

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Klassische Schweinepest.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klinik	2
1.1.2.1 Akute Verlaufsform.....	2
1.1.2.2 Chronische Verlaufsform.....	3
1.1.2.3 Verlaufsform mit KSP-Persistenz.....	3
1.1.3 Pathogenese	4
1.1.4 Bekämpfung.....	5
1.1.4.1 Impfung gegen die klassische Schweinepest	6
1.2 Pestiviren.....	8
1.2.1 Taxonomie	8
1.2.2 Andere pestivirale Erkrankungen	8
1.2.3 Molekularer Aufbau	9
1.2.4 Der pestivirale Infektionszyklus.....	11
1.3 Labordiagnose der klassischen Schweinepest.....	12
1.3.1 Direkte Nachweismethoden.....	12
1.3.2 Indirekte Nachweismethoden	13
1.3.3 Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay	13
1.3.3.1 Indirekter ELISA.....	14
1.3.3.2 Kompetitiver ELISA	15
1.4 Markervakzinen gegen die klassische Schweinepest.....	17
1.5 Das Core-Protein.....	21
1.6 Core ist nicht essentiell	22
1.7 Ziel dieser Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25

2.1.1 Antigene.....	25
2.1.2 Antikörper.....	25
2.1.2.1 Detektionsantikörper.....	25
2.1.2.2 Sekundärantikörper	25
2.1.3 Seren	26
2.1.3.1 Positives Kontrollserum	26
2.1.3.2 Negatives Kontrollserum.....	26
2.1.3.3 Seren aus dem Tierversuch	26
2.1.3.4 Negativ-Seren.....	27
2.1.4 Chemikalien und Puffer.....	27
2.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.6 Geräte.....	28
2.1.7 Eingesetzte Puffer und Lösungen.....	29
2.1.7.1 Beschichtungspuffer.....	29
2.1.7.2 Blockierungspuffer.....	29
2.1.7.3 Wasch- und Verdünnungspuffer	29
2.1.7.4 Zwischenfixation.....	29
2.1.7.5 Farblösung.....	30
2.1.7.6 Stopplösung.....	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Durchführung eines indirekten ELISAs	31
2.2.2 Durchführung eines kompetitiven ELISAs	32
2.2.3 Auswertung eines ELISAs.....	33
2.2.3.1 Messung der optischen Dichte	33
2.2.3.2 Berechnung der prozentualen Inhibition.....	34
2.2.3.3 Berechnung des „cut-off“-Wertes	34
2.2.3.4 Berechnung der Spezifität	34
2.2.3.5 Berechnung der Sensitivität	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Auswahl der wichtigsten Komponenten	39
3.1.1 Auswahl von Detektionsantikörper, Antigen und Serum.....	39
3.1.1.1 Auswahl des Detektionsantikörpers.....	39
3.1.1.2 Auswahl des Antigens	41

3.1.1.3 Auswahl der Seren	41
3.1.2 Auswahl der Konzentrationen und Verdünnungen	41
3.1.2.1 Auswahl der Antigenkonzentration.....	41
3.1.2.2 Auswahl der Konzentration des Detektionsantikörpers	42
3.1.2.3 Auswahl der Serumverdünnung.....	44
3.1.2.4 Auswahl der Verdünnung des Zweit-Antikörpers	45
3.1.3 Auswahl weiterer Bestandteile	46
3.1.3.1 Auswahl der Mikrotiter-Platten.....	46
3.1.3.2 Auswahl der Pufferlösungen	46
3.1.3.3 Auswahl der Blockierungslösung.....	46
3.1.3.4 Bestimmung der Anzahl der Waschschritte	46
3.1.3.5 Ausschluss unspezifischer Bindungen	47
3.1.3.6 Zwischenfixation	47
3.2 Untersuchung der Testseren.....	48
3.2.1 Verlaufskontrolle der C-Stamm-Gruppe	48
3.3 Optimierung der Versuchsbedingungen.....	50
3.3.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten	51
3.3.2 Optimierung der Blockierung.....	51
3.3.3 Inkubationsbedingungen der Seren	51
3.3.3.1 Inkubationstemperatur.....	51
3.3.3.2 Inkubation auf dem Schüttler	52
3.3.3.3 Inkubationszeit	53
3.3.3.4 Änderung der Mengenverhältnisse.....	53
3.3.4 Inkubationsbedingungen des Detektionsantikörpers	54
3.3.4.1 Inkubationszeit	54
3.3.4.2 Gleichzeitige Inkubation der Seren mit dem Detektionsantikörper	54
3.3.4.3 Gleichzeitige Inkubation der Seren mit Detektions- und Zweit-Antikörper	55
3.3.5 Inkubationsbedingungen des Zweit-Antikörpers.....	56
3.3.6 Verwendung eines Dritt-Antikörpers	56
3.3.7 Durchführung des ELISAs nach Abschluss der Optimierung.....	58
3.4 Untersuchung der Testseren.....	59
3.4.1 Verlaufskontrolle der C-Stamm-Gruppe	59
3.4.2 Verlaufskontrolle der KSPV ΔCore pCR85-Gruppen	60

3.5 Validierung des ELISAs	61
3.5.1 Negativ-Seren	61
3.5.2 Bildung des „cut-off“-Wertes	62
3.5.3 Bestimmung von Spezifität und Sensitivität	63
4 Diskussion	64
4.1 Konzept der ΔCore-Markervakzine	64
4.2 Bewertung der Ergebnisse	65
4.3 Systeme zum Nachweis spezifischer Wildtyp-Antikörper sind essentielle Bestandteile der Markerimpfstoff-Entwicklung	68
4.4 Vergleich der ΔCore-Vakzine mit anderen DIVA-Konzepten	70
5 Zusammenfassung.....	73
6 Summary	74
7 Literaturverzeichnis.....	75