

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie
(Leiter: Univ.Prof. Dr.med.vet. Hans Tillmann Rümenapf)

Quantifizierender PCR-Nachweis von Lymphotropen Herpesviren 1-3 bei Wildschweinen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Lea Schweitzer

Wien, im Januar 2022

Betreuer: Univ.Prof. Dr.med.vet. Hans Tillmann Rügenapf; Institut für Virologie, Leitung,
Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ein herzliches Dankeschön an Herrn Univ.Prof. Dr.med.vet. Hans Tillmann Rümenapf aussprechen. Er hat mir das Thema meiner Diplomarbeit vorgeschlagen und mir mit viel konstruktiver Kritik beim Verfassen geholfen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr.med.vet. Angelika Auer, die mir mit ihrer fachlichen Beratung unglaublich viel geholfen hat. Danke, dass ich dich zu jeder Zeit kontaktieren durfte und du dich immer so schnell meiner Probleme und Fragen angenommen hast. Ich hoffe ich habe deine Zeit und deine Nerven nicht allzu sehr strapaziert.

Außerdem möchte ich mich bei Dr.med.vet. Kerstin Seitz für die große Hilfestellung bei der gesamten Klonierung bedanken.

Für die tolle und lustige Praktikumszeit und Einarbeitung bedanke ich mich bei Mag.rer.nat. Katharina Dimmel. Danke, dass du mich bei meiner Arbeit im Labor unterstützt hast und mir auch viel Arbeit abgenommen hast.

Auch bei meiner Familie bedanke ich mich herzlich für die finanzielle und vor allem psychische Unterstützung schon während meines gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Herpesviridae</i>	1
1.2	<i>Eppstein-Barr Virus und Burkitt Lymphom</i>	1
1.3	<i>Porcine Lymphotrope Herpesviren</i>	2
1.4	<i>Ziel dieser Diplomarbeit</i>	3
2	Material und Methoden	5
2.1	<i>Proben und DNA-Extraktion</i>	5
2.2	<i>Konventionelle PCR</i>	5
2.3	<i>Realtime-PCR</i>	6
2.4	<i>Klonierung</i>	7
2.4.1	<i>T – Vektor – Klonierung</i>	7
2.4.2	<i>Plasmid Minipreparation und Testverdau</i>	8
2.4.3	<i>Plasmid Midipräparation und Testverdau</i>	10
3	Ergebnisse	12
3.1	<i>Erstellung der Plasmidkontrollen</i>	12
3.1.1	<i>Messung der DNA-Konzentration</i>	14
3.2	<i>Validierung der qPCR</i>	16
3.3	<i>PLHV Nachweis in Wildschweinproben</i>	23
3.3.1	<i>Nachweis PLHV-1</i>	23
3.3.2	<i>Nachweis PLHV-2</i>	26
3.3.3	<i>Nachweis PLHV-3</i>	28
3.4	<i>Vergleich der Viruslast</i>	30
4	Diskussion	33
5	Zusammenfassung	36
6	Abstract	37
7	Literaturverzeichnis	38

1 Einleitung

1.1 Herpesviridae

Herpesviren sind weit verbreitet und gehören zu den größten und komplexesten bekannten Viren. Die Mitglieder der Familie der *Herpesviridae* sind behüllt und besitzen ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom, welches im Nukleokapsid des Virions vorliegt. Das Viruspartikel besteht neben dem Nukleokapsid aus einer Schicht Tegumentproteinen und einer von einer Lipiddoppelmembran gebildeten Hülle. Charakteristisch für die Biologie der Herpesviren ist ihre Fähigkeit zur Persistenz. Nach der Erstinfektion bleiben sie also lebenslang im Wirt. Sie können sich in den Zellkern zurückziehen, wo während dieser Latenz nur sehr wenige virale Gene exprimiert werden (Roizman und Baines 1991).

Innerhalb der *Herpesviridae* gibt es drei Subfamilien: die *Alphaherpesvirinae*, die *Betaherpesvirinae* und die *Gammaherpesvirinae*. *Alphaherpesvirinae* infizieren vor allem Fibroblasten und Epithelzellen. Bekannte Vertreter dieser Subfamilie sind das Gallid Herpesvirus 2 und 3 (Marek-Krankheit Virus Typ 1 und 2), sowie die humanen Herpesviren 1 und 2, welche die Herpes-simplex-Infektion beim Menschen auslösen können. Die Mitglieder der *Betaherpesvirinae* sind meist spezifisch für eine Spezies und einen Zelltyp. Humanes Herpesvirus 6 und 7 sind wichtige Mitglieder dieser Subfamilie. Die dritte Subfamilie innerhalb der *Herpesviridae* sind die *Gammaherpesvirinae*. Bei einer akuten Infektion mit Mitgliedern dieser Subfamilie kommt es häufig zu einer lymphoproliferativen Erkrankung und auch die bereits beschriebene Fähigkeit zur latenten Infektion findet typischerweise in Lymphozyten oder im lymphatischen Gewebe statt. Außerdem gehen bekannte maligne Erkrankungen auf Vertreter dieser Subfamilie zurück, wie z.B. das bösartige Katharralfieber der Rinder (Ovines Herpesvirus 2). Die Subfamilie der *Gammaherpesvirinae* wird weiter unterteilt in die Genus *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Percavirus* und *Rhadinovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. 2020).

1.2 Epstein-Barr Virus und Burkitt Lymphom

Der bekannteste Vertreter der *Gammaherpesvirinae* ist das Humane Herpesvirus 4 oder Epstein-Barr Virus (EBV) aus dem Genus *Lymphocryptovirus*. Die Zielzellen des EBV sind hauptsächlich Lymphozyten und oropharyngeale Epithelzellen, in welchen das Virus persistieren kann, wobei ca. 95 % der Menschen weltweit lebenslang infiziert sind ohne jemals

Symptome zu zeigen. EBV – das erste beim Menschen gefundene onkogene Virus – wird mit verschiedenen Neoplasien in Zusammenhang gebracht, wie z.B. „AIDS-related non Hodgkin lymphoma“ (ARL), „posttransplantation lymphoproliferative disease“ (PTLD) oder dem „Burkitt Lymphom“ (Yin et al. 2019). Die im Rahmen von ARL induzierte Immunsuppression fördert EBV, wobei es zu einer vermehrten Expression von viralen Antigenen kommt, die das Genexpressionsprogramm des Wirtes verändern können. Bei immunkompetenten Menschen spielt dies eine geringere Rolle, da das Immunsystem die virale Antigenexpression meist erfolgreich selektieren kann (Arvey et al. 2015). Beim Burkitt Lymphom sind drei Varianten bekannt: Die endemische Variante, welche vor allem Jungen zwischen vier und sieben Jahren in Äquatorialafrika betrifft, die sporadische Variante, welche Kinder und junge Erwachsene auf der ganzen Welt betrifft und die Immundefizienz-assoziierte Variante (Dunleavy 2018). Das endemische Burkitt Lymphom ist ein sehr aggressives B-Zell Lymphom, welches in Zusammenhang mit Infektionen mit EBV und *Plasmodium-falciparum* (Erreger der Malaria tropica) gebracht wurde. In Äquatorialafrika konnte EBV aus fast 100 % der Tumorzellen von Burkitt Lymphomen isoliert werden (bei der sporadischen und der Immundefizienz-assoziierten Form nur aus 15-40 %). Außerdem korrespondieren die Inzidenzen von Malaria-Infektionen und Burkitt Lymphomen in dieser Region. Beim endemischen Burkitt Lymphom werden B-Zellen durch EBV infiziert, was zu einem polyklonalen Wachstum der B-Lymphozyten führt. Durch die Malaria-Koinfektion kommt es zu einer zusätzlichen Immunsuppression und die EBV-spezifische T-Zell-Immunität wird beeinträchtigt. Dadurch können die B-Zellen ungestört proliferieren und die Wahrscheinlichkeit, dass chromosomale Translokationen stattfinden erhöht sich. Die chromosomalen Translokationen führen zu einer Dysregulation des C-MYC-Onkogens, wodurch die Zellen ungehemmt wachsen können und das Burkitt Lymphom bildet sich (Offor et al. 2018).

1.3 Porcine Lymphotrope Herpesviren

Zum Genus *Macavirus* der *Gammaherpesvirinae* gehören neben dem Alcelaphinen Herpesvirus und dem Ovinen Herpesvirus 1 – beides Auslöser des bösartigen Katharralfiebers bei Rind und anderen Paarhufern – die *Suid gammaherpesviren 3, 4 und 5*, welche auch als Porcine Lymphotrope Herpesviren Typ 1, Typ 2 und Typ 3 bezeichnet werden (Dall Agnol et al. 2020).

Während der Suche nach Risikofaktoren bei Xenotransplantationen von Organen vom Schwein zum Menschen wurden erstmals 1999 in Hausschweinen in Brandenburg,

Deutschland, die Porcinen Lymphotropen Herpesviren Typ 1 und Typ 2 gefunden (Ehlers et al. 1999). Die zwei Typen sind sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich in ihrer Nukleotidsequenz nur um sieben Prozent (Ehlers et al. 1999). In einer weiteren Studie konnte später das Lymphotrope Herpesvirus Typ 3 gefunden werden, welches sich in seiner Sequenz stärker von den anderen beiden unterscheidet (Chmielewicz et al. 2003).

Es ist ungeklärt, ob PLHVs „echte“ Pathogene sind, denn dafür sind sie zu weit verbreitet. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass das PLHV-1 eine lymphoproliferative Erkrankung von B-Zellen auslösen kann. Aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft kann davon ausgegangen werden, dass PLHV-2 und PLHV-3 ebenfalls lymphoproliferatives Potential haben. Die vom EBV ausgelöste „posttransplantation lymphoproliferative disease“ (PTLD) ist eine der größten Komplikationen bei Transplantationen. In einem Miniaturschwein-Modell konnte nachgewiesen werden, dass auch ein Zusammenhang zwischen Porcinen Gammaherpesviren und PTLD beobachtet wird (Huang et al. 2001).

In Irland wurde die Prävalenz der PLHV in Schweinebeständen bereits bestimmt. Das Ergebnis war, dass 90% der getesteten Schweine mit mindestens einem der drei PLHV infiziert waren, wobei PLHV-1 am häufigsten vorkam (McMahon et al. 2006). Bei einer weiteren Studie in Brasilien wurden verschiedene Schweineproben auf PLHV untersucht. In 50% der Proben konnte mindestens ein PLHV nachgewiesen werden, vor allem im lymphatischen Gewebe (Dall Agnol et al. 2020).

1.4 Ziel dieser Diplomarbeit

Ein bedeutendes Pathogen in Schweinebetrieben ist das *Porcine Circovirus-2* (PCV-2), da es das „postweaning multisystemic wasting syndrom“ (PMWS) auslösen kann, welches weltweit zu großen wirtschaftlichen Verlusten führt. PCV-2 ist an lymphatisches Gewebe gebunden, genauso wie die PLHV. Es wird daher spekuliert, dass eine PLHV-Infektion ein Cofaktor für den Ausbruch von PMWS sein könnte (McMahon et al. 2006).

Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Sequenzen von PLHV-1 und -2 zwischen Hausschweinen und Wildschweinen identisch sind (Ulrich et al. 1999). Daraus lässt sich schließen, dass ein Transfer dieser Viren zwischen Haus- und Wildschweinen sehr wahrscheinlich ist. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit das Ziel verfolgt einen absolut quantifizierenden PCR-Nachweis für PLHV-1, -2 und -3 zu etablieren und mit diesen Assays exemplarisch burgenländische Wildschweine zu screenen. Des Weiteren steht

nun ein Verfahren zur Verfügung, welches zur weiteren Diagnostik im Rahmen von PLHV-Untersuchungen ebenfalls bei Hausschweinen eingesetzt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Proben und DNA-Extraktion

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Proben von Wildschweinen, die im Zuge einer Gatterjagd im Burgenland geschossen wurden. Für die konventionelle PCR von PLHV-3 wurden auch archivierte Hausschweinproben aus österreichischen Schweinebetrieben verwendet.

Die Proben wurden na Entnahme bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Bei den Wildschweinen wurden Pools aus Lunge, Milz und Tonsillartupfer gemacht: Es wurden ca. 100 mg Stücke von den Milz- und Lungenproben in 1 ml PBS lysiert (Tissue lyser II, Qiagen, Deutschland) und drei Minuten lang bei 16000 x *g* zentrifugiert. Die Tonsillartupfer wurden in 1 ml PBS gegeben und für zehn Sekunden geschüttelt. Das Tupferlysat und der Überstand des Gewebelysats wurden im Verhältnis eins zu eins gepoolt. 200 µl des Pools wurden mit dem QIAamp 96 Virus QIAcube HT Kit nach Anleitung des Herstellers extrahiert (QIAcube HAT, Qiagen, Deutschland).

2.2 Konventionelle PCR

Mittels konventioneller PCR wurden Wildschwein- und Hausschweinproben auf PLHV-1, -2 und -3 untersucht. Das Ziel war zunächst, Proben zu finden, in welchen die Lymphotropen Herpesviren nachweisbar sind, um damit für die qPCR geeignete Plasmidstandards zu generieren. Die mit konventioneller PCR erzeugten Produkte wurden anschließend sequenziert und in das Plasmid pGemT kloniert. Die PCR wurde im Thermocycler (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems, Massachusetts) durchgeführt und anschließend analysiert (QIAxcel Advanced System, Qiagen, Deutschland).

Die Primer wurden von folgenden Nukleinsäuresequenzen abgeleitet (Auer, A.; persönl. Kommunikation, 2021):

- PLHV1: CT844939
- PLHV2: CT844938
- PLHV3: AY170316

In Tabelle 1 wurden die Primersequenzen der Forward-Primer (Primer-F) und der Reverse-Primer (Primer-R) und die Amplifikatlängen der PCR-Produkte aufgelistet. Für den Mastermix wurde das FastCycling PCR Kit, Qiagen, Deutschland verwendet. Die Zusammensetzung

wurde in Tabelle 2 dargestellt. Das Temperaturschema für die konventionelle PCR wurde wie folgt festgelegt:

- 95°C, 5 min
- 40x: 96°C, 5 sec (Denaturierung); 60°C, 5 sec (Primer annealing); 68°C, 25 sec (Elongation)
- 72°C, 1 min

Tab. 1: Primer und Amplifikatlänge für die konventionellen PCRs

	Primer-F	Primer-R	Amplifikatlänge
PLHV-1	PLHV1_gB_59F 5'-GATCTGTTCTAGCACTGTGG-3'	PLHV1u2_gB_859R 5'-CATGATCATCTTCACCACTC-3'	800 bp
PLHV-2	PLHV1u2_gB_37F 5'-GCAGGTAGCTTAAACTTAGG-3'	PLHV1u2_gB_699R 5'-CTTCATATCRGGSGTCACAC-3'	662 bp
PLHV-3	PLHV3_gB_59F 5'-GCTGTGGTCAAGTGTTATGG-3'	PLHV3_gB_669R 5'-CTTCACATCTGTGGTGACTC-3'	611 bp

Tab. 2: Zusammensetzung für einen Mastermix für die konventionelle PCR in μ l

Fast Cycling PCR-Mix	10
RNAse freies H ₂ O	5
Coral Load F C Dye	2
Primergemisch F(40 μ M)+R(40 μ M)	1
Gesamtvolumen Mastermix	18
Template	2

Aufreinigung und Sequenzierung

Die Proben, in welchen die Viren mittels konventioneller PCR nachgewiesen werden konnten, wurden aufgereinigt (Quantum Prep® PCR Kleen Spin Columns, Bio Rad, Kalifornien) und sequenziert (Tube Sequenzierung, Eurofins Scientific SE, Luxemburg), damit bestätigt werden konnte, dass es sich um die gesuchten Viren handelt.

2.3 Realtime-PCR

Der quantifizierende PCR-Nachweis wurde in drei verschiedenen qPCRs durchgeführt. Die spezifischen Forward-Primer (Primer-F), Reverse-Primer (Primer-R) und Sonden, welche verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet (Chmielewicz et al. 2003). Es wurde ein real-time PCR-Cycler (Rotor-Gene Q, Qiagen, Deutschland) benutzt. Der Mastermix wurde laut

Tabelle 4 zusammengesetzt, wobei der Luna® Universal Probe qPCR Master Mix, BioLabs, Massachusetts verwendet wurde. Das Temperaturschema wurde wie folgt festgelegt:

- 95 °C, 1 min
- 45x: 95 °C, 15 sec; 60 °C 30 sec

Tab. 3: Primer und Sonden, die für die qPCR verwendet wurden, sowie die Amplifikatlänge

	PLHV-1	PLHV-2	PLHV-3
Primer-F	<i>PLHV-1_gB1125F</i> 5'-CTCACCTCCAATACAGCGA-3'	<i>PLHV-2_gB1156F</i> 5'-GTCACCTGCAAATACACAGG-3'	<i>PLHV-3_gB1156F</i> 5'-AAGGACCCCAAAGAGGAAA-3'
Primer-R	<i>PLHV-1_gB1125R</i> 5'-GCTTGAATCGTGTGTTCCATA-3'	<i>PLHV-2_gB1155R</i> 5'-GGCTTGAATCGTATGTTCCATAT-3'	<i>PLHV-3_gB1156R</i> 5'-CTGAGGCACTGCATACTCTGT-3'
Sonde	<i>PLHV-1_gBSonde</i> FAM-5'- CTGGTCTACTGAATCGCCGCTAACA G-3'-BHQ-1	<i>PLHV-2_gBSonde</i> FAM-5'- CTGGTCTACTGAAGCGCTGCCAATAG- 3'-BHQ-1	<i>PLHV-3_gBSonde</i> FAM-5'- TCAATTTTATGGTTCACCTTCTACCT TTCCT-3'-BHQ-1
Amplifikat -länge	73 bp	74 bp	73 bp

Tab. 4: Schema für einen Mastermix der qPCR zum Nachweis von PLHV-1, -2 und -3 (in µl)

Luna Universal Probe qPCR Mix	10
RNAse freies H ₂ O	8,4
Primergemisch F(40µM)+R(40µM)	0,4
Sonde (20 pmol/µl)	0,2
Gesamtvolumen Mastermix	19
Template	1

2.4 Klonierung

Die aufgereinigten Produkte der konventionellen PCR wurden in ein kommerziell erhältliches Plasmid ligiert und in *Escherichia Coli* vermehrt. Die Vorgehensweise war bei PLHV-1, PLHV-2 und PLHV-3 gleich.

2.4.1 T – Vektor – Klonierung

Ligation

Für die Ligation wurden 4,5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 0,5 µl pGemT Vektor (T-Vektor, Promega, Wisconsin) und 5 µl 2 x Ligase Mastermix (Blunt/TA Ligase MasterMix, BioLabs, Großbritannien) in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt. Es wurde sieben Mal

hoch- und runter pipettiert. Die Ligation wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur (25 °C) inkubiert und dann auf Eis gestellt.

Transformation

Die kompetenten E. Coli Bakterien (HB101) wurden 30 Minuten auf Eis aufgetaut. 50 µl aufgetaute Bakterien wurden zu den 10 µl der Ligation gegeben und 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Bakterienwand wurde durch den Hitzeschock im Thermomixer bei 37 °C für 1 Minute und 30 Sekunden durchlässiger gemacht. Danach wurde das Eppendorf Reaktionsgefäß wieder 2-3 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurden 450 µl LB-Medium (ohne Ampicillin) zugegeben. Das Eppendorf Reaktionsgefäß wurde 20 Minuten bei 700 rpm und 37 °C im Thermomixer geschüttelt.

Selektion

200 µl der Bakterien wurden auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutkasten inkubiert. Am nächsten Tag waren einzelne Kolonien zu sehen. Das sollten nur Bakterien sein, die ein Plasmid aufgenommen haben, weil auf dem Plasmid eine Resistenz gegen Ampicillin verankert ist.

2.4.2 Plasmid Minipreparation und Testverdau

Plasmid Minipräparation

In diesem Versuch wurde für PLHV1, -2 und -3 jeweils ein sechsfacher Ansatz gemacht. In 18 Epprouvetten wurden 2,5 ml LB-Medium mit Ampicillin vorgelegt. Mit 200er Pipettenspitzen wurden Einzelkolonien von den über Nacht gewachsenen Bakterien von der Platte gepickt. Die Pipettenspitze wurde in eine der vorbereiteten Epprouvetten fallen gelassen. Die Epprouvetten wurden im Thermomixer vier Stunden bei 37 °C geschüttelt. Wenn Klone aufgepickt wurden und diese gewachsen sind, hat sich der Inhalt in dieser Zeit getrübt.

Für die Plasmidisolierung wurden 2 ml aus der Epprouvette in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gekippt. Es wurde 1 Minute bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt. Es wurden 200 µl Resuspendierungspuffer (50 mM Tris + 0,1 mg/ml RNase A, pH = 8) mit dem Multistepper zugegeben. Die Eppendorf Reaktionsgefäße wurden geratscht bis der Inhalt resuspendiert war. 200 µl Lyse-Puffer (0,2 M NaOH + 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)) wurden zugegeben.

Das Reaktionsgefäß wurde 5-6 Mal vorsichtig geschwenkt und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach den fünf Minuten wurden 200 µl Neutralisationspuffer (2,55 M KaAc, pH = 5,5) hinzupipettiert und das Reaktionsgefäß gut geschwenkt. Das Eppendorf Reaktionsgefäß wurde fünf Minuten bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. In neuen 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen wurden 500 µl Isopropanol vorgelegt. Nach dem Zentrifugieren wurde der gesamte Überstand vorsichtig und ohne weißen Niederschlag abgenommen und in das Reaktionsgefäß mit Isopropanol gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde gut geschwenkt und eine Minute bei 13000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt. 100 µl Ethanol wurden zum Pellet gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde eine Minute bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder mit der Vakuumpumpe abgesaugt. Das Pellet wurde drei Minuten bei 37 °C mit offenem Deckel in den Thermomixer gestellt, bis das Ethanol verdampft war. Es wurden 25 µl H₂O dazu gegeben und zehn Minuten bei 700 rpm im Thermomixer geschüttelt. Das Reaktionsgefäß wurde gevortext. Die Miniprep wurde bei -20 °C gelagert.

Testverdau der Minipräparation

Mastermix (x20):

- 145 µl H₂O dd
- 21,7 µl 10x Puffer NEB 3.1
- 4 µl Restriktionsenzym

Für PLHV-1 und -3 wurde das Restriktionsenzym EcoRI verwendet. Für PLHV-2 jeweils 2 µl von den Restriktionsenzymen NcoI und MluI.

Auf einer 96 Wellplatte wurden 8 µl Mastermix pro Well aufgetragen. Es wurden 2 µl Plasmid-DNA von der Miniprep dazugegeben und mit der Pipette gut durchgemischt. Die verwendeten Wells wurden mit Klebestreifen zugeklebt. Die Platte wurde für 45 Minuten bei 37 °C in die Wärmekammer gestellt. In der Zwischenzeit wurde das Agarosegel für die Gelelektrophorese gegossen.

Nach 45 Minuten wurde die Platte aus der Wärmekammer genommen. Es wurden mit dem Multistepper 2 µl Ladepuffer (Gel Loading Dye Purple (6x), BioLabs, Großbritannien) in jedes Well gegeben. 10 µl von jeder Probe wurden mit einer Pipette in eine Tasche auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde der 1kbp DNA-Leiter (Y014.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer (Mupid™-One, Nippon

Genetics Europe GmbH, Deutschland) 30 Minuten lang bei 100 V laufen gelassen. Das Gel wurde fotografiert (UVP BioImaging Systems, Kalifornien).

2.4.3 Plasmid Midipräparation und Testverdau

Die Proben, bei denen auf dem Gelfoto eine „Vektorbande“ bei ca. 3000 bp und eine „Insertbande“ bei ca. 700 bp zu sehen war, wurden zu Midis präpariert.

Von den Klonen, die in den Eprouvetten mit LB + Ampicillin Medium gewachsen sind, war noch ca. 0,5 ml übrig. Um Midis anzupflanzen wurde 1 µl von den Klonen in eine Glasflasche mit 50 ml LB-Medium gegeben. Die Flasche wurde über Nacht in den Brutschrank gestellt.

Am nächsten Tag war die Flüssigkeit trüb, wenn die Bakterien gewachsen sind.

Die Midis wurden mit dem FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN, Taiwan) präpariert:

- 15 ml Übernachtskultur in ein 50 ml Cap leeren
- 10 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugieren

Alkalische Lyse, Lyse der Bakterien, Neutralisierung des Lysats:

- Pellet in 400 µl FAPD1 Puffer (+Rnase A) resuspendieren durch Vortexen
- Inhalt in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführen
- 400 µl FAPD2 Puffer dazugeben, mischen durch invertieren 5-10 x
- 2-5 Minuten Inkubation
- 600 µl FAPD3 Puffer dazugeben und invertieren 5-10 x, dann zentrifugieren (5 Minuten, 18000 rpm)

Bindung der DNA:

- Beladen der Säule mit 700 µl Lysat, ohne weißen Niederschlag
- Zentrifugieren: 30 Sekunden, 18000 rpm
- Durchfluss abkippen
- Säule nochmals mit Lysat beladen
- Zentrifugieren: 30 Sekunden, 18000 rpm und Durchfluss abkippen

Waschen (2x):

- Waschen mit 400 µl W1 Puffer
- Zentrifugieren: 30 Sekunden, 18000 rpm

- Durchfluss abkippen
- Waschen mit 700 µl Wash Buffer (+ EtOH)
- Zentrifugieren: 30 Sekunden, 18000 rpm
- Durchfluss abkippen

Säule trocken zentrifugieren

- Säule leer zentrifugieren: 3 Minuten, 18000 rpm
- Trockene Säule auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß geben

Elution

- 100 µl dH₂O direkt auf die Matrix geben
- 1 Minute inkubieren
- Zentrifugieren: 1 Minute, 18000 rpm

Der Testverdau der Midipräparation wurde gleich durchgeführt, wie der Testverdau der Minipräparation.

3 Ergebnisse

3.1 Erstellung der Plasmidkontrollen

Die Plasmidkontrolle wurde benötigt, um daraus eine Verdünnungsreihe zu erstellen, mit welcher die qPCR validiert werden konnte. Es wurden dabei zuerst Amplifikate mittels konventioneller PCR erzeugt und diese wurden dann in einen pGemT Vektor kloniert (siehe Material und Methoden).

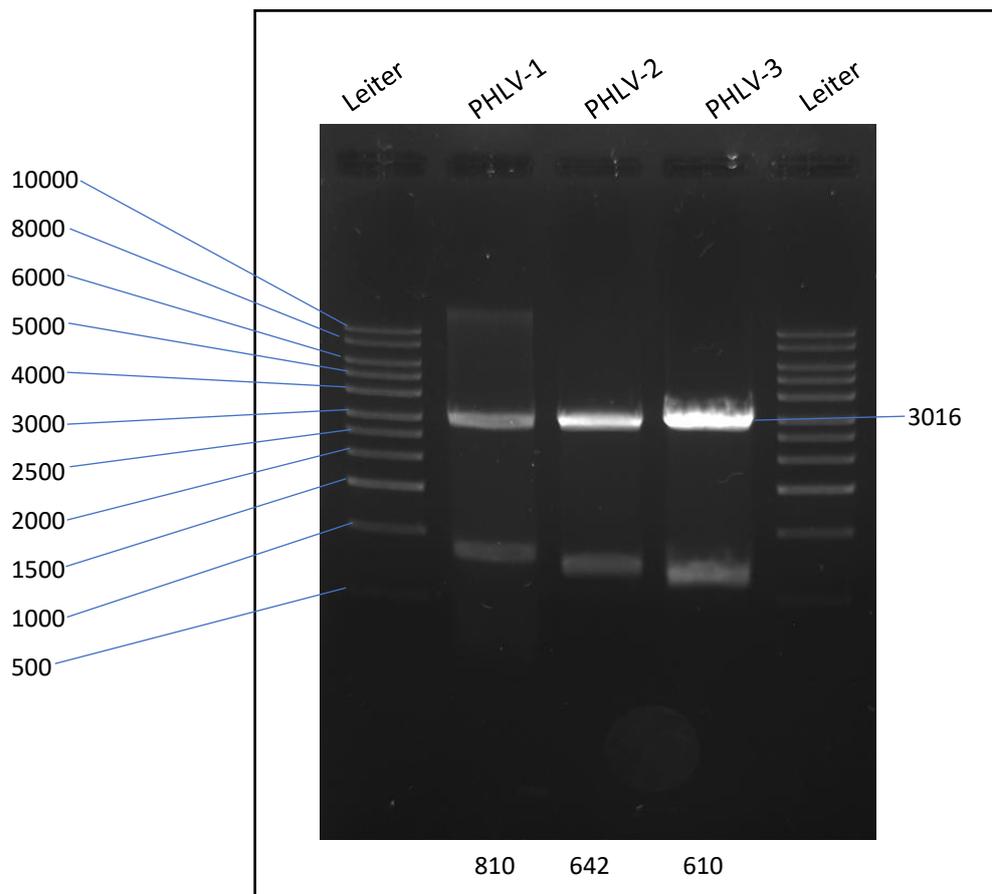


Abb. 1: Darstellung der klonierten PCR Fragmente durch Restriktionsverdau der Plasmide mit *EcoRI*. Rechts und links wurde derselbe Leiter verwendet (Beschriftung links in bp). Die erwarteten Fragmentgrößen sind unten, bzw. rechts in bp angegeben.

Die verwendeten Primer wurden vom Glykoprotein B Gen des Virus-Genoms abgeleitet. Dabei ergaben sich für die PLHV-spezifischen Abschnitte der Plasmide folgende Sequenzen:

Tab. 5: Sequenzen der PLHV spezifischen Abschnitte der generierten Plasmide von PLHV-1, -2 und 3 mit dem pGemT Vektor

PLHV-1 810nt	<p>GATCTGTTCTAGCACTGTGGTACCTGTATCAGGTGGCTCTTTATTCACCTTAGTATAGCAGAGACC GGTGTAACCTCACCTCCAAATACAGCGACCTGGTCTACTGAATCGCCGCTAACAGGTCACCTATG GAACACACGATTCAAGCCATGGTAAAAGAGGAAACAACGAAAACAGAGATTCCAGAAAGAGCAAAA TAAAACATTTATGGATCGCCTTCTACGTTTCCTTACAGAGTATGCAGTGCCTCCGGAGTTGGAG ATGTCTTTAGATTTACAGACCGACCATGTGTGTCCCGATGCCAGTGATATGGTACACAGTGAGGG GATTCTACTAATTTACAAACAGAACATTATCCATTTATGTTTAGAGTTAGGAAATATAGAAAAGTT GTTACAACAAGTACTGTCTACAATGGTATTTATTCTGACTCTATTACCAACCAACATACTTTCTATA AATCAATCGAACCTTGGGAGACAGAAAAGATGGACACAATATATCAGTGTTTTAATTCCTTTAAGAC TAAACACAGGTGGAAATCTGCTTACTTATGTAGATAGAGATGATATAAATATGACAGTGTCTTCTGC AACCTGTTGACGGTGTGACGCCCGATGTGAAGAGGTATGGCAGTCAACCAGAGCTGTACCTTGA ACCTGGCTGGTTTTGGGGTAGTTATAGAAGACGAACACGAGTACGGTGAACATAATGGACATG TTTGAAGATCAAATCCTCCATTTGATTTCTTTGTTACAGCTACAGGTGATACGGTGGAAATGTCT CCATTTTGGAGTGGTGAAGATGATCATG</p>										
	<p>Porcine lymphotropic herpesvirus 1 isolate GD33 envelope glycoprotein B gene, complete cds Sequence ID: KT844939.1 Length: 2631 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 59 to 868 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" data-bbox="391 840 1276 907"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1491 bits(807)</td> <td>0.0</td> <td>809/810(99%)</td> <td>0/810(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 1 GATCTGTTCTAGCACTGTGGTACCTGTATCAGGTGGCTCTTTATTCACCTTAGTATAGCAG 60 Sbjct 59 GATCTGTTCTAGCACTGTGGTACCTGTATCAGGTGGCTCTTTATTCACCTTAGTATAGCAG 118</p> <p>Query 61 AGACCGGTGTAACCTCACCTCCAAATACAGCGACCTGGTCTACTGAATCGCCGCTAACAG 120 Sbjct 119 AGACCGGTGTAACCTCACCTCCAAATACAGCGACCTGGTCTACTGAATCGCCGCTAACAG 178</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	1491 bits(807)	0.0	809/810(99%)	0/810(0%)	Plus/Plus
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand							
1491 bits(807)	0.0	809/810(99%)	0/810(0%)	Plus/Plus							
	<p>Dies ist ein Ausschnitt aus der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Analyse der Nukleotidsequenz des PLHV-1 spezifischen Inserts des generierten Plasmids. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Sequenz auf dem Glykoprotein B Gen des PLHV-1 liegt. Position: 59-868bp bezogen auf die Glykoprotein B-Sequenz von KT844939. Die zur Amplifikation verwendeten Primerbindungssequenzen sind unterstrichen.</p>										
PLHV-2 642nt	<p>GCAGGTAGCTTAAAACCTTAGGCGGCTTGCTCTGGCACTGTGGTGCCAGTTTCAAGTAGCTC TCTATGCGCTTAGCTAAAGCGAGAGCAAAAGCGCAACGTCACCTGCCAATACACAGGCCTGGTC TACTGAAGCGCTGCCAATAGGTCAATATGGAACATACGATTCAAGCCACGGTGAAGAGCAACC AGCGAAAACAGAGATGAAGAAGAGCATAATAAAAAATATTTATGGATCGCCTTCTACGTTTCCTTA CAGAGTATGCAGTGCTCCGGAGTTGGAGATATCTTTAGATTTACAGACCGACCATGTGTGTCCC GATGCCAGTGATATGGTACACAGCGAGGGAATTCTCCTAATTTACAAACAGAATCATTCCATT TATGTTTAGAGTTAGGAAATATAGAAAAGTTGTGACAACAAGTACTGTGTACAATGGTATTTATTC TGATTCTATTACCAATCAACATACTTTCTATAAAGTCCATCGAACCTTGGGAAACTGAAAAGATGGA CACTATATATCAGTGTTTTAATTCCTTAAGACTAAACACAGGTGGCAATCTTCTTACTTATGTAGA TAGAGATGATATAAATATGACAGTGTCTGCAACCTGTTGATGGTGTGACCCCGATATGAAG</p>										
	<p>Porcine lymphotropic herpesvirus 2 isolate GD27 envelope glycoprotein B gene, complete cds Sequence ID: KT844938.1 Length: 2631 Number of Matches: 1</p> <p>Range 1: 37 to 678 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match</p> <table border="1" data-bbox="391 1758 1276 1825"> <thead> <tr> <th>Score</th> <th>Expect</th> <th>Identities</th> <th>Gaps</th> <th>Strand</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1149 bits(622)</td> <td>0.0</td> <td>638/645(99%)</td> <td>3/645(0%)</td> <td>Plus/Plus</td> </tr> </tbody> </table> <p>Query 1 GCAGGTAGCTTAAAACCTTAGGCGGCTTGCTCTGGCACTGTGGTGCCAGTTTCAAGTAGCT 60 Sbjct 37 GCAGGTAGCTTAAAACCTTAGGCGGCTTGCTCTGGCACTGTGGTGCCAGTTTCAAGTAGCT 96</p>	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	1149 bits(622)	0.0	638/645(99%)	3/645(0%)	Plus/Plus
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand							
1149 bits(622)	0.0	638/645(99%)	3/645(0%)	Plus/Plus							

Dies ist ein Ausschnitt aus der BLAST-Analyse der Nukleotidsequenz des PLHV-2 spezifischen Inserts des generierten Plasmids. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Sequenz auf dem Glykoprotein B Gen des PLHV-2 liegt. Position: 37-678bp bezogen auf die Glykoprotein B-Sequenz von KT844938. Die zur Amplifikation verwendeten Primerbindungssequenzen sind unterstrichen.

**PLHV-3
611nt**

GCTGTGGTCAAGTGTTATGGATGCTGTTTTCAGGTAATGTTCTACTTTGCCGTATATGGGCAATAT
ATTACTACAGGGCCTACGATGGAAATGTAAATACGGAAGAATCTGAAGTTACCAACCATGAGTA
CAATTACACGGATGCCAATACAACAGCGCCAGAAAAAAGGACCCCAAAGAGGAAAAATCAATTTT
ATGGTTCACCTTCTACCTTTCCTTACAGAGTATGCAGTGCCTCAGGAGTTGGCGATATTTTAGA
TTTCAAACCGAACATAAGTGTCCGGATACCAATGATATGGTACACAATGAGGGTATTTTATTGATT
TACAAGCAGAATATTGTTCCATTTATGTTTAGAGTGAGAAAAATAGAAAAGTTGTGACAACAAGT
ACGGTGTACAATGGAATATACTCTGACTCTGTCACTAATCAGCATAACATTCTACAAATCTATAGCC
ACGTGGGAGACGGAAAAGATGGATACTGTATATCAATGTTTTAATTCTCTAAAGCTTAATGTAGG
CAACAATCTACTAACTTATGTGGATCGGGATGACATCAATATGACCGTGTTTTTTGAACCCAGTGG
ATGGAGTACCCACAGATGTGAAG

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Porcine lymphotropic herpesvirus 3 isolate 489 long unique region, partial sequence

Sequence ID: [AY170316.1](#) Length: 60326 Number of Matches: 1

Range 1: 11828 to 12438 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1129 bits(611)	0.0	611/611(100%)	0/611(0%)	Plus/Plus
Query 1		GCTGTGGTCAAGTGTTATGGATGCTGTTTTCAGGTAATGTTCTACTTTGCCGTATATGGGC		60
Sbjct 11828		GCTGTGGTCAAGTGTTATGGATGCTGTTTTCAGGTAATGTTCTACTTTGCCGTATATGGGC		11887
Query 61		AATATATTACTACAGGGCCTACGATGGAAATGTAAATACGGAAGAATCTGAAGTTACCA		120
Sbjct 11888		AATATATTACTACAGGGCCTACGATGGAAATGTAAATACGGAAGAATCTGAAGTTACCA		11947

Die ist ein Ausschnitt aus der BLAST-Analyse der Nukleotidsequenz des PLHV-3 spezifischen Inserts des generierten Plasmids. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Sequenz auf der "489 long unique region" des PLHV-3 liegt, welche Teil des Glykoprotein B Gens ist. Position: 59-669bp bezogen auf die Glykoprotein B-Sequenz von AY170316. Die zur Amplifikation verwendeten Primerbindungssequenzen sind unterstrichen.

3.1.1 Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in den Plasmidpräparationen wurde mit dem Quantus™ Fluorometer (Promega GmbH, Wisconsin) bestimmt. Folgende Konzentrationen wurden ermittelt:

pPLHV-1: 76 ng/µl

pPLHV-2: 58 ng/µl

pPLHV-3: 205 ng/ μ l

3.2 Validierung der qPCR

Um die qPCR-Ergebnisse der drei Plasmide besser vergleichen zu können, wurden pPLHV-1 und pPLHV-3 auf dieselbe Konzentration wie pPLHV-2 (58 ng/μl) eingestellt.

Zuerst wurde von allen drei Plasmide eine 10⁻¹-Verdünnung in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß hergestellt. Ausgehend von 10⁻¹-Verdünnung wurden die Konzentrationen an pPLHV-2 (5,8ng/μl) angepasst.

- ➔ pPLHV-1: 79,8 μl 10⁻¹-Verdünnung + 20,2 μl RNase-freies H₂O = 100 μl (5,8 ng/μl)
- ➔ pPLHV-3: 28,1 μl 10⁻¹-Verdünnung + 71,9 μl RNase-freies H₂O = 100 μl (5,8 ng/μl)

Es wurde jeweils eine 10er Verdünnungsreihe der Plasmide bis 10⁻¹⁰ erzeugt. Die Verdünnungsreihen wurden von 10⁻³ bis 10⁻¹⁰ mittels qPCR (Rotor-Gene Q, Quiagen, Niederlande) im doppelten Ansatz getestet. Zusätzlich sind als Negativkontrollen und Spezifitätskontrollen die 10⁻⁷-, 10⁻⁸- und 10⁻⁹- Verdünnung der jeweils anderen beiden Viren und eine no template control (NTC) mitgelaufen.

Die 10⁻¹-Verdünnung aller drei Viren hatte eine Konzentration von 5,8 ng/μl. Daraus wurden die Kopien pro μl des Extraktes bestimmt. Bei einer Verdünnung von 10⁻¹ wurden 1,46 x 10⁹ GE/μl berechnet. Diese Berechnung wurde auf die weiteren Verdünnungen der Verdünnungsreihen übertragen und als Standards in das Programm der qPCR eingetragen. So konnte eine absolute Quantifizierung der Verdünnungsreihen durchgeführt werden.

PLHV-1:

Tab. 6: Quantifizierungsinformationen der qPCR – PLHV-1

Threshold	0,0044
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10 [^] (-0,302*CT + 10,810)
Standard Curve (2)	CT = -3,316*log(conc) + 35,847
Reaction efficiency (*)	(* = 10 [^] (-1/m) - 1) 1,0025
M	-3,31594
B	35,84698
R Value	0,99758

R ² Value	0,99517
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

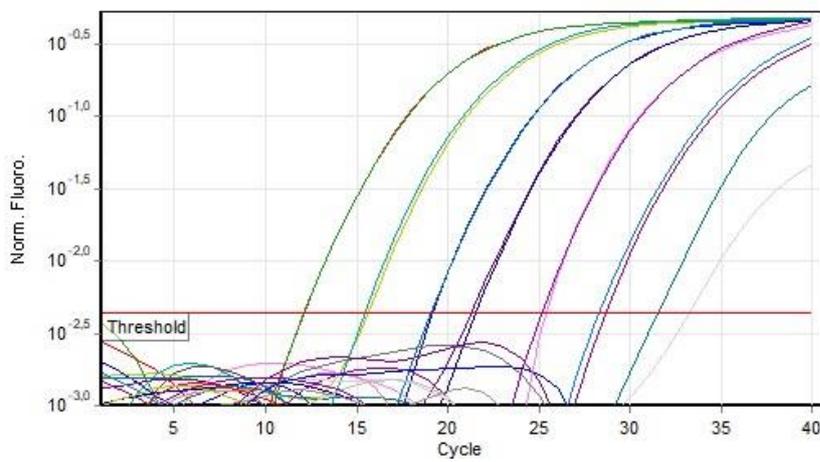


Abb. 2: Fluoreszenzsignal abhängig vom Zyklus – Verdünnungsreihe PLHV-1

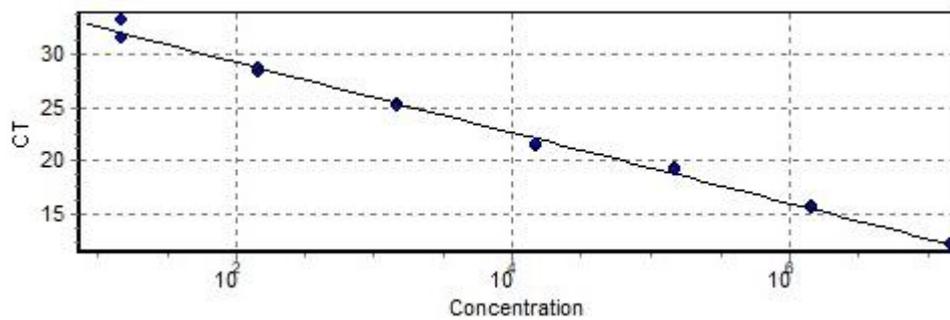


Abb. 3: Standardkurve – Verdünnungsreihe PLHV-1

Tab. 7: Ct-Wert, gegebene Konzentration und berechnete Konzentration (GE/ μ l) der Verdünnungsreihe – PLHV 1

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (GE/ μ l)	Calc Conc (GE/ μ l)
1		PLHV1 10-3	Standard	12,14	1,46E+07	1,41E+07
2		PLHV1 10-4	Standard	15,59	1,46E+06	1,28E+06
3		PLHV1 10-5	Standard	19,17	1,46E+05	1,07E+05
4		PLHV1 10-6	Standard	21,32	1,46E+04	2,40E+04
5		PLHV1 10-7	Standard	25,34	1,46E+03	1,47E+03
6		PLHV1 10-8	Standard	28,3	1,46E+02	1,89E+02
7		PLHV1 10-9	Standard	31,54	1,46E+01	2,00E+01
8		PLHV1 10-10	Standard		1,46E+00	
9		PLHV1 10-3	Standard	12,1	1,46E+07	1,45E+07
55		PLHV1 10-4	Standard	15,4	1,46E+06	1,47E+06
56		PLHV1 10-5	Standard	19,07	1,46E+05	1,15E+05
57		PLHV1 10-6	Standard	21,55	1,46E+04	2,05E+04
58		PLHV1 10-7	Standard	25,13	1,46E+03	1,71E+03
59		PLHV1 10-8	Standard	28,67	1,46E+02	1,46E+02
60		PLHV1 10-9	Standard	33,21	1,46E+01	6,26E+00
61		PLHV1 10-10	Standard		1,46E+00	
62		PLHV2 10-7	Probe			
63		PLHV2 10-8	Probe			
64		PLHV2 10-9	Probe			
65		PLHV3 10-7	Probe			
66		PLHV3 10-8	Probe			
67		PLHV3 10-9	Probe			
68		ntc	NTC			

Alle Verdünnungen bis inklusive der 10^{-9} - Verdünnung sind positiv getestet worden. Die 10^{-10} -Verdünnung war in beiden Ansätzen negativ. In der 10^{-9} -Verdünnung sind 14,6 GE/ μ l enthalten. Da in der qPCR beide Ansätze der 10^{-9} -Verdünnung positiv getestet wurden, wurde als untere Nachweisgrenze eine Konzentration von 10 GE/ μ l festgelegt. Die Negativkontrollen und die NTC wurden negativ getestet. Aus Tabelle 6 kann die Effizienz, der M-, R- und R²-Wert abgelesen werden.

PLHV-2

Tab. 8: Quantifizierungsinformationen der qPCR – PLHV-2

Threshold	0,0344
-----------	--------

Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,328 \cdot \text{CT} + 12,159)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -3,048 \cdot \log(\text{conc}) + 37,060$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1) 1,12857$
M	-3,04796
B	37,06011
R Value	0,99796
R^2 Value	0,99593
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

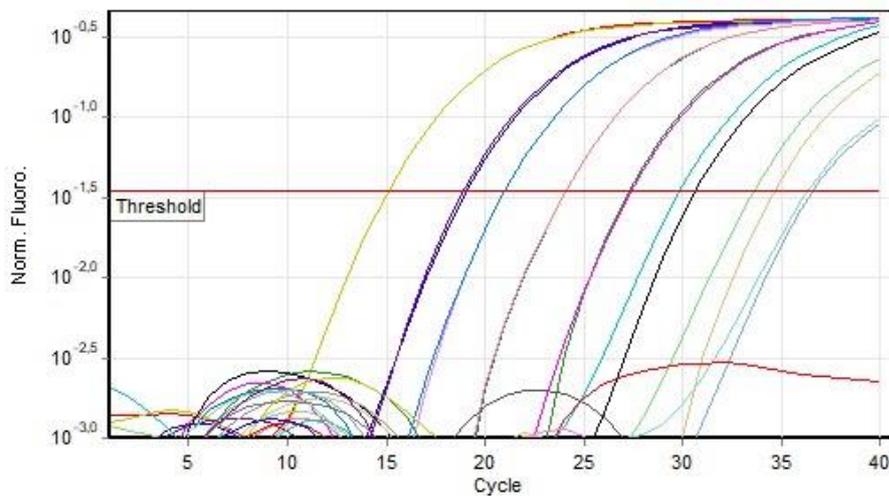


Abb. 4: Fluoreszenzsignal abhängig von Zyklus – Verdünnungsreihe PLHV-2

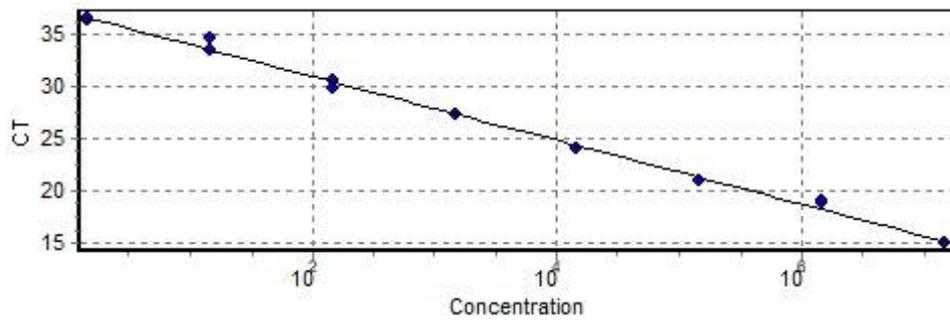


Abb. 5: Standardkurve – Verdünnungsreihe PLHV-2

Tab. 9: Ct-Wert, gegebene Konzentration und berechnete Konzentration (GE/ul) der Verdünnungsreihe – PLHV 2

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (GE/ul)	Calc Conc (GE/ul)
1	Red	PLHV2 10-3	Standard	15,07	1,46E+07	1,63E+07
2	Yellow	PLHV2 10-3	Standard	15,07	1,46E+07	1,64E+07
3	Blue	PLHV2 10-4	Standard	19,05	1,46E+06	8,10E+05
4	Purple	PLHV2 10-4	Standard	18,88	1,46E+06	9,21E+05
5	Pink	PLHV2 10-5	Standard	20,98	1,46E+05	1,88E+05
6	Cyan	PLHV2 10-5	Standard	21	1,46E+05	1,85E+05
7	Teal	PLHV2 10-6	Standard	24,04	1,46E+04	1,86E+04
8	Light Red	PLHV2 10-6	Standard	24,04	1,46E+04	1,87E+04
9	Green	PLHV2 10-7	Standard	27,26	1,46E+03	1,64E+03
10	Magenta	PLHV2 10-7	Standard	27,38	1,46E+03	1,49E+03
11	Black	PLHV2 10-8	Standard	30,62	1,46E+02	1,30E+02
12	Cyan	PLHV2 10-8	Standard	29,83	1,46E+02	2,35E+02
13	Gold	PLHV2 10-9	Standard	34,62	1,46E+01	6,34E+00
14	Light Green	PLHV2 10-9	Standard	33,55	1,46E+01	1,42E+01
15	Light Cyan	PLHV2 10-10	Standard	36,3	1,46E+00	1,77E+00
16	Light Blue	PLHV2 10-10	Standard	36,55	1,46E+00	1,47E+00
62	Grey	PLHV1 10-7	Probe			
63	Grey	PLHV1 10-8	Probe			
64	Grey	PLHV1 10-9	Probe			
65	Red	PLHV3 10-7	Probe			
66	Yellow	PLHV3 10-8	Probe			
67	Blue	PLHV3 10-9	Probe			
68	Pink	ntc	NTC			

Alle Verdünnungen bis inklusive der 10^{-10} -Verdünnung konnten mittels qPCR nachgewiesen werden. Laut Berechnung befindet sich bei einer Verdünnung von 10^{-10} eine Kopie in einem μl . Deshalb ist es Zufall, ob bei einer Verdünnung von 10^{-10} in dem Mikroliter, den man für die qPCR entnimmt, Kopien enthalten sind oder nicht. Außerdem ist der Ct-Wert über 35 und somit sehr hoch. Deshalb wurde als untere Nachweisgrenze für PLHV-2 ebenfalls eine Konzentration von 10 GE/ μl festgelegt. Die Negativkontrollen (Verdünnungen von PLHV-1, und -3) und die NTC waren negativ. Diese qPCR ist also sehr spezifisch für PLHV-2.

PLHV-3

Tab. 10: Quantifizierungsinformationen der qPCR – PLHV-3

Threshold	0,080
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0,296*CT + 12,382)}$
Standard Curve (2)	CT = $-3,373*\log(\text{conc}) + 41,766$
Reaction efficiency (*)	(* = $10^{(-1/m) - 1}$) 0,97903
M	-3,37323
B	41,76597
R Value	0,99081
R^2 Value	0,98171
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

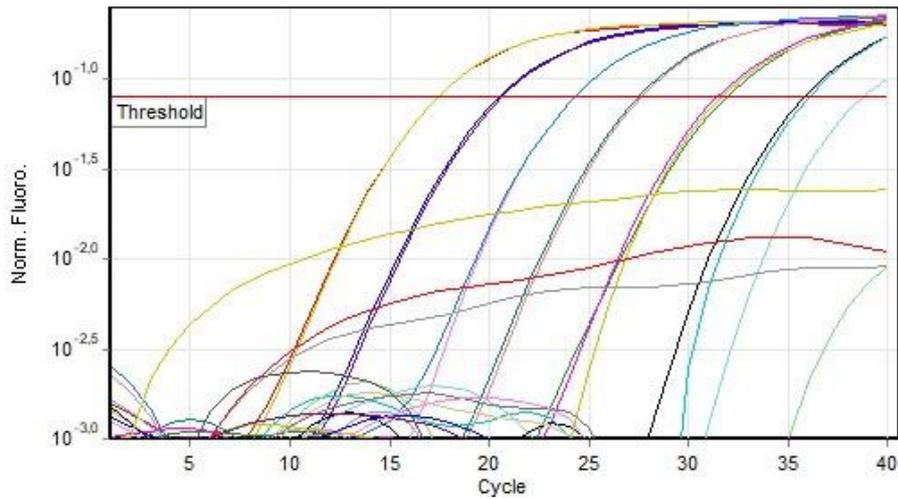


Abb. 6: Fluoreszenzsignal abhängig vom Zyklus – Verdünnungsreihe PLHV-3

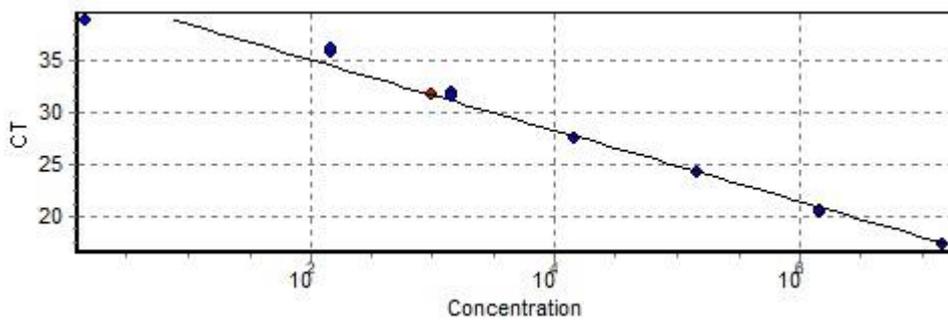


Abb. 7: Standardkurve – Verdünnungsreihe PLHV-3

Tab. 11: Ct-Wert, gegebene Konzentration und berechnete Konzentration (GE/μl) der Verdünnungsreihe – PLHV 3

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (GE/ul)	Calc Conc (GE/ul)
1	Red	PLHV3 10-3	Standard	17,42	1,46E+07	1,65E+07
2	Yellow	PLHV3 10-3	Standard	17,42	1,46E+07	1,65E+07
3	Blue	PLHV3 10-4	Standard	20,52	1,46E+06	1,99E+06
4	Purple	PLHV3 10-4	Standard	20,66	1,46E+06	1,80E+06
5	Pink	PLHV3 10-5	Standard	24,27	1,46E+05	1,54E+05
6	Light Blue	PLHV3 10-5	Standard	24,28	1,46E+05	1,53E+05
7	Teal	PLHV3 10-6	Standard	27,48	1,46E+04	1,72E+04
8	Light Red	PLHV3 10-6	Standard	27,6	1,46E+04	1,58E+04
9	Green	PLHV3 10-7	Standard	31,87	1,46E+03	8,60E+02
10	Magenta	PLHV3 10-7	Standard	31,46	1,46E+03	1,14E+03
11	Black	PLHV3 10-8	Standard	35,8	1,46E+02	5,87E+01

12		PLHV3 10-8	Standard	36,05	1,46E+02	4,96E+01
13		PLHV3 10-9	Standard		1,46E+01	
14		PLHV3 10-9	Standard		1,46E+01	
15		PLHV3 10-10	Standard	38,78	1,46E+00	7,68E+00
16		PLHV3 10-10	Standard		1,46E+00	
62		PLHV1 10-7	Probe			
63		PLHV1 10-8	Probe			
64		PLHV1 10-9	Probe			
65		PLHV2 10-7	Probe			
66		PLHV2 10-8	Probe			
67		PLHV2 10-9	Probe			
68		ntc	NTC			

Die Verdünnungen bis inklusive 10^{-8} wurden im Doppelansatz positiv getestet. Die Ansätze der 10^{-9} -Verdünnung waren beide negativ. Von der 10^{-10} -Verdünnung war ein Ansatz positiv und einer negativ. Als untere Nachweisgrenze von PLHV-3 wurde eine Konzentration von 100 GE/ μ l festgelegt. Die Negativkontrollen (Verdünnungen von PLHV-1, und -2) und die NTC konnten negativ getestet werden.

3.3 PLHV Nachweis in Wildschweinproben

Die oben beschriebene Methode wurde an realem Probenmaterial weiter getestet. Dazu dienten Proben von 45 Wildschweinen, die im Zuge einer Gatterjagd im Burgenland erlegt und über das FiWi (Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) beprobt wurden. Alle Tiere wurden in getrennten qPCRs auf PLHV-1, PLHV-2, und PLHV-3 getestet. Bei jeder qPCR wurde der entsprechende Plasmidstandard in den Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-10} , eine NTC, eine negative Extraktionskontrolle sowie Verdünnungen (10^{-7} - bis 10^{-9}) der jeweils anderen beiden Plasmidstandards angesetzt.

3.3.1 Nachweis PLHV-1

Tab. 12: Name, Ct-Wert und berechnete GE/ μ l im Extrakt – PLHV 1

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (GE/ μ l)	GE/ μ l im Extrakt
1		PLHV1 10-3	Standard	14,63	1,46E+07	1,25E+07
2		PLHV1 10-4	Standard	18,04	1,46E+06	1,25E+06

3		PLHV1 10-5	Standard	21,55	1,46E+05	1,16E+05
4		PLHV1 10-6	Standard	23,89	1,46E+04	2,38E+04
5		PLHV1 10-7	Standard	27,51	1,46E+03	2,07E+03
6		PLHV1 10-8	Standard	30,92	1,46E+02	2,05E+02
7		PLHV1 10-9	Standard	34,29	1,46E+01	2,10E+01
8		PLHV1 10-10	Standard		1,46E+00	
9		PLHV1 10-3	Standard	14,66	1,46E+07	1,23E+07
10		PLHV1 10-4	Standard	17,79	1,46E+06	1,48E+06
11		PLHV1 10-5	Standard	21,6	1,46E+05	1,12E+05
12		PLHV1 10-6	Standard	23,98	1,46E+04	2,25E+04
13		PLHV1 10-7	Standard	27,55	1,46E+03	2,00E+03
14		PLHV1 10-8	Standard	31,2	1,46E+02	1,70E+02
15		PLHV1 10-9	Standard	37,03	1,46E+01	3,29E+00
16		PLHV1 10-10	Standard		1,46E+00	
17		1489/20	Probe			
18		1490/20	Probe			
19		1491/20	Probe			
20		1492/20	Probe			
21		1493/20	Probe			
22		1494/20	Probe			
23		1495/20	Probe			
24		1496/20	Probe	27,79		1,71E+03
25		1497/20	Probe	30,14		3,49E+02
26		1498/20	Probe			
27		1499/20	Probe			
28		1500/20	Probe			
29		1501/20	Probe	31,34		1,54E+02
30		1502/20	Probe			
31		1503/20	Probe	27,92		1,57E+03
32		1504/20	Probe			
33		1505/20	Probe			
34		1506/20	Probe			
35		1507/20	Probe			
36		1508/20	Probe			
37		1509/20	Probe			
38		1510/20	Probe	32,07		9,44E+01
39		1511/20	Probe			
40		1512/20	Probe			

41		1513/20	Probe			
42		1514/20	Probe			
43		1515/20	Probe			
44		1516/20	Probe			
45		1517/20	Probe	25,5		8,01E+03
46		1518/20	Probe			
47		1519/20	Probe			
48		1520/20	Probe			
49		1521/20	Probe			
50		1522/20	Probe			
51		1523/20	Probe			
52		1524/20	Probe			
53		1525/20	Probe			
54		1526/20	Probe			
55		1527/20	Probe			
56		1528/20	Probe			
57		1529/20	Probe			
58		1530/20	Probe			
59		1531/20	Probe	30,6		2,55E+02
60		1532/20	Probe	36		6,59E+00
61		1533/20	Probe			
62		PLHV2 10-7	Probe			
63		PLHV2 10-8	Probe			
64		PLHV2 10-9	Probe			
65		PLHV3 10-7	Probe			
66		PLHV3 10-8	Probe			
67		PLHV3 10-9	Probe			
68		ntc	NTC			
69		neg Ko	Negative Control			

Da als untere Nachweisgrenze eine Konzentration von 10 GE/ μ l festgelegt wurde, kann die Probe 1532/20 nicht als positiv gewertet werden. Das PLHV-1 konnte in sieben der 45 getesteten Proben nachgewiesen werden.

3.3.2 Nachweis PLHV-2

Tab. 13: Name, Ct-Wert und berechnete GE/ μ l im Extrakt – PLHV 2

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (GE/ μ l)	GE/ μ l im Extrakt
1		PLHV2 10-3	Standard	15,07	1,46E+07	1,63E+07
2		PLHV2 10-3	Standard	15,07	1,46E+07	1,64E+07
3		PLHV2 10-4	Standard	19,05	1,46E+06	8,10E+05
4		PLHV2 10-4	Standard	18,88	1,46E+06	9,21E+05
5		PLHV2 10-5	Standard	20,98	1,46E+05	1,88E+05
6		PLHV2 10-5	Standard	21	1,46E+05	1,85E+05
7		PLHV2 10-6	Standard	24,04	1,46E+04	1,86E+04
8		PLHV2 10-6	Standard	24,04	1,46E+04	1,87E+04
9		PLHV2 10-7	Standard	27,26	1,46E+03	1,64E+03
10		PLHV2 10-7	Standard	27,38	1,46E+03	1,49E+03
11		PLHV2 10-8	Standard	30,62	1,46E+02	1,30E+02
12		PLHV2 10-8	Standard	29,83	1,46E+02	2,35E+02
13		PLHV2 10-9	Standard	34,62	1,46E+01	6,34E+00
14		PLHV2 10-9	Standard	33,55	1,46E+01	1,42E+01
15		PLHV2 10-10	Standard	36,3	1,46E+00	1,77E+00
16		PLHV2 10-10	Standard	36,55	1,46E+00	1,47E+00
17		1489/20	Probe	34,87		5,25E+00
18		1490/20	Probe	30,8		1,13E+02
19		1491/20	Probe	32,16		4,05E+01
20		1492/20	Probe			
21		1493/20	Probe	30,84		1,10E+02
22		1494/20	Probe	32,94		2,24E+01
23		1495/20	Probe	29,58		2,84E+02
24		1496/20	Probe	32,22		3,86E+01
25		1497/20	Probe	33,06		2,06E+01
26		1498/20	Probe	32,16		4,05E+01
27		1499/20	Probe	32,36		3,47E+01
28		1500/20	Probe	31,39		7,25E+01
29		1501/20	Probe			
30		1502/20	Probe	28,63		5,83E+02
31		1503/20	Probe	35,79		2,61E+00
32		1504/20	Probe	33,68		1,29E+01

33		1505/20	Probe	30,95		1,01E+02
34		1506/20	Probe	29,03		4,31E+02
35		1507/20	Probe	35,58		3,06E+00
36		1508/20	Probe	30,42		1,50E+02
37		1509/20	Probe	33,36		1,64E+01
38		1510/20	Probe	32,17		4,03E+01
39		1511/20	Probe	30,23		1,74E+02
40		1512/20	Probe	29,17		3,89E+02
41		1513/20	Probe	27,43		1,44E+03
42		1514/20	Probe	32,33		3,56E+01
43		1515/20	Probe	30,02		2,04E+02
44		1516/20	Probe	31,34		7,51E+01
45		1517/20	Probe			
46		1518/20	Probe	28,86		4,89E+02
47		1519/20	Probe	37		1,05E+00
48		1520/20	Probe	34,13		9,14E+00
49		1521/20	Probe	33,6		1,36E+01
50		1522/20	Probe	31,05		9,40E+01
51		1523/20	Probe	30,63		1,29E+02
52		1524/20	Probe	33,35		1,65E+01
53		1525/20	Probe	33,28		1,74E+01
54		1526/20	Probe			
55		1527/20	Probe			
56		1528/20	Probe	32,27		3,72E+01
57		1529/20	Probe	29,42		3,22E+02
58		1530/20	Probe	32,77		2,56E+01
59		1531/20	Probe			
60		1532/20	Probe	28,43		6,79E+02
61		1533/20	Probe	31,96		4,71E+01
62		PLHV1 10-7	Probe			
63		PLHV1 10-8	Probe			
64		PLHV1 10-9	Probe			
65		PLHV3 10-7	Probe			
66		PLHV3 10-8	Probe			
67		PLHV3 10-9	Probe			
68		neg Ko	Probe			
69		ntc	Negative Control			

Als untere Nachweisgrenze wurde eine Konzentration von 10 GE/ μ l im Extrakt festgelegt. Deshalb werden die Proben 1489/20, 1503/20, 1507/20 und 1519/20 und 1520/20 als „nicht nachweisbar“ gezählt. Es wurden 34 von 45 Wildschweinen positiv auf PLHV-2 getestet.

3.3.3 Nachweis PLHV-3

Tab. 14: Name, Ct-Wert und berechnete GE/ μ l im Extrakt – PLHV 3

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (GE/ μ l)	GE/ μ l im Extrakt
1		PLHV3 10-3	Standard	17,42	1,46E+07	1,65E+07
2		PLHV3 10-3	Standard	17,42	1,46E+07	1,65E+07
3		PLHV3 10-4	Standard	20,52	1,46E+06	1,99E+06
4		PLHV3 10-4	Standard	20,66	1,46E+06	1,80E+06
5		PLHV3 10-5	Standard	24,27	1,46E+05	1,54E+05
6		PLHV3 10-5	Standard	24,28	1,46E+05	1,53E+05
7		PLHV3 10-6	Standard	27,48	1,46E+04	1,72E+04
8		PLHV3 10-6	Standard	27,6	1,46E+04	1,58E+04
9		PLHV3 10-7	Standard	31,87	1,46E+03	8,60E+02
10		PLHV3 10-7	Standard	31,46	1,46E+03	1,14E+03
11		PLHV3 10-8	Standard	35,8	1,46E+02	5,87E+01
12		PLHV3 10-8	Standard	36,05	1,46E+02	4,96E+01
13		PLHV3 10-9	Standard		1,46E+01	
14		PLHV3 10-9	Standard		1,46E+01	
15		PLHV3 10-10	Standard	38,78	1,46E+00	7,68E+00
16		PLHV3 10-10	Standard		1,46E+00	
17		1489/20	Probe			
18		1490/20	Probe	34,4		1,53E+02
19		1491/20	Probe			
20		1492/20	Probe	37,7		1,61E+01
21		1493/20	Probe	32,57		5,31E+02
22		1494/20	Probe	33,6		2,64E+02
23		1495/20	Probe	32,7		4,88E+02
24		1496/20	Probe	30,15		2,77E+03
25		1497/20	Probe	32,63		5,13E+02
26		1498/20	Probe	29,78		3,58E+03
27		1499/20	Probe	33,89		2,17E+02

28		1500/20	Probe	30,74		1,85E+03
29		1501/20	Probe	31,18		1,38E+03
30		1502/20	Probe	32,19		6,88E+02
31		1503/20	Probe			
32		1504/20	Probe	35,83		5,73E+01
33		1505/20	Probe	35,28		8,35E+01
34		1506/20	Probe	31,66		9,88E+02
35		1507/20	Probe			
36		1508/20	Probe	34,17		1,79E+02
37		1509/20	Probe	32,32		6,31E+02
38		1510/20	Probe	32,14		7,13E+02
39		1511/20	Probe			
40		1512/20	Probe			
41		1513/20	Probe	32,1		7,34E+02
42		1514/20	Probe	28,02		1,19E+04
43		1515/20	Probe	32,43		5,86E+02
44		1516/20	Probe	29,58		4,10E+03
45		1517/20	Probe	28,62		7,90E+03
46		1518/20	Probe	38,03		1,28E+01
47		1519/20	Probe	34,27		1,66E+02
48		1520/20	Probe	35,45		7,45E+01
49		1521/20	Probe	30,37		2,38E+03
50		1522/20	Probe	31,88		8,53E+02
51		1523/20	Probe	35,22		8,74E+01
52		1524/20	Probe			
53		1525/20	Probe	33,98		2,03E+02
54		1526/20	Probe	35,97		5,21E+01
55		1527/20	Probe	35,54		7,02E+01
56		1528/20	Probe	38,86		7,27E+00
57		1529/20	Probe			
58		1530/20	Probe	35,81		5,85E+01
59		1531/20	Probe			
60		1532/20	Probe	34,15		1,81E+02
61		1533/20	Probe	29,91		3,26E+03
62		PLHV1 10-7	Probe			
63		PLHV1 10-8	Probe			
64		PLHV1 10-9	Probe			

65		PLHV2 10-7	Probe			
66		PLHV2 10-8	Probe			
67		PLHV2 10-9	Probe			
68		neg Ko	Negative Control			
69		ntc	NTC			

Als untere Nachweisgrenze wurde eine Konzentration von 100 GE/ μ l festgelegt. Somit sind die Proben 1492/20, 1504/20, 1505/20, 1518/20, 1520/20, 1523/20, 1526/20, 1527/20, 1528/20 und 1530/20 auch als „nicht nachweisbar“ befundet. Die Kurve des Fluoreszenzsignals der Probe 1511/20 war von ihrer Form ähnlich der Kurven der Standards. Sie blieb aber unterhalb der gesetzten Schwelle und konnte daher nicht eindeutig interpretiert werden. Dieser Ansatz wurde in einer neuen qPCR wiederholt.

Tab. 15: Wiederholung der Testung auf PLHV-3 der Probe 1511/20

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (GE/ μ l)	GE/ μ l im Extrakt
1		PLHV3 10-5	Standard	22,01	1,46E+05	1,46E+05
2		PLHV3 10-6	Standard	25,1	1,46E+04	1,46E+04
3		1511/20	Probe	28,71		9,91E+02
4		1511/20	Probe	28,42		1,23E+03
5		neg Ko	Negative Control			
6		ntc	NTC			

In der Wiederholung der qPCR konnte die Probe 1511/20 im Doppelansatz eindeutig positiv getestet werden. Damit wurden 27 von 45 Wildschweinen positiv auf PLHV-3 getestet.

3.4 Vergleich der Viruslast

Die von der Analyse Software (Qiagen, Deutschland) ermittelten Konzentrationen der GE pro μ l der Extraktion wurden mit dem Faktor 500 multipliziert, um die Viruskonzentration in GE/ml Tupfer- und Gewebelysat der Tierproben zu bestimmen. Zudem wurden alle 45 Wildschweinproben in einer β -Actin-qPCR (Toussaint et al. 2007) als Extraktions- und Amplifikationskontrolle getestet. Dort war β -Actin spezifische Nukleinsäure in allen Proben nachweisbar.

Tab. 16: Viruslast vergleichend in GE/ml Tupfer- und Gewebelysat

Probennummer	PLHV-1	PLHV-2	PLHV-3
1489/20		2,63E+03	
1490/20		5,65E+04	7,65E+04
1491/20		2,03E+04	
1492/20			8,05E+03
1493/20		5,50E+04	2,66E+05
1494/20		1,12E+04	1,32E+05
1495/20		1,42E+05	2,44E+05
1496/20	8,55E+05	1,93E+04	1,39E+06
1497/20	1,75E+05	1,03E+04	2,57E+05
1498/20		2,03E+04	1,79E+06
1499/20		1,74E+04	1,09E+05
1500/20		3,63E+04	9,25E+05
1501/20	7,70E+04		6,90E+05
1502/20		2,92E+05	3,44E+05
1503/20	7,85E+05	1,31E+03	
1504/20		6,45E+03	2,87E+04
1505/20		5,05E+04	4,18E+04
1506/20		2,16E+05	4,94E+05
1507/20		1,53E+03	
1508/20		7,50E+04	8,95E+04
1509/20		8,20E+03	3,16E+05
1510/20	4,72E+04	2,02E+04	3,57E+05
1511/20		8,70E+04	4,96E+05
1512/20		1,95E+05	
1513/20		7,20E+05	3,67E+05
1514/20		1,78E+04	5,95E+06
1515/20		1,02E+05	2,93E+05
1516/20		3,76E+04	2,05E+06
1517/20	4,01E+06		3,95E+06
1518/20		2,45E+05	6,40E+03
1519/20		5,25E+02	8,30E+04
1520/20		4,57E+03	3,73E+04
1521/20		6,80E+03	1,19E+06
1522/20		4,70E+04	4,27E+05
1523/20		6,45E+04	4,37E+04
1524/20		8,25E+03	
1525/20		8,70E+03	1,02E+05
1526/20			2,61E+04
1527/20			3,51E+04

1528/20		1,86E+04	3,64E+03
1529/20		1,61E+05	
1530/20		1,28E+04	2,93E+04
1531/20	1,28E+05		
1532/20	3,30E+03	3,40E+05	9,05E+04
1533/20		2,36E+04	1,63E+06

Aus Tabelle 16 kann entnommen werden, dass sich die Virusgenomlast im Gewebe der Tiere zwischen den drei Typen der PLHV nicht maßgeblich unterscheidet. Zwischen den Einzeltieren zeigten sich allerdings große Unterschiede der Genommenge. Diese betrug bei allen zwischen 100 und 1000000 GE/ml Tupfer- und Gewebelysat.

In den vorliegenden Wildschweinproben wurde das PLHV-2 am häufigsten nachgewiesen. 34 der 45 getesteten Schweine waren damit zumindest mit einem der drei PLHV-Typen infiziert. Es wurden auch Doppelinfektionen nachgewiesen.

Tab. 17: Zahl der Doppel- und Dreifachinfektionen

Kombinationen	Anzahl der Tiere	Prozent (%)
PLHV-1	7	15,6
PLHV-2	34	75,6
PLHV-3	27	60
PLHV-1 und -2	3	6,7
PLHV-1 und -3	5	11,1
PLHV-2 und -3	23	51,1
PLHV-1, -2 und -3	3	6,7
Keine lymphotropen Herpesviren nachweisbar	3	6,7

Wie in Tabelle 17 dargestellt, war die Doppelinfektion mit PLHV-2 und -3 diejenige, welche am häufigsten nachgewiesen werden konnte. Drei der 45 getesteten Tiere waren sogar mit allen drei Viren infiziert. Nur bei drei Wildschweinen konnte kein PLHV nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden erfolgreich Plasmidstandards zu publizierten PLHV-1, -2 und -3 qPCRs kloniert und diese Nachweismethoden am Institut für Virologie etabliert und validiert. Alle drei qPCRs erwiesen sich spezifisch für den jeweiligen Subtyp, und die Spezifitätskontrollen wurden alle negativ getestet. Die Sensitivität ist bei der qPCR für PLHV-1 und -2 höher, als bei der qPCR für PLHV-3. Dadurch konnten hilfreiche und genaue Ergebnisse erreicht werden. Bei der Testung von PLHV-3 muss allerdings berücksichtigt werden, dass durch die niedrigere Spezifität vielleicht nicht alle PLHV-3-positiven Tiere erkannt werden konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass die drei bekannten Typen der PLHV im burgenländischen Wildschweinbestand in unterschiedlichem Ausmaß präsent sind. Bei unserer Testung konnte das PLHV-2 am häufigsten nachgewiesen werden (75,6 %), gefolgt von PLHV-3 (60 %) und dann PLHV-1 (15,6 %). Die meisten Doppelinfectionen traten bei PLHV-2 und -3 auf (51,1 %), wahrscheinlich weil diese zwei Typen viel häufiger nachgewiesen werden konnten als das PLHV-1. Eine Dreifachinfektion konnte nur bei drei der 45 Tiere nachgewiesen werden (6,7 %). Ebenfalls bei drei der getesteten Wildschweine konnte keines der drei PLHV nachgewiesen werden (6,7 %). Bei einer Testung in Irland war PLHV-1 der prävalenteste Typ, gefolgt von PLHV-3 und dann PLHV-2. Die meisten Doppelinfectionen traten bei der Kombination PLHV-1 und -3 auf (McMahon et al. 2006). Bei einer Testreihe in Brasilien kam ebenfalls PLHV-1 am häufigsten vor aber bei vier von 13 Schweinen konnte eine Dreifachinfektion nachgewiesen werden (30,8 %) (Dall Agnol et al. 2020), während das in Irland nur bei 4,5 % der Tiere der Fall war (McMahon et al. 2006). Diese Ergebnisse korrespondieren zum Teil mit Beobachtungen bei Hausschweinen in Norditalien. Dort wurde ebenfalls PLHV-1 als häufigste Variante beobachtet (28,97 %), gefolgt von PLHV-2 (10,79 %) und PLHV-3 (4,54 %). Die meisten Koinfectionen traten bei PLHV-1 und -3 (3,79 %) auf (Franzo et al. 2021).

Bei unserer Testung von österreichischen Wildschweinen wurde allerdings nur eine Population untersucht. Deswegen kann nicht automatisch auf die österreichischen Hausschweine geschlossen werden. Bei der Suche nach PLHV-3 mittels konventioneller PCR wurden aber auch vier Pools zu jeweils drei Proben von Hausschweinen aus österreichischen Betrieben getestet. Dabei mussten nur wenige Hausschweinproben untersucht werden, um das Virus zu finden, was für eine höhere Prävalenz von PLHV-3 in der österreichischen

Hausschweinpopulation sprechen könnte. Außerdem, konnte bereits im Jahr 1999 bei einer Studie nachgewiesen werden, dass die Sequenzen von PLHV-1 und -2 zwischen Hausschweinen und Wildschweinen identisch sind (Ulrich et al. 1999). Daraus lässt sich schließen, dass ein Transfer dieser Viren zwischen Haus- und Wildschweinen möglich sein könnte, wie z.B. auch beim klassischen Schweinepest Virus (Stadejek et al. 1997). Es könnte allerdings auch möglich sein, dass die Viren seit langer Zeit in den Populationen persistent sind und schon diaplazentar oder perinatal übertragen werden.

Die Viruslast im Gewebe der Tiere unterschied sich zwischen den drei Typen nicht maßgeblich. Zwischen den Einzeltieren ließen sich allerdings große Unterschiede in der Viruslast nachweisen. Diese betrug bei allen zwischen 100 und 1000000 GE/ml Tupfer- und Gewebelysat. Wovon die Höhe der Viruslast abhängt ist nicht bekannt. Da keine klinischen Daten von den getesteten Wildschweinen zur Verfügung standen, konnte keine untere kritische Grenze für eine hypothetische Pathogenität festgelegt werden. Als Proben für die qPCRs wurden Poolproben aus Lunge, Milz und Tonsillartupfer von Wildschweinen verwendet. In einem neuen Versuch könnte man statt Pools die Proben einzeln Testen, um zu untersuchen, in welchen Organen die Viruslast am höchsten ist. Bei einem Versuch in Italien wurde dies bereits durchgeführt mit dem Ergebnis, dass die Viren in Lymphknotenproben häufiger gefunden wurden, als in Blutproben. Allerdings war die Viruslast in Proben von Blut und Lunge vergleichsweise höher, als in den Lymphknotenproben (Franzo et al. 2021).

Es wird angenommen, dass die Virusreplikation von PLHV hauptsächlich im lymphatischen Gewebe und in lymphatischen Zellen stattfindet (Franzo et al. 2021). PCV-2 ist ebenfalls stark an lymphatisches Gewebe gebunden. Es könnte daher möglich sein, dass die PLHV einen Kofaktor für die Pathogenese von anderen lymphotropen Viren, z.B. PCV-2, darstellen. In einer Studie von 2006 wurde kein Zusammenhang zwischen PLHV und PCV-2 entdeckt. (McMahon et al. 2006). Allerdings war die Probenanzahl limitiert und bei PMWS handelt es sich um ein komplexes und multifaktorielles Syndrom. In Italien wurde deshalb der Zusammenhang zwischen PLHV 1-3 und PCV-2 und -3 erneut untersucht. Auch hier konnte zwar die hohe Prävalenz von PLHV bestätigt werden, aber es konnte keine positive Korrelation zu PCV-2 und -3 nachgewiesen werden. Tatsächlich gab es sogar eine negative Korrelation zwischen PLHV-2 und PCV-2 (Franzo et al. 2021), welche ebenfalls in Irland ein paar Jahre zuvor beschrieben wurde (McMahon et al. 2006). Als Erklärung ist denkbar, dass durch Herpesvirusinfektion eine unspezifische Immunstimulation (z.B. Interferon beta) erfolgt, die sich auf andere Infektionen auswirkt.

Eventuell könnte man weiterführend die Höhe der Viruslast an PLHV mit dem Ausbruch von PMWS vergleichen. Wir haben in dieser Arbeit die methodische Grundlage geschaffen, die einen möglichen Einfluss von PLHV auf die Schweinegesundheit zu klären hilft. Es ist bekannt, dass PLHV 1-3 eine sehr hohe Prävalenz haben. Das bedeutet aber nicht, dass PLHV keine fakultativen Pathogene sind. Ähnlich wie beim Mensch wird das humane Herpesvirus 4 (EBV) erst nach Immunsuppression z. B. durch AIDS oder Organtransplantation zum klinisch apparenten Krankheitserreger (Arvey et al. 2015). Ähnliches könnte beim Schwein im Zusammenhang mit immunsuppressiven Koinfektionen (Circoviren, PRRSV) oder Mykotoxinvergiftungen eine Rolle spielen.

Im Hinblick auf Xenotransplantationen ist es unbedingt nötig eine Herpesdiagnostik in den Spendertieren zu machen, da man noch nicht weiß, ob die PLHV bei einer Xenotransplantation eine Klinik im Empfänger des Organs auslösen können. Bei einer Forschungsarbeit konnte zwar keine Aktivierung von PLHV-1 nach einer Xenotransplantation von Organen vom Schwein zum Pavian beobachtet werden, aber es konnte ein Zusammenhang zwischen PLHV-1 und PTLD nach einer Stammzelltransplantation in Schweinen beschrieben werden (Mueller et al. 2005). Daher sollte der Vermutung, dass diese Viren zur humanen PTLD beitragen können nachgegangen werden. In einem anderen Experiment konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass porcine Gammaherpesviren bei Miniaturschweinen nach einer Zelltransplantation eine PTLD hervorrufen können, welche der humanen PTLD sehr ähnlich ist (Huang et al. 2001). Bis jetzt wurde noch nicht abgeklärt, ob die PLHV in Schweinen, welche ihren Hauptwirt darstellen, oder in anderen Säugetieren pathogen sein können.

Zukünftige Untersuchungen mit der hier beschriebenen Methodik sollen klären, ob es einen Zusammenhang zwischen PLHV Viruslast und der Bestandsgesundheit gibt. Hierbei ist zu bedenken, dass PLHV nicht als Krankheitserreger wirken muss, aber eine höhere PLHV Viruslast als Indikator für andere Haltungsmängel hilfreich sein könnte.

5 Zusammenfassung

Bei Schweinen und Wildschweinen sind drei Typen von porcinen Lymphotropen Herpesviren bekannt: PLHV-1, -2 und -3. Bis jetzt gibt es nur wenige Studien über deren Verbreitung und Pathogenität. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden drei absolut quantifizierende Nachweismethoden (qPCRs) etabliert und das Vorkommen und die Viruslast von PLHV-1, -2 und -3 in einem österreichischen Wildschweinbestand bestimmt. Als erster Schritt wurden mit konventioneller PCR Genomfragmente von PLHV 1-3 erzeugt und kloniert, die als Positivkontrollen und Standards zur Validierung dienten. Mit der validierten qPCR wurden 45 Wildschweinproben auf PLHV-1, -2 und -3 getestet und die Viruslast wurde bestimmt. Es stellte sich heraus, dass PLHV-2 am häufigsten nachgewiesen werden konnte (75,6 %), gefolgt von PLHV-3 (60 %) und PLHV-1 (15,6 %). Auch Doppel- und Dreifachinfektionen konnten nachgewiesen werden. Die häufigsten Doppelinfektionen gab es bei der Kombination von PLHV-2 und PLHV-3 (51,1 %). Bei drei Tieren gab es eine Dreifachinfektion und nur bei drei der getesteten Tiere konnte keines der Viren nachgewiesen werden (jeweils 6,7 %). Die Viruslast lag bei allen Viren zwischen 100 und 1000000 GE/ml Tupfer- und Gewebelysat. Zusammenfassend, zeigen diese Ergebnisse, dass die porcinen Lymphotropen Herpesviren 1-3 in burgenländischen Wildschweinen sehr weit verbreitet sind. Zur zukünftigen Ermittlung der Prävalenzen von PLHVs in Hausschweinbeständen steht nun eine sensitive und spezifische Methode zur Verfügung.

6 Abstract

Three types of porcine lymphotropic herpesviruses in feral and domestic pigs: PLHV-1, -2 and -3 are known. Until now, there are only a few studies about their distribution and pathogenicity in Austria. Within this diploma thesis, quantifying detection methods (qPCRs) were established and the occurrence and the virus load of PLHV-1, -2 und -3 in a feral pig population from the federal state "Burgenland" was determined. As first step for validation of the qPCR genomic fragments of the gB gene were amplified by conventional PCR and cloned into a plasmid. The cloned fragments served as positive controls as well as standards for the validation of the qPCR. The qPCR for PLHV 1 and 2 proved very sensitive and specific while PLHV 3 was 10fold less sensitive. The methods were applied to 45 samples of feral pigs and the virus loads of PLHV-1, -2 und -3 were determined. PLHV-2 turned out to be the most common (75.6 %), followed by PLHV-3 (60 %) and PLHV-1 (15.6 %). The most common double infection was the combination of PLHV-2 and PLHV-3 (51.1 %). Three animals had a triple infection and only in three of all tested animals was not detected any of the viruses (6.7 %). The virus load of all of the three viruses was between 100 and 1000000 GE/ml swab- and tissue-lysate. Overall, this results show that the porcine lymphotropic herpesviruses 1-3 are widely distributed in feral pigs in Burgenland (Austria). For further prevalence determination of the PLHVs in domestic pig populations is now a sensitive and specific method available.

7 Literaturverzeichnis

Arvey A, Ojesina AI, Pedamallu CS, Ballon G, Jung J, Duke F, Leoncini L, Falco G de, Bressman E, Tam W, Chadburn A, Meyerson M, Cesarman E. 2015. The tumor virus landscape of AIDS-related lymphomas. *Blood*, 125 (20): e14-22.

Chmielewicz B, Goltz M, Franz T, Bauer C, Brema S, Ellerbrok H, Beckmann S, Rziha H-J, Lahrmann K-H, Romero C, Ehlers B. 2003. A novel porcine gammaherpesvirus. *Virology*, 308 (2): 317–329.

Dall Agnol AM, Leme RA, Suphoronski SA, Oliveira TES, Possatti F, Saporiti V, Headley SA, Alfieri AA, Alfieri AF. 2020. Porcine lymphotropic herpesvirus DNA detection in multiple organs of pigs in Brazil. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 51 (4): 2145–2152.

Dunleavy K. 2018. Approach to the Diagnosis and Treatment of Adult Burkitt's Lymphoma. *Journal of oncology practice*, 14 (11): 665–671.

Ehlers B, Ulrich S, Goltz M. 1999. Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *The Journal of general virology*, 80 (Pt 4): 971–978.

Franzo G, Drigo M, Legnardi M, Grassi L, Menandro ML, Pasotto D, Cecchinato M, Tucciarone CM. 2021. Porcine Gammaherpesviruses in Italian Commercial Swine Population: Frequent but Harmless. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10 (1).

Huang CA, Fuchimoto Y, Gleit ZL, Ericsson T, Griesemer A, Scheier-Dolberg R, Melendy E, Kitamura H, Fishman JA, Ferry JA, Harris NL, Patience C, Sachs DH. 2001. Posttransplantation lymphoproliferative disease in miniature swine after allogeneic hematopoietic cell transplantation: similarity to human PTLN and association with a porcine gammaherpesvirus. *Blood*, 97 (5): 1467–1473.

International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. 2020. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae (Zugriff 24.08.2021).

McMahon KJ, Minihan D, Campion EM, Loughran ST, Allan G, McNeilly F, Walls D. 2006. Infection of pigs in Ireland with lymphotropic gamma-herpesviruses and relationship to postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary microbiology*, 116 (1-3): 60–68.

Mueller NJ, Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJMF, Gollackner B, Wilkinson RA, Arn S, Sachs DH, Cooper DKC, Fishman JA. 2005. Early weaning of piglets fails to exclude porcine lymphotropic herpesvirus. *Xenotransplantation*, 12 (1): 59–62.

Offor UT, Akyea RK, Neequaye JE, Renner LA, Segbefia CI. 2018. The changing clinical pattern of endemic Burkitt lymphoma in Western Africa: Experience from a tertiary center in Ghana. *Pediatric blood & cancer*, 65 (10): e27275.

Roizman B, Baines J. 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 14 (2): 63–79.

Stadejek T, Vilcek S, Lowings JP, Ballagi-Pordány A, Paton DJ, Belák S. 1997. Genetic heterogeneity of classical swine fever virus in Central Europe. *Virus research*, 52 (2): 195–204.

Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, Clercq K de. 2007. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *Journal of Virological Methods*, 140 (1-2): 115–123.

Ulrich S, Goltz M, Ehlers B. 1999. Characterization of the DNA polymerase loci of the novel porcine lymphotropic herpesviruses 1 and 2 in domestic and feral pigs. *The Journal of general virology*, 80 (Pt 12): 3199–3205.

Yin H, Qu J, Peng Q, Gan R. 2019. Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Medical microbiology and immunology*, 208 (5): 573–583.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<i>Abb. 1: Darstellung der klonierten PCR Fragmente durch Restriktionsverdau der Plasmide mit EcoRI</i>	12
<i>Abb. 2: Fluoreszenzsignal abhängig vom Zyklus – Verdünnungsreihe PLHV-1</i>	17
<i>Abb. 3: Standardkurve – Verdünnungsreihe PLHV-1</i>	17
<i>Abb. 4: Fluoreszenzsignal abhängig vom Zyklus – Verdünnungsreihe PLHV-2</i>	19
<i>Abb. 5: Standardkurve – Verdünnungsreihe PLHV-2</i>	20
<i>Abb. 6: Fluoreszenzsignal abhängig vom Zyklus – Verdünnungsreihe PLHV-3</i>	22
<i>Abb. 7: Standardkurve – Verdünnungsreihe PLHV-3</i>	22
<i>Tab. 1: Primer und Amplifikatlänge für die konventionellen PCRs</i>	6
<i>Tab. 2: Zusammensetzung für einen Mastermix für die konventionelle PCR in μl</i>	6
<i>Tab. 3: Primer und Sonden, die für die qPCR verwendet wurden, sowie die Amplifikatlänge</i>	7
<i>Tab. 4: Schema für einen Mastermix der qPCR zum Nachweis von PLHV-1, -2 und -3 (in μl)</i>	7
<i>Tab. 5: Sequenzen der PLHV spezifischen Abschnitte der generierten Plasmide von PLHV-1, -2 und 3 mit dem pGemT Vektor</i>	13
<i>Tab. 6: Quantifizierungsinformationen der qPCR – PLHV-1</i>	16
<i>Tab. 7: Ct-Wert, gegebene Konzentration und berechnete Konzentration (GE/μl) der Verdünnungsreihe – PLHV 1</i>	18
<i>Tab. 8: Quantifizierungsinformationen der qPCR – PLHV-2</i>	18
<i>Tab. 9: Ct-Wert, gegebene Konzentration und berechnete Konzentration (GE/μl) der Verdünnungsreihe – PLHV 2</i>	20
<i>Tab. 10: Quantifizierungsinformationen der qPCR – PLHV-3</i>	21
<i>Tab. 11: Ct-Wert, gegebene Konzentration und berechnete Konzentration (GE/μl) der Verdünnungsreihe – PLHV 3</i>	22
<i>Tab. 12: Name, Ct-Wert und berechnete GE/μl im Extrakt – PLHV 1</i>	23
<i>Tab. 13: Name, Ct-Wert und berechnete GE/μl im Extrakt – PLHV 2</i>	26
<i>Tab. 14: Name, Ct-Wert und berechnete GE/μl im Extrakt – PLHV 3</i>	28
<i>Tab. 15: Wiederholung der Testung auf PLHV-3 der Probe 1511/20</i>	30
<i>Tab. 16: Viruslast vergleichend in GE/ml Tupfer- und Gewebelysat</i>	31
<i>Tab. 17: Zahl der Doppel- und Dreifachinfektionen</i>	32