplex-PCR zu erweitern. Als zu detektierende Parameter wurden die derzeit bedeutendsten viralen Erreger von respiratorischen Erkrankungen des Schweins, das PRRS-Virus (Typ 1 und Typ 2), das Porzine Influenzavirus mit den Subtypen H1N1, H3N2 und H1N2 und PCV2 gewählt. Es wurden die Primersequenzen von bereits etablierten Einfach-PCRs an die besonderen Ansprüche einer Multiplex-PCR angepasst und die Methode zunächst im Einzelansatz auf Funktionsfähigkeit überprüft. Im Anschluss wurden die Parameter zu einer Multiplex-PCR zusammengeführt, die Methode optimiert und auf Spezifität, Sensitivität und Verhalten in der Routinediagnostik überprüft. Aufgrund der im Gegensatz zur Einfach-PCR zum Teil herabgesetzten Sensitivität ist diese Methode für Ausschlussuntersuchungen weniger geeignet. Für die Untersuchung von Probenmaterial klinisch erkrankter Tiere ist sie jedoch gut geeignet und bietet die Möglichkeit einen schnellen Überblick über das Erregerspektrum zu erhalten. Es muss jedoch berücksichtigt werden, daß bestimmte Parameter, z.B. PCV2, die Sensitivität des Nachweises der anderen Parameter sehr deutlich herabsetzen kann. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da PCV2-DNA in Probenmaterial von klinisch erkrankten Tieren in sehr hohen Mengen vorhanden ist und dadurch die weiteren Parameter noch zusätzlich beeinflusst werden können.

7 Summary

Wiebke Schulze Esking

Influential factors in the design, validation and implementation of methods for multi parameter diagnostics of infectious diseases in swine with a case study of suspension array technology and multiplex PCR

Institute of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and bioScreen, European Veterinary Disease Management Center GmbH, Münster

Submitted in February 2008

106 pages, 34 figures, 14 tables, 118 references, appendix with 22 pages, 4 figures and 15 tables

keywords: multi parameter diagnostic, suspension array technology, multiplex PCR, infectious diseases swine, PRRSV, PCV2

In the pig population the clinical picture of respiratory diseases with more than one pathogen involved is becoming more and more important. Diagnostic methods for the simultaneous detection of multiple pathogens are essential for quick and efficient therapy and contribute to the economical management of swine farms. Within the scope of this doctorate thesis was the development of laboratory methods for the multiplex detection of antibodies and nucleic acids of viral pathogens involved in respiratory diseases of swine.

Initially, The xMAP[®] Liquid Chip Technology (Luminex Corporation, Austin, Tx, USA) was used in connection with the LiquiChip[®]-Workstation (Qiagen, Hilden, D) for the development of a multiplex detection method for antibodies in porcine serum. So far this method hasn't been used for the detection of antibodies in veterinary applications, therefore the feasibility was initially tested in a single parameter assay for antibodies against Porcine Circovirus Type 2 (PCV2). While developing the assay it became clear that coupling of PCV2 ORF2-protein as a capture molecule and preparation of the assays was possible with reasonable effort and without special techniques. The combination of the samples in a 96-well form and the fully automated measurement of the fluorescence signals allowed a high throughput of test samples. High fluorescence signals were detected after wash steps were implemented. During optimization it became obvious that the correlation between the fluorescence signals generated with the LiquiChip[®]-assay and the results of the IFAT as a reference method was missing. As the characteristics of the test system are largely unknown and control methods were not applicable the signals were not directly identified as unspecific (false positive). Not until positive and negative field samples were tested with a variety of bead-types it became obvious that fluorescence did not result exclusively from the specific binding of PCV2-antibodies to the capture protein. It was possible to locate the origin of the unspecific

fluorescence signals through process of elimination. One such possibility was the unspecific binding of serum components to the LiquiChip[®]-Beads. Preincubation of the beads in horse serum and of the field samples in a variety of blocking buffers and blocking beads was carried out to reduce the unspecific signals. During the process of preincubation the serum components were to be saturated and the unspecific binding to the beads inhibited. These methods of incubation neither minimized the unspecific binding nor improved the differentiation of PCV2-positive and negative pig serum samples. The bead types used in the present work are not suitable for the detection of antibodies against the PCV2 ORF2 protein in pig serum. Alternative bead types applicable for a comparable assay set-up are currently not available.

The second aim of this doctorate thesis was to upgrade the Polymerase Chain Reaction (PCR), an already established method for the detection of pig viruses, and develop a multiplex PCR. Selected test parameters for this multiplex PCR were the most significant viral pathogens of respiratory diseases in pigs, currently, PRRS virus (type 1 and type 2), the porcine influenza virus including subtypes H1N1, H3N2 and H1N2 and PCV2. Primer sequences of already established single parameter PCRs were adjusted to the special requirements of multiplex PCRs. The method was initially tested for efficiency in a single parameter setup. Subsequently the four test parameters were merged in a multiplex PCR setup, optimized and finally tested for specificity, sensitivity and performance in routine diagnostics. Compared to the single parameter PCR the sensitivity of the multiplex PCR is partly reduced. Due to this the method is less suitable as a test to rule out certain parameters. However it is useful for the examination of samples from clinically diseased animals because it provides a quick overview of the pathogen spectrum. That certain parameters e.g. PCV2, considerably diminish the detection limit of the remaining parameters must be taken into account. This is especially important as the PCV2-genom is present in samples of clinically diseased pigs in abundance and can therefore influence the remaining parameters.

8 Literaturverzeichnis

Agüero M., Fernández J, Romero LJ, Zamora MJ, Sánchez C, Belák S. A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet Res.* 2004;35:551-63.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clark EG, Ellis JA, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest.* 1998;10:3-10.

Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest.* 2000a;12:3-14.

Allan GM, McNeilly F, Ellis JA, Krakowka S, Meehan B, McNair I, et al. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol.* 2000b;145:2421-9.

Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with haemoglobin. *J Gen Physiol.* 1938;22:79-89.

Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disord.* 2006;16:830-8.

Baccaro MR, Moreno AM, Shinya LT, Dotto DS. Identification of bacterial agents of enteric diseases by multiplex PCR in growing-finishing pigs. *Braz J Microbiol.* 2003;34:225-9.

Bell DA, DeMarini DM. Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(18):5079.

Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods.* 2005;126:53-63.

Biacore™, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien. Application Note 9, Ligand immobilization using thiol-disulphide exchange. 2002 (zitiert vom 29.01.2008):5, <<http://www.biotech.iastate.edu/facilities/protein/seminars/BIACore/ApplicationNotes/ApplicationNote9.pdf>>.

Biagini RE, Sammons DL, Smith JP, MacKenzie BA, Striley CA, Semenova V, et al. Comparison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxins. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004a;11(1):50-5.

- Biagini RE, Sammons DL, Smith JP, Page EH, Snawder JE, Striley CA, et al. Determination of serum IgG antibodies to *Bacillus anthracis* protective antigen in environmental sampling workers using a fluorescent covalent microsphere immunoassay. *Occup Environ Med.* 2004b;61:703-8.
- Blanchard P, Mahé D, Cariolet R, Truong C, Le Dimna M, Arnauld C, et al. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol.* 2003;94:183-94.
- Bonfield TL, John N, Barna BP, Kavuru MS, Thomassen MJ, Yen-Lieberman B. Multiplexed particle-based anti-granulocyte macrophage colony stimulating factor assay used as pulmonary diagnostic test. *Clin Diagn Lab Immun.* 2005;12(7):821-4.
- Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(16):3235-41.
- Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods.* 2004;122:171-8.
- Carson RT, Vignali DA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods.* 1999;227:41-52.
- Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol.* 1999;57:145-51.
- Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Meth Appl.* 1993;3(3):18-29.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(23):11141-56.
- Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2, H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods.* 2002;102:53-9.
- Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J.* 2003;44:735-7.

Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(7):1717-23.

Chung W, Chan W, Chaung H, Lien Y, Wu C, Huang Y. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs. *J Virol Methods.* 2005;124:11-9.

Christopher-Hennings J, Faaberg KS, Murtaugh MP, Nelson EA, Roof MB, Vaughn EM, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: interpretation and limitations. *Swine Health Prod.* 2002;10(5):213-8.

Cirino NM, Musser KA, Egan C. Multiplex diagnostics platforms for detection of biothreat agents. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4(6):842-57.

Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol.* 2003;69:132-44.

Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Meth Appl.* 1993;3(3):30-7.

Duden – Deutsches Universalwörterbuch. 6. Auflage ISBN: 978-3-411-05506-7. Mannheim: Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG; 2006.

Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Meth Appl.* 1994;3(4):65-75.

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):559-70.

Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods.* 2006;38:317-23.

Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol.* 1998;40(8):2922-9.

Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman Jr JR. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix™ system. *Clin Chem.* 1997;43(9):1749-56.

Halbur PG. Porcine viral respiratory disease. Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society; 1998 Jul 5-9; Birmingham, England. 1998. p. 1-8.

Harder TC, Huebert P. Development and application of a nonplex RT-PCR for simultaneous detection of mycoplasmal and viral agents associated with the porcine respiratory disease complex. In: IPVS Veranstaltungen GmbH, Herausgeber. Proceedings of the 18th Congress of the International Pig Veterinary Society; 2004 Jun 27 – Jul 1; Hamburg, Germany. Osnabrück: Druckerei Meyer GmbH; 2004. p. 341.

Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, Bolin SR, Lager KM, Morozov I, et al. Experimental reproduction of severe disease in cd/cd pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol.* 2001;38:528-39.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step-protocol. *BioTechniques.* 1997;23:504-11.

Hengen PN. Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine. *Trends Biochem Sci.* 1997;22(6):225-6.

Huang C, Hung J, Wu C, Chien M. Short communication: Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses. *Vet Microbiol.* 2004;101:209-14.

Hurley JD, Engle LJ, Davis JT, Welsh AM, Landers JE. A simple, bead-based approach for multi-SNP molecular haplotyping. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(22):e186.

Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li MS, Rivers P, Slentz-Kesler KA, et al. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry.* 2000;39:131-40.

International Committee on Taxonomy of Viruses. Index of Viruses – Orthomyxoviridae. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond C, Herausgeber. Columbia University, New York, USA. 2006 (zitiert vom 29.01.2008)00.046, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm>.

Jackson R, Morris DJ, Cooper RJ, Bailey AS, Klapper PE, Cleator GM, et al. Multiplex polymerase chain reaction for adenovirus and herpes simplex virus in eye swabs. *J Virol Methods.* 1996;56(1):41-8.

Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keytel J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(23):10953-71.

Jessing SG, Angen Ø, Inzana TJ. Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4095-100.

Johannisson A, Jonasson R, Dernfalk J, Jensen-Waern M. Simultaneous detection of porcine proinflammatory cytokines using multiplex flow cytometry by the xMAP™ technology. *Cytometry Part A*. 2006;69A:391-5.

Johnson W, Roof M, Vaughn E, Christopher-Hennings J, Johnson CR, Murtaugh MP. Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet Immunol Immunop*. 2004;102:233-47.

Johnson AJ, Noga AJ, Kosoy O, Lanciotti RS, Johnson AA, Biggerstaff BJ. Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-west nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin M antibodies. *Clin Diagn Lab Immun*. 2005;12(5):566-74.

Jones LP, Zheng H, Karron RA, Peret TC, Tsou C, Anderson LJ. Multiplex assay for detection of strain-specific antibodies against the two variable regions of the G protein of respiratory syncytial virus. *Clin Diagn Lab Immun*. 2002;9(3):633-8.

Jung K, Kim J, Kim O, Kim B, Chae C. Differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by multiplex RT-nested PCR and comparison with in situ hybridization. *J Virol Methods*. 2003;108,41-7.

Kaerber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Exp Path Pharm*. 1931;162,480-7.

Kellar KL, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane B. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry*. 2001;45:27-36.

Kettman JR, Davies T, Chandler D, Oliver KG, Fulton RJ. Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets. *Cytometry*. 1998;33:234-43.

Khan IH, Kendall LV, Ziman M, Wong S, Mendoza S, Fahey J, et al. Simultaneous serodetection of 10 highly prevalent mouse infectious pathogens in a single reaction by multiplex analysis. *Clin Diagn Lab Immun*. 2005;12(4):513-9.

Kim J, Choi C, Han DU, Chae C. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. *Vet Rec*. 2001;149(10):304-5.

Kim J, Han DU, Choi C, Chae C. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*. 2003a;65(6):741-4.

- Kim J, Chae C. Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 2003b;67:133-7.
- Kim O, Choi C, Kim B, Chae C. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. *Vet Rec.* 2000;146(22):637-40.
- Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. 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.* 2000; 37:254-63.
- Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol.* 2001;38:31-42.
- Ladekjaer-Mikkelsen A, Nielsen J, Stadejek T, Storgaard T, Krakowka S, Ellis J, et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol.* 2002;89:97-114.
- Ladekjaer-Mikkelsen A, Bøtner A, Nielsen J, Hassing A, Baekbo P. Serological profiles in danish PMWS case and control herds. In: Martelli P, Cavarani S, Lavazza A, Herausgeber. *Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases; 2003 Jun 29 – Jul 2; Rome, Italy. University of Parma; 2003. p. 184-5.*
- Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonaplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *J Immunol Methods.* 2005;296:135-47.
- Larochelle R, Antaya M, Morin M, Magar R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods.* 1999;80:69-75.
- Larochelle R, Magar R, D'Allaire S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res.* 2003;67:114-20.
- Liu Q, Wang L, Willson P, Babiuk LA. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3474-7.
- Lottspeich F, Zorbas H, Herausgeber. *Bioanalytik.* ISBN 3-8274-0041-4. Berlin, Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH; 1998. p. 74-5.

Luminex Corporation, Austin, Texas, USA. High Non-Specific Background Signal in Serology Assays. 2006 (zitiert vom 29.01.2008):1-2,
<<http://www.luminexcorp.com/pdfs/support/High%20Background%20195.pdf>>.

Martins TB, Pasi BM, Litwin CM, Hill HR. Heterophile antibody interference in a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for quantitation of cytokines in human serum. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004a;11:325-9.

Martins TB, Burlingame R, von Mühlen CA, Jaskowski TD, Litwin CM, Hill HR. Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004b;11(6):1054-9.

Madec F, Eveno E, Morvan P, Hamon L, Blanchard P, Cariolet R, et al. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest Prod Sci*. 2000;63:223-33.

Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circovirus and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol*. 2000;81:1815-24.

McBride MT, Gammon S, Pitesky M, O'Brien TW, Smith T, Aldrich J, et al. Multiplexed liquid arrays for simultaneous detection of simulants of biological warfare agents. *Anal Chem*. 2003;75:1924-30.

McCarthy MP, White WI, Palmer-Hill F, Koenig S, Suzich JA. Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *J Virol*. 1998;72(1):32-41.

Meer RR, Songer JG. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am J Vet Res*. 1997;58(7):702-5.

Meulenbergh JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, de Kluyver EP, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*. 1993;192:62-72.

Middendorf LR, Bruce JC, Bruce RC, Eckles RD, Grone DL, Roemer SC, et al. Continuous, on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus. *Electrophoresis*. 1992;13:487-94.

Mutter GL, Boynton KA. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(8):1411-8.

Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer*. 2003;106:683-9.

Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*. 2000;81:2281-7.

Nawagitgul P, Harms PA, Morozov I, Thacker BJ, Sorden SD, Lekcharoensuk C, Paul PS. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(1):33-40.

Oliver KO, Kettman JR, Fulton RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clin Chem*. 1998;44:2057-60.

Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real-time PCR in postweaning multi-systemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods*. 2004;117:75-80.

Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, Jansen KU, Smith JF, Chirmule N, Esser MT. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed Luminex assay. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:108-15.

Pang S, Smith J, Onley D, Reeve J, Walker M, Foy C. A comparability study of the emerging protein array platforms with established ELISA procedures. *J Immunol Methods*. 2005;302:1-12.

Pesch S. Etablierung einer Nachweismethode für die zwei Genotypen von dem Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) und ein Beitrag zu seiner molekularen Epidemiologie. [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig; 2003.

Pesch S, Johannsen U, Strijkstra G, Ohlinger VF. Screening for pathogens in pcv2 associated diseases. In: Martelli P, Cavirani S, Lavazza A, Herausgeber. Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases; 2003 Jun 29 – Jul 2; Rome, Italy. University of Parma; 2003. p. 205-6.

Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA. Protein Assay, Technical Handbook. 2005 (zitiert vom 29.01.2008):14, <<http://www.piercenet.com/files/1601325ProteinAssay.pdf>>.

Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA. NHS and Sulfo-NHS. 2007 (zitiert vom 29.01.2008):1, <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=02040114&WT.mc_id=keyname>.

Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(10):3724–30.

Luminex Corporation, Austin, Texas, USA. High Non-Specific Background Signal in Serology Assays. 2006 (zitiert vom 29.01.2008):1-2,
<<http://www.luminexcorp.com/pdfs/support/High%20Background%20195.pdf>>.

Qiagen, Hilden, D. The LiquiChip™ Protein Suspension Array System. 2002 (zitiert vom 29.01.2008):4
<http://www1.qiagen.com/literature/brochures/lch/1019963BROS_LCH042002INT.pdf>.

Qiagen, Hilden, D. Qiagen® Multiplex PCR Handbook. 2004;24,32-3.

Rauch P, Zellmer A, Dankbar N, Specht C, Sperling D. Assayoptimierung: Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden. *Laborwelt*. 2005;6:1-7; Sonderdruck aus Nr.4/2005.

Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Meth Appl*. 1995;4(5):185-94.

Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Plana-Durán J, Rosell C, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol*. 2002;76(7):3232-9.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor; 1998. ISBN 0879693096.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage ΦX174). *P Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-7.

Santalucia Jr J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *P Natl Acad Sci USA*. 1998;95:1460-5.

Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol*. 2005;111:223–9.

Selby C. Interference in immunoassays. *Ann Clin Biochem*. 1999;36:702-1.

Shigemori Y, Mikawa T, Shibata T, Oishi M. Multiplex PCR: use of heat-stable *Thermus thermophilus* RecA protein to minimize non-specific PCR products. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(14):e126.

- Shin J, Molitor TW. Assessment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA load in sera and tissues during acute infection. *J Vet Sci.* 2002;3(2):75-85.
- Skogstrand K, Thorsen P, Nørgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sørensen LC, Hougaard DM. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. *Clin Chem.* 2005;51(10):1854–66.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
- Spearman C. The method of “right and wrong cases” (“constant stimuli”) without Gauss’s formulae. *Brit J Psychol.* 1908;2:227-42.
- Staros JV, Wright RW, Swingle DM. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reaction. *Anal Biochem.* 1986;156(1):220-2.
- Stoll D, Templin MF, Bachmann J, Joos TO. Protein microarrays: applications and future challenges. *Curr Opin Drug Disc.* 2005;8(2):239-52.
- Stryer L, Herausgeber. *Biochemie.* ISBN 3-86025-346-8. Berlin, Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH; 1996. p. 35.
- Suh DK, Song JC. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella spp.* in swine intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. *J Vet Sci.* 2005;6(3):231-7.
- Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin N Am-Food A.* 2001;17(3):551-65.
- Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M. Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by swine influenza virus in conventional and colostrum-deprived pigs. *J Vet Med B.* 2001;48(4):283-92.
- Vincent AL, Thacker BJ, Halbur PG, Rothschild MF, Thacker EL. An investigation of susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus between two genetically diverse commercial lines of pigs. *J Anim Sci.* 2006;84:49-57.
- Waterboer T, Sehr P, Michael K, Franceschi S, Nieland J, Joos T, et al. Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione S-transferase fusion proteins. *Clin Chem.* 2005;51(10):1845-53.
- Waterboer T, Sehr P, Pawlita M. Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays. *J Immunol Methods.* 2006;309:200-4.

Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. J Clin Microbiol. 2002;40(8):2922-9.

Xiao Z, Batista L, Dee S, Halbur P, Murtaugh MP. The level of virus-specific t-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. J Virol. 2004;78(11):5923-33.

9 Anhang

9.1 PCR-Primer

9.1.1 Primer der PCRs aus der Routinediagnostik

Tabelle 9-1: Routine-Primer für PRRSV-Typ 1 und PRRSV-Typ 2 im ORF 7 und dem 3`NTR (PESCH 2003)

	Bezeichnung	Sequenz
Externe RT-PCR für PRRSV	PLS	5`-ATG GCC AGC CAG TCA ATC-3`
	PLR	5`-TCG CCC TAA TTG AAT AGG TG-3`
Nested PCR für PRRSV-Typ 1	P-EU-7-14684-s	5`-ATG ATA AAG TCC CAG CGC CAG-3`
	P-EU-7-14903-as	5`-CTG TAT GAG CAA CCG GCA GCA T-3`
Nested PCR für PRRSV-Typ 2	P-US-7-14970-s	5`-AGT CCA GAG GCA AGG GAC CG-3`
	P-US-7-15306	5`-TCA ATC AGT GCC ATT CAC CAC-3`

Tabelle 9-2: Routine-Primer für PCV2 im ORF 2 (LIU et al. 2000)

	Bezeichnung	Sequenz
PCV2	1100+	5`-CAT ACA TGG TTA CAC GGA TAT TG-3`
	1570-	5`-CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG-3`

Tabelle 9-3: Routine-Primer für FLUAVsw im Matrix-Gen

	Bezeichnung	Sequenz
Externe RT-PCR für FLUAVsw	SIV-M-1008-as	5`-TTA CTC (CT)AG C(AT)C TAT G(CT)T GAC-3`
	SIV-M-26-s	5`-ATG AG(CT) CTT C(CT)A ACC GA(AG) GTC G-3`
Nested PCR für FLUAVsw	SIV-M-852-as	5`-GAC GAT CAA (AG)(AG)A TCC ACA ATA TC-3`
	SIV-M-238-s	5`-AGC G(AG)G GAC TGC AGC GTA GAC G-3`

9.1.2 Primer für die Multiplex-PCR

Tabelle 9-4: Multiplex-Primer für PRRSV-Typ 1 (ORF 7) und PRRSV-Typ 2 (ORF 6 +3`NTR)

Bezeichnung	Sequenz	Amplifikatlänge
PRRSV-US-as	5'-TGT CAA TCA GTG CCA TTC ACC AC-3'	595 bp
PRRSV-US-s	5'-GGT TTC ATC CGA TTG CGG CAA A-3'	
PRRSV-EU-as	5'-CTG TAT GAG CAA CCG GCA GCA T-3'	241 bp
PRRSV-EU-s	5'-ATG ATA AAG TCC CAG CGC CAG C-3'	

Tabelle 9-5: Multiplex-Primer für PCV2 im ORF 2

Bezeichnung	Sequenz	Amplifikatlänge
PCV2-s	5'-CTG GTC GTA TTT ACT GTT TTC GAA CGC AG-3'	483 bp
PCV2-as	5'-CTC TCC CGC ACC TTC GGA TAT ACT-3'	

Tabelle 9-6: Multiplex-Primer für FLUAVsw im Matrix-Gen

Bezeichnung	Sequenz	Amplifikatlänge
SIV-as	5'-CTG GAR CTA GGR TGA GTC CCA ATT GT-3'	304 bp
SIV-s	5'-CCA GTT GYA TGG GYC TCA TAT ACA ACA G-3'	

9.2 Zusammensetzung der Reaktionsansätze für RT-Reaktionen und PCRs

9.2.1 RT-Reaktionen

Tabelle 9-7: RT-Reaktion für einen Parameter: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil im Thermozykler

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
5 µl Omniscript®RT-Puffer, 10x	2 Stunden bei 37°C
2 µl (40 pmol) Antisense-Primer	5 Minuten bei 94°C
1 µl (40 U) RNase Inhibitor	
4 µl (20 mM) dNTPs	
2 µl (8 U) Omniscript®RT-Enzym	
10 µl RNA-Aufarbeitung von Feldproben oder eines PRRSV-Typ 1-, PRRSV-Typ 2-, FLUAVsw-Isolates	
ad 50 µl Aqua dest	

Tabelle 9-8: RT-Reaktion für drei Parameter: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil im Thermozykler

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
5 µl Omniscript®RT-Puffer, 10x	2 Stunden bei 37°C
2 µl (40 pmol) SIV-as-Primer	5 Minuten bei 94°C
2 µl (40 pmol) PRRSV-US-as	
2 µl (40 pmol) PRRSV-EU-as	
1 µl (40 U) RNase Inhibitor	
4 µl (20mM) dNTPs	
2 µl (8 U) Omniscript®RT-Enzym	
15 µl RNA-Aufarbeitung von Feldproben oder Templatemischung aus je 5 µl RNA-Aufarbeitung eines PRRSV-Typ 1-, PRRSV-Typ 2-, FLUAVsw-Isolates	
ad 50 µl Aqua dest	

9.2.2 Multiplex-PCR

Tabelle 9-9: Multiplex-PCR zur Überprüfung der Einzelparameter: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil im Thermozykler

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
25 µl Qiagen® Multiplex PCR Master Mix	Aktivierung der Polymerase:
0,5 µl (10 pmol) Sense-Primer	15 min bei 95°C
0,5 µl (10 pmol) Antisense-Primer	Amplifikation (45 Zyklen):
2 µl DNA-Aufarbeitung oder cDNA aus der RT-Reaktion	30 s bei 94°C
Aqua dest. ad 50 µl	90 s bei 60°C
	90 s bei 72°C
	Finale Extension:
	10 min bei 72°C

Tabelle 9-10: Multiplex-PCR: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil im Thermozykler

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
25 µl Qiagen® Multiplex PCR Master Mix	Aktivierung der Polymerase:
0,5 µl (10 pmol) PCV2-s	15 min bei 95°C
0,5 µl (10 pmol) PCV2-as	Amplifikation (45 Zyklen):
0,5 µl (10 pmol) PRRSV-US-s	30 s bei 94°C
0,5 µl (10 pmol) PRRSV-US-as	90 s bei 60°C
0,75 µl (10 pmol) PRRSV-EU-s	90 s bei 72°C
0,75 µl (10 pmol) PRRSV-EU-as	Finale Extension:
0,75 µl (10 pmol) SIV-s	10 min bei 72°C
0,75 µl (10 pmol) SIV-as	
2 µl DNA	
2 µl cDNA aus der RT-Reaktion	
Aqua dest. ad 50 µl	

9.2.3 Multiplex-RT-PCR

Tabelle 9-11: Multiplex-RT-PCR zur Prüfung der Einzelparameter: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil im Thermozykler

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
25 µl Qiagen® Multiplex PCR Master Mix	Reverse Transkription
1 µl Sensiscript® RT-Enzym	60 min bei 37°C
1 µl RNase Inhibitor + Sensiscript® RT-Puffer 1:4	Aktivierung der Polymerase:
0,5 µl (10 pmol) Sense-Primer	15 min bei 95°C
0,5 µl (10 pmol) Antisense-Primer	Amplifikation (45 Zyklen):
2 µl DNA- oder RNA-Aufarbeitung	30 s bei 94°C
Aqua dest. ad 50 µl	90 s bei 60°C
	90 s bei 72°C
	Finale Extension:
	10 min bei 72°C

Tabelle 9-12: Multiplex-RT-PCR: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil im Thermozykler

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
25 µl Qiagen® Multiplex PCR Master Mix	Reverse Transkription:
1 µl Sensiscript® RT-Enzym	60 min bei 37°C
1 µl RNase Inhibitor + Sensiscript® RT-Puffer 1:4	Aktivierung der Polymerase:
0,5 µl (10 pmol) PCV2-s	15 min bei 95°C
0,5 µl (10 pmol) PCV2-as	Amplifikation (45 Zyklen):
0,5 µl (10 pmol) PRRSV-US-s	30 s bei 94°C
0,5 µl (10 pmol) PRRSV-US-as	90 s bei 60°C
0,5 µl (10 pmol) PRRSV-EU-s	90 s bei 72°C
0,5 µl (10 pmol) PRRSV-EU-as	Finale Extension:
0,5 µl (10 pmol) SIV-s	10 min bei 72°C
0,5 µl (10 pmol) SIV-as	
2 µl DNA	
2 µl RNA	
Aqua dest. ad 50 µl	

9.2.4 Sequenzierungs-PCRs

Tabelle 9-13: Sequenzierungs-PCR 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil im Thermozykler

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
2,5 µl Q-Solution	Amplifikation (25 Zyklen):
2,5 µl Qiagen PCR-Puffer, 10x	30 Sekunden 95°C
8 mM je dNTPs	30 Sekunden 52°C
6,25 mM MgCl ₂	60 Sekunden 72°C
10 pmol M13-Sense-xxx	
10 pmol M13-Antisense-xxx	
0,75 U Taq DNA Polymerase	
2 µl aus dem Agarosegel extrahierte DNA der aufgetrennten Multiplex-PCR-Produkte	
Aqua dest. ad 25 µl	

Tabelle 9-14: Sequenzierungs-PCR 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Temperaturprofil im Thermozykler

Reaktionsansatz	Temperaturprofil
2 µl (4 pmol) IRD700-markierter Primer	2 Minuten bei 95°C
2 µl (4 pmol) IRD800-markierter Primer	25 Zyklen
0,7 µl DMSO	45 s bei 95°C
2 µl Template aus der Sequenzierungs-PCR 1	45 s bei 55°C
Aqua dest. ad 16,5 µl	45 s bei 70°C
	Kühlen bei 4°C
nach Zugabe der Stop-Solution: Denaturierung (3 Minuten bei 70°C)	

9.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9-15: Übersicht über verwendete Pipetten (Eppendorf, Hamburg, D) und Pipettenspitzen (Biozym, Hessisch-Oldendorf, D)

Pipetten			Pipettenspitzen	
Bezeichnung	Kapazität	Kat.Nr.	Kapazität	Kat.Nr.
Research	0,1 – 2,5 µl	3111 000.114	2,5 µl	690005
Reference	0,5 – 10 µl	4910 000.018	10 µl	692139; 692150
Reference	10 – 100 µl	4910 000.042	100 µl	692066
Reference	50 – 200 µl	4910 000.093	200 µl	692069
Reference	100 – 1000 µl	4910 000.069	1000 µl	691000

9.4 Alignments der sequenzierten Multiplex-PCR-Produkte

9.4.1 Porzines Circovirus Typ2

Abbildung 9-1: Sequenzvergleich des in der Multiplex-PCR mit PCV2-Primern amplifizierten Fragmentes mit PCV2-Referenzsequenzen

(*) Die ORF2-Sequenzen sind in 3'-5'-Richtung dargestellt, entsprechend der Anordnung des ORF2-Gens im PCV2-Genom. Folglich ist der antisense-Primer in 5'-Richtung und der sense-Primer in 3'-Richtung dargestellt.

```

                *           20           *           40           *           60           *
AF201897 : ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCGCAGCCATCTTGGCCAGATCCTCCGCCGCG : 77
93965    : .....A..... : 77
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----

```

```

                80           *           100           *           120           *           140           *
AF201897 : CCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCA : 154
93965    : ..... : 154
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----CTCTCCCGCA

```

PCV2-as (*)

```

          160          *          180          *          200          *          220          *
AF201897 : CCTTCGGATATACTGTCAAGCGAACCACAGTCAGAACGCCCTCCTGGGCGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAAT : 231
93965    : .....AA.....T..... : 231
Multiplex : -----AA.....T..... : 63
Primer   : CCTTCGGATATACT-----

```

```

          240          *          260          *          280          *          300
AF201897 : GACTTTCTTCCCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAGGTTAAGGT : 308
93965    : A..... : 308
Multiplex : A..... : 140
Primer   : -----

```

```

          *          320          *          340          *          360          *          380
AF201897 : TGAATTCTGGCCCTGCTCCCCGATCACCCAGGGTGACAGGGGAGTGGGCTCCAGTGCTGTTATTCTAGATGATAACT : 385
93965    : ..... : 385
Multiplex : ..... : 217
Primer   : -----

```

```

          *          400          *          420          *          440          *          460
AF201897 : TTGTAACAAAGGCCACAGCCCTCACCTATGACCCCTATGTAAACTACTCCTCCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTC : 462
93965    : ..... : 462
Multiplex : ..... : 294
Primer   : -----

```

```

          *      480      *      500      *      520      *      54
AF201897 : TCCTACCACTCCCGCTACTTTACCCCAAAACCTGTCCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAACCAACAACAAAAG : 539
93965    : ..... : 539
Multiplex : ..... : 371
Primer   : -----

```

```

          0      *      560      *      580      *      600      *
AF201897 : AAATCAGCTGTGGCTGAGACTACAAACTGCTGGAAATGTAGACCACGTAGGCCTCGGCACTGCGTTCGAAAACAGTA : 616
93965    : ..... : 616
Multiplex : .....----- : 430
Primer   : -----CTGCGTTCGAAAACAGTA
                                     PCV2-s (*)

```

```

          620      *      640      *      660      *      680      *
AF201897 : TATACGACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCCACTT : 693
93965    : ..... : 693
Multiplex : ----- : -
Primer   : AATACGACCAG-----

```

```

          700
AF201897 : AACCCCTTAA : 702
93965    : ..... : 702
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----

```

9.4.2 PRRSV-Typ 1

Abbildung 9-2: Sequenzvergleich des in der Multiplex-PCR mit PRRSV-Typ 1-Primern amplifizierten Fragmentes mit PRRSV-Typ 1-Referenzsequenzen

ORF 7:

```

                *      20      *      40      *      60      *
Lelystad   : ATGCCCGGTAAAAACCAGAGCCAGAAGAAAAAGAAAAGTACAGCTCCGATGGGGAATGGCCAGCCAGTCAATCAAC : 76
190136    : .....AC..... : 76
Multiplex  : ----- : -
Primer     : -----

                80      *      100      *      120      *      140      *
Lelystad   : TGTGCCAGTTGCTGGGTGCAATGATAAAGTCCCAGCGCCAGCAACCTAGGGGAGGACAGGCCAAAAAGAAAAAGCC : 152
190136    : .....A.....CA..... : 152
Multiplex  : -----...C....G.....G.....G..... : 34
Primer     : -----ATGATAAAGTCCCAGCGCCAGC-----
                PRRSV-EU-S

                160      *      180      *      200      *      220
Lelystad   : TGAGAAGCCACATTTTCCCCTGGCTGCTGAAGATGACATCCGGCACCACCTCACCCAGACTGAACGCTCCCTCTGC : 228
190136    : .....C.....T.....T... : 228
Multiplex  : .....G.....C.....T.....T... : 110
Primer     : -----

```

```

*           240           *           260           *           280           *           300
Lelystad  : TTGCAATCGATCCAGACGGCTTTCAATCAAGGCGCAGGAACTGCGTCGCTTTCATCCAGCGGGAAGGTCAGTTTTTC : 304
190136    : .....T.....C..... : 304
Multiplex : .....T..... : 186
Primer    : -----

```

```

*           320           *           340           *           360           *           380
Lelystad  : AGGTTGAGTTTATGCTGCCGGTTGCTCATAACAGTGCGCCTGATTGCGGTGACTTCTACATCCGCCAGTCAGGGTGC : 380
190136    : .....C..... : 380
Multiplex : .....C----- : 197
Primer    : -----ATGCTGCCGGTTGCTCATAACAG-----

```

PRRSV-EU-as

```

Lelystad  : AAGTTAA : 387
190136    : ..... : 387
Multiplex : ----- : -
Primer    : -----

```

9.4.3 PRRSV-Typ 2

Abbildung 9-3: Sequenzvergleich des in der Multiplex-PCR mit PRRSV-Typ 2-Primern amplifizierten Fragmentes mit PRRSV-Typ 2-Referenzsequenzen

PRRSV-US ORFs 6-7:

```

          Start ORF 6
                *      20      *      40      *      60      *
VR2332   : ATGGGGTCGTCCTTAGATGACTTCTGTCATGATAGCACGGCTCCACAAAAGGTGCTTTTGGCGTTTTCTATTACC : 75
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----

          80      *      100      *      120      *      140      *
VR2332   : TACACGCCAGTGATGATATATGCCCTAAAGGTGAGTCGCGGCCGACTGCTAGGGCTTCTGCACCTTTTGATCTTC : 150
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----

          160      *      180      *      200      *      220
VR2332   : CTGAATTGTGCTTTACCTTCGGGTACATGACTTTCGCGCACTTTCAGAGTACAAATAAGGTCGCGCTCACTATG : 225
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----

```

```

          *      240          *      260          *      280          *      300
VR2332   : GGAGCAGTAGTTGCACTCCTTTGGGGGGTGTACTCAGCCATAGAAACCTGGAAATTCATCACCTCCAGATGCCGT : 300
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----

```

```

          *      320          *      340          *      360          *
VR2332   : TTGTGCTTGCTAGGCCGCAAGTACATTCTGGCCCCTGCCACCACGTTGAAAGTGCCGCACGGTTTCATCCGATT : 375
Multiplex : ----- : -
Primer   : ----- GGTTTCATCCGATT
                                     PRRSV-US-s

```

```

          380          *      400          *      420          *      440          *
VR2332   : GCGGCAAATGATAACCACGCATTTGTTCGTCCGGCGTCCCGGCTCCACTACGGTCAACGGCACATTGGTGCCCGGG : 450
Multiplex : ----- : 67
Primer   : GCGGCAAA-----

```

```

                                     Start ORF 7
          460          *      480          *      500          *      520
VR2332   : TTAAAAAGCCTCGTGTTGGGTGGCAGAAAAGCTGTTAAACAGGGAGTGGTAAACCTTGTCAAATATGCCAAATAA : 525
Multiplex : ..... : 142
Primer   : -----
                                     Ende ORF 6

```

```

          *      540          *      560          *      580          *      600
VR2332   : CAACGGCAAGCAGCAGAAGAGAAAGAAGGGGGATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGTGCCAGATGCTGGGTAAGAT : 600
Multiplex : ..... : 217
Primer   : -----

```

```

          *      620          *      640          *      660          *
VR2332   : CATCGCTCAGCAAACCAGTCCAGAGGCAAGGGACCGGAAAGAAAATAAGAAGAAAAACCCGGAGAAGCCCCA : 675
Multiplex : ..... : 292
Primer   : -----

```

```

        680          *      700          *      720          *      740          *
VR2332   : TTTTCCTCTAGCGACTGAAGATGATGTCAGACATCACTTTACCCCTAGTGAGCGGCAATTGTGTCTGTCTGTCGAAT : 750
Multiplex : ..... : 367
Primer   : -----

```

```

        760          *      780          *      800          *      820
VR2332   : CCAGACCGCCTTTAATCAAGGCGCTGGGACTTGCACCCTGTCAGATTCAGGGAGGATAAGTTACACTGTGGAGTT : 825
Multiplex : ..... : 442
Primer   : -----

```

Ende ORF 7

```

          *      840          *      860          *      880          *      900
VR2332   : TAGTTTGCTACGCATCATACTGTGCGCCTGATCCGCGTCACAGCATCACCCCTCAGCATTGATGGGCTGGCATTCT : 900
Multiplex : ..... : 517
Primer   : -----

```



```

          *      920      *      940      *      960      *
VR2332   : TGAGGCATCTCAGTGTTTGAATTGGAAGAATGTGTGGTGAATGGCACTGATTGACATTGTGCCTCTAAGTCACCT : 975
Multiplex : ..... : 550
Primer   : -----GTGGTGAATGGCACTGATTGACA-----
                    PRRSV-US-as

```

```

          980      *      1000      *      1020      *      1040      *
VR2332   : ATTCAATTAGGGCGACCGTGTGGGGGTGAGATTTAATTGGCGAGAACCATGCGGCCGAAATTAATAAAAAAAAAAAAA : 1050
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----

```

```

VR2332   : AAAAAAA : 1057
Multiplex : ----- : -
Primer   : -----

```

9.4.4 Porcines Influenzavirus

Abbildung 9-4: Sequenzvergleich des in der Multiplex-PCR mit FLUAVsw-Primern amplifizierten Fragmentes mit FLUAVsw-Referenzsequenzen

Matrix-Gen:

		*	20	*	40	*	60	*	
H3N2	:	ACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTCTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAGACTGGAAG	:	76					
H1N1	:	-----	:	-					
H1N2	:	-----	:	-					
55180	:	-----	:	-					
Multiplex	:	-----	:	-					
Primer	:	-----	:	-					
		80	*	100	*	120	*	140	*
H3N2	:	ATGTCTTTGCAGGGAAGAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAGTGGCTAAAGACAAGACCAATCCTGTCACCTCT	:	152					
H1N1	:	-----	:	14					
H1N2	:	-----	:	-					
55180	:	-----	:	-					
Multiplex	:	-----	:	-					
Primer	:	-----	:	-					

```

          160          *          180          *          200          *          220
H3N2      : GACTAAGGGGATTTTAGGATTTGTGTTACAGCTCACCGTGCCAGTGAACGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTC : 228
H1N1      : .....T.....T.....G.....A.....T..... : 90
H1N2      : ----- : -
55180     : ----- : 7
Multiplex : ----- : -
Primer    : -----

```

```

          *          240          *          260          *          280          *          300
H3N2      : CAAAATGCCCTAAATGGGAATGGAGACCCGAATAACATGGATAGAGCAGTCAAATTATAACAAGAAGCTCAAAAGAG : 304
H1N1      : .....C.....G. : 166
H1N2      : ----- : -
55180     : .....C.....A.....G.....T..... : 83
Multiplex : ----- : -
Primer    : -----

```

```

          *          320          *          340          *          360          *          380
H3N2      : AAATAACATTCCATGGGGCCAAGGAGGTGTCACCTCAGCTACTCAACTGGTGCACTTGCCAGCTGCATGGGCCTCAT : 380
H1N1      : .....A.....G...C...T..G.....T..... : 242
H1N2      : -----G.....A.....T..... : 70
55180     : .....A.....a.....A.....t.....t..... : 159
Multiplex : ----- : -
Primer    : -----CCAGTTGYATGGGYCTCAT

```

SIV-s

```

          *           400           *           420           *           440           *
H3N2      : ATACAACAGAATGGGAACAGTGACCACAGAAGTGGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAGCAGATTGCTGAT : 456
H1N1      : .....TG.....T.....A..... : 318
H1N2      : .....CT.....C..... : 146
55180     : .....CT.....C..... : 235
Multiplex : -----CT.....C..... : 67
Primer    : ATACAACAG-----

```

```

        460           *           480           *           500           *           520           *
H3N2      : TCACAGCATCGGTCTCACAGACAAATGGCGACTACCACCAACCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTG : 532
H1N1      : .....TG.....A..... : 394
H1N2      : .....A.....T.....T..... : 222
55180     : .....T..... : 311
Multiplex : .....T..... : 143
Primer    : -----

```

```

        540           *           560           *           580           *           600
H3N2      : CTAGCACTACAGCTAAGGCTATGGAACAGATGGCTGGGTCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGGTTGCCAG : 608
H1N1      : .....A..... : 470
H1N2      : .....A.....A..... : 298
55180     : .....G.....A..... : 387
Multiplex : .....G.....A..... : 219
Primer    : -----

```

```

*      620      *      640      *      660      *      680
H3N2   : TCAGGCTAGGCAGATGGTGCATGCGATGAGAACAATTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGAC : 684
H1N1   : ....G.....G.....T.....T..... : 546
H1N2   : ....A.....A.....A.....C...T..... : 374
55180  : ....A.....A.....A.....T.....C..... : 463
Multiplex : ....A.....A.....----- : 249
Primer  : -----ACTATTGGGACTCAYCCTAGYTCCAG-----

```

SIV-as

```

*      700      *      720      *      740      *      760
H3N2   : CTTCTTGAAAATTTGCAGGCCTACCAGAAACGGATGGGAGTGCAGATACAGCGATTCAAGTGATCTTCTCGTTGTT : 760
H1N1   : .....C.A.. : 622
H1N2   : ----- : 391
55180  : .....G.....C.....CA.. : 539
Multiplex : ----- : -
Primer  : -----

```

```

*      780      *      800      *      820      *
H3N2   : GCAGCAAATATTATTGGGATCTTGCACCTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTTTTCAAATGTATTTATCGTC : 836
H1N1   : .....C..C..... : 698
H1N2   : ----- : -
55180  : .....C.....----- : 569
Multiplex : ----- : -
Primer  : -----

```

```

      840          *          860          *          880          *          900          *
H3N2   : GCCTTAAATACGGTTTAAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCTGAGTCCATGAGGGAAGAATATCAACAGGA : 912
H1N1   : .....A..... : 774
H1N2   : ----- : -
55180  : ----- : -
Multiplex : ----- : -
Primer  : -----

```

```

      920          *
H3N2   : ACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACG : 938
H1N1   : .....----- : 783
H1N2   : ----- : -
55180  : ----- : -
Multiplex : ----- : -
Primer  : -----

```

Danksagung

Ganz herzlich danke ich Dr. V. Ohlinger für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit bei bioScreen in Münster und für seine Betreuung und Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Universität Leipzig sowie für die Betreuung und Anregungen danke ich Prof. Dr. H. Müller, Institut für Virologie, sehr herzlich.

Der Firma Boehringer Ingelheim danke ich für die finanzielle Unterstützung der Etablierung der Nachweisverfahren sowie für die Bereitstellung des rekombinanten PCV2 ORF2 Proteins.

Dr. Stefan Pesch, Dr. Christiane Fetzter, Dr. Gabriele Albers und Dr. Christoph Keller danke ich für die wissenschaftlichen Auseinandersetzungen und Anregungen.

Jochen Wolters, Janine Raatz, Heike Rengbers und Elena Asmus danke ich für die Anleitung und Unterstützung bei den Laborarbeiten – vielen Dank für die Geduld!

Ganz besonders danke ich meinem Mann, Philipp Schulze Eskin, der mir immer Geduld und Durchhaltevermögen vermittelt hat und zur rechten Zeit auch das passende Wort zu sagen wusste.