©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges.
Tropenmed. Parasitol. 17 (1995)
7 - 16

Institut für Mikrobiologie (Leiter: Oberfeldarzt Dr. E. J. Finke), Bereich Studien und Wissenschaft (Leiter: Oberstarzt Prof. Dr. C. J. Mayer), Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr München (Kommandeur: Generalarzt Dr. K. Ewert) (1)
Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie (Vorstand: Prof. Dr. R. Gothe) der Ludwig-Maximilians-Universität München (2)

Charakterisierung zweier afrikanischer Kamelpockenvirus-Isolate

C. Otterbein[1], H. Meyer[1], Ingrid Renner-Müller[2], E. Munz[2]

Einleitung

Kamelpocken stellen seit Jahrhunderten eine der ökonomisch bedeutendsten Viruskrankheiten der Gattung *Camelus* dar. Der Erreger, *Orthopoxvirus cameli,* ist ein Vertreter des Genus Orthopoxvirus (21). Infektionen mit dem als Camelpoxvirus (CPV) bezeichneten Virus sind nur bei Dromedaren und Trampeltieren beobachtet worden. Publikationen diagnostizierter Fälle (30) und seroepidemiologischer Untersuchungen (19, 26, 27) zeigen, daß der Erreger im eigentlichen Lebensraum der Kamele (Afrika und Asien) endemisch verbreitet ist. Berichte, nach denen das CPV für den Menschen pathogen sei, konnten nie einwandfrei verifiziert werden (8, 15, 18).

Kamelpockenausbrüche treten in der Regel im Abstand von einigen Jahren vor allem bei jüngeren Tieren auf (1, 6). Ursache dafür dürfte das Heranwachsen einer neuen, empfänglichen Generation sein. Die Übertragung erfolgt sowohl durch direkten Kontakt als auch indirekt (31, 34). Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 25 Tagen (6, 30) treten erste Krankheitsanzeichen in Form von Schwäche und präeruptivem Fieber mit anschließender Rötung und Schwellung der Haut bzw. Mukosa auf. Danach entstehen vor allem am Kopf, aber auch an anderen Körperteilen Papeln, die in 8 bis 15 Tagen die Stadien Bläschen, Pusteln und Krusten durchlaufen. Klinisch lassen sich zwei Verlaufsformen unterscheiden: Bei adulten Tieren wird zumeist ein milder und lokalisierter Verlauf beobachtet, der in zwei bis vier Wochen ausheilt. Bei Kamelfohlen aber kommt es oft zu einer schweren, generalisierten Verlaufsform, die, kompliziert durch bakterielle Sekundärinfektionen, zu beträchtlichen Letalitätsraten führen kann (15, 18). Überlebende Tiere entwickeln eine belastbare Immunität, die 20 bis 25 Jahre anhält (6).

Zur Diagnostik genügen in der Regel das klinische Bild und eine elektronenmikroskopische Untersuchung, um „Auzdyk" resp. Camel contagious ecthyma — verursacht durch ein Parapockenvirus (28) — und Papillomatose (29) auszuschließen. Für eine Abgrenzung des CPV von anderen Orthopockenvirus-Spezies ist die Isolierung und Bestimmung biologischer Eigenschaften, wie z. B. Pockenherde auf der Chorioallantoismembran (CAM), erforderlich (20).

Das CPV vermehrt sich in verschiedenen Zellinien (z. B. Vero-, RK 13-, MA-104-Zellen) sowie in primären Nieren-Zellkulturen von Kälbern, Kamelen, Lämmern und Schweinen unter Ausbildung eines zytopathischen Effektes (cpE); beschrieben wird ein plaqueförmiges Wachstum mit mehr oder weniger ausgeprägten Riesenzellbildungen (3, 20, 21, 32, 33, 38). Auf der CAM neun bis elf Tage alter Bruteier läßt sich das CPV bei 34 bis 37° C gut vermehren. Je nach

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Isolat werden 0,2 bis 0,6 mm große weiße, proliferative Herde ohne zentrale Nekrose und – mit einer Ausnahme (22) – ohne Hämorrhagien beschrieben. Die Virusvermehrung findet offensichtlich nur lokal im beimpften Bereich statt. An den Embryonen werden keine Anzeichen im Sinne einer Generalisation beobachtet (1, 21, 22, 38). Allerdings wird auch über eine unterschiedliche Pathogenität diverser CPV-Stämme für Hühnerembryonen berichtet (2, 7, 8).

Im Tierversuch sind aufgrund des engen Wirtsspektrums nur Mäuse, Affen, Kaninchen und mit Einschränkungen auch Hühnerküken empfänglich (1, 8, 21, 22, 32, 37, 38). Bei letzteren drei Tierarten traten nach Skarifikation resp. intrafollikulärer Infektion nur lokale Hautläsionen auf. Am empfänglichsten ist – mit altersspezifischen Abstufungen – die Maus. Die LD_{50} liegt bei über 10^7 pbE (plaquebildenden Einheiten) für ein adultes Tier, bei 10^4 pbE für eine zwei bis drei Wochen alte Maus und bei $10^{3,5}$ pbE für eine Babymaus. Obwohl mittlerweile das gesamte Genom des Vacciniavirus Stamm Kopenhagen (11) und des Variolavirus Stamm Bangladesch 1975 (23) sequenziert wurde, gibt es nur wenige Erkenntnisse über das Genom des CPV. Je nach Isolat beträgt seine Länge 175.000 bis 200.000 Basenpaare (bp) (9, 33). Sequenzdaten liegen nur über das Gen, das für Einschlußkörperchen vom Typ A kodiert (25), und für das Gen der Thymidinkinase (4) vor. In beiden Fällen beträgt die Homologie zu Vacciniavirus über 90%.

Das CPV ist ein gut immunisierendes Agens, trotzdem gibt es bis heute keine kommerziell erhältliche, homologe Vakzine. Die Nomaden immunisierten ihre Tiere, indem sie getrocknete Krusten infizierter Tiere in Milch verrieben und mittels Skarifikation „verimpften" (13). In der Vergangenheit wurden auch Notimpfungen mit Vacciniavirus-Stämmen durchgeführt (5, 14, 36). In Anbetracht des abnehmenden Impfschutzes der Menschen gegenüber Orthopockenviren sollte noch virulentes Vacciniavirus nicht mehr eingesetzt werden (30). 1992 wurden erstmals Vakzinen auf der Basis attenuierter CPV-Isolate beschrieben (12, 16). Geimpfte Kamele erwiesen sich nach Challenge-Infektion als immun. Angaben über Marker, die eine Differenzierung dieser Impfstämme von Feldvirus-Stämmen ermöglichen, liegen aber nicht vor.

Das Ziel dieser Untersuchung war daher die phäno- und genotypische Charakterisierung zweier CPV-Feldisolate, die durch vielfache Zellkulturpassagen attenuiert und als Impfvirus etabliert werden sollen. Damit könnten auch die als essentiell angesehenen Differenzierungsmöglichkeiten zwischen Wild- und Impfstämmen aufgezeigt werden.

Material und Methoden

Virus

Als Untersuchungsmaterial diente je ein Kamelpockenvirus-Isolat aus Mauretanien und aus dem Niger (freundlicherweise von Herrn Dr. Nguyen-Ba-Vy vom Insititut d'Elevage et de Médicine Vétérinaire des Pays Tropicaux, Maison-Alfort Cedex, Frankreich, zur Verfügung gestellt). Beide Stämme wurden aus Läsionen von Kamelen, die ein generalisiertes Exanthem zeigten, isoliert. Das Isolat aus Mauretanien (VDM), ursprünglich als VDR/A2 bezeichnet, stand als 7. Zellkulturpassage (2 mal in Lammnieren und 5 mal in Vero-Zellen passagiert) und das Isolat aus dem Niger (VD49) als 5. Verozellkulturpassage zur Verfügung. Diese Passagen wurden zweimal auf MA-104 Zellkulturen vermehrt.

Zellkulturtechnik

Für die Untersuchungen wurden folgende Zellinien verwendet:

BHK 21 (Babyhamsternierenzellen), Ederm (Equine Hautfibroblastenzellen), L929 (Mäusefibroblastenzellen), MA-104 (Affennierenzellen), MDBK (bovine Nierenzellen), MDCK (kanine Nierenzellen), Vero (Affennierenzellen) und Dubca (Kamelhautzellen, dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. O.-R. Kaaden, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der tierärztlichen Fakultät der LMU München zur Verfügung gestellt).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach Standardmethoden (24). Als Anzuchtmedium diente bei Vero-Zellen Medium 199, ansonsten Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (D'MEM). Die Infektion der Zellkulturen erfolgte durch Zugabe des Inokulates über eine Stunde bei 37° C. Danach wurde die virushaltige Suspension abgesaugt, der Zellrasen gewaschen, Medium zugegeben und zirka 72 Std. bei 37° C kultiviert. Die Virusfreisetzung aus den Zellen

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

erfolgte durch dreimaliges Gefriertauen. Diese Suspension wurde für weitere Infektionen verwendet oder für den in vivo-Versuch und die molekularbiologischen Untersuchungen nach den dort angegebenen Verfahren behandelt.

Molekularbiologische Untersuchungen

Für die Untersuchungen der Genome und die in vivo-Versuche wurden hochtitrige Virussuspensionen benötigt. Diese konnten nach Freisetzung durch dreimaliges Gefriertauen, Zentrifugation, Fluorkarbonausschüttlung und Zentrifugation durch ein Sukrosekissen gewonnen werden. Die Virionen wurden anschließend in TE-Puffer (2,5mM Tris-HCl, 1mM EDTA) aufgenommen und für den in vivo-Versuch ein zweites Mal in TE-Puffer pelletiert. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden gereinigte Virionen mit Proteinase K verdaut, die DNS mittels Chloroformextraktion und Alkoholpräzipitation isoliert (30) und Äquivalente der DNS nach Herstelleranweisung (Boehringer) mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Xho I verdaut. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen und ihrer Anzahl diente eine Auftrennung der digestierten DNS mittels horizontaler Gelelektrophorese in einem 0,4% und einem 1,2% Agarosegel (2 -5 V/cm Gellänge). Die Dokumentation der Wanderungsmuster erfolgte mittels interkalierendem Ethidiumbromid bei 254 nm auf einen Polaroidfilm. Die aufgetrennten Genomfragmente wurden anschließend mit 0,4 N NaOH auf eine Hybond N^+-Membran übertragen (Southern Blot). Durch Hybridisierung der gebundenen Genomfragmente mit Digoxigenin-markierten DNS-Sequenzen (eigene Herstellung [35]) und nachfolgender Farbreaktion konnten die Fragmente identifiziert und physikalische Genomkarten etabliert werden.

Die Darstellung terminaler Fragmente erfolgte entsprechend den Angaben von GESHELIN und BERNS (10) unter Ausnutzung der kovalent gebundenen Genomenden.

Brutei-Technik

Die Infektion elf Tage alter Bruteier mit beiden CPV-Isolaten erfolgte nach Standardmethoden (24). 0,1 ml der log 10 verdünnten Virussuspension wurde auf die abgesenkte Chorioallantoismembran (CAM) verimpft (5 Verdünnungsstufen auf je 4 Bruteier). Als Kontrolle dienten unbehandelte bzw. mit Phosphat-gepufferter Salzlösung inokulierte Bruteier. Nach einer Bebrütung von fünf Tagen bei 37° C erfolgte die makroskopische Beurteilung. Gleichzeitig mit der Verimpfung wurde der Titer der applizierten Virussuspension auf zwei verschiedenen Zellinien ermittelt.

Tierversuch

Für den in vivo-Versuch (genehmigt durch die Regierung von Oberbayern, Az 211-2531-28/93 vom 12. 10. 1993) wurden 36±8 Stunden alte Babymäuse der F81 POP (Auszuchtpopulation) (39) ausgewählt, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. J. Meyer, Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät in Oberschleißheim zur Verfügung gestellt wurden. Sechs Tiere eines Wurfes erhielten 0,1 ml der log 10 in TE-Puffer verdünnten Virussuspension intraperitoneal (i.p.) und acht resp. sieben Tiere 0,02 ml intrazerebral (i.z.). Parallel zur Verimpfung wurden die Titer beider CPV-Suspensionen auf drei verschiedenen Zellinien ermittelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit TE-Puffer injizierte Würfe. Die Tiere wurden mehrmals täglich kontrolliert und moribunde Tiere euthanasiert.

Ergebnisse und Diskussion

Zellkulturtechnik

In Tabelle 1 wird das Verhalten der CPV-Isolate in verschiedenen Zellkulturen vergleichend gegenübergestellt. Die Untersuchungsergebnisse zu Vero- und MA-104-Zellen bestätigen deren Eignung zur Erregerkultivierung. Eine Besonderheit stellen die vielkernigen Riesenzellen dar, die in diesen Zellkulturen gebildet wurden. Sie beinhalten bis zu 200 Zellkerne, die in dichter Formation meist randständig zu beobachten waren. Berücksichtigt man die Anzahl der Zellkerne (Tab. 1), so besitzt VDM das größere Potential zur Zellsynzytienbildung. Auffällig war auch die unterschiedliche Fähigkeit, in Dubca-Zellen einen plaqueförmigen cpE zu induzieren. So wurde für den Stamm VD49 ein um den Faktor 1.000 geringerer Titer ermittelt (Tab. 2). Weitere Beobachtungen waren die Abkugelung infizierter Zellen in allen Zellinien, vakuolige Degeneration in MA-104-Zellen und traubenförmige Ballungen der Zellen in BHK-, L929- und Ederm (VD49)-Zellkulturen (hier als Aggregatbildung bezeichnet).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1: Verhalten der Kamelpockenvirus-Isolate VDM und VD49 in Zellkulturen.

Zellinie		VDM	VD49
BHK	gen. cpE	42	42
	cpE-Form	AK, PB, AB (20-50)	AK, PB, AB (10-30)
Dubca	gen. cpE	nb	nb
	cpE-Form	AK, PB, RZ	AK, PB, RZ
Ederm	gen. cpE	na	na
	cpE-Form	AK, PB, RZ (5-10)	AK, PB, AB (20-50)
L 929	gen. cpE	36	48
	cpE-Form	AK, PB, AB (10-20)	AK, PB, AB (10-20)
MA-104	gen. cpE	42	42
	cpE-Form	AK, VD, PB, RZ (50-200)	AK, VD, PB, RZ (50-100)
MDBK	gen. cpE	30	36
	cpE-Form	AK, PB	AK, PB
MDCK	gen. cpE	120	na
	cpE-Form	AK, PB	AK, PB
Vero	gen. cpE	30	30
	cpE-Form	AK, PB, RZ (50-200)	AK, PB, RZ (20-50)

gen. cpE: Zeitpunkt in Stunden, bis der cpE generalisiert auftrat
na = gen. cpE wurde nicht ausgebildet · nb = nicht beurteilt

cpE-Form: Beobachtete Formen des cpE in der Zellkultur
AK = Abkugelung der infizierten Zellen · VD = Vakuolige Degeneration · PB = Plaquebildung
RZ = Polynukleäre Riesenzellen (Anzahl der Kerne)
AB = Aggregatbildung (Anzahl der beteiligten Zellen)

Tabelle 2: Im Infektionsversuch eingesetzte Suspensionen der Kamelpockenvirus-Isolate VDM und VD49. Dargestellt sind die Titer in plaquebildenden Einheiten (pbE) pro ml, ermittelt in drei verschiedenen Zellinien. (n = x) gibt die Anzahl der ausgezählten Kavitäten an.

Virus-stamm	Titer in pbE/ml MA-104-Zellkultur	Titer in pbE/ml Vero-Zellkultur	Titer in pbE/ml Dubca-Zellkultur
VDM	$9{,}0 \times 10^6$ (n = 6)	$1{,}3 \times 10^7$ (n = 4)	$5{,}2 \times 10^7$ (n = 7)
VD49	$1{,}5 \times 10^7$ (n = 8)	$2{,}4 \times 10^7$ (n = 8)	$5{,}0 \times 10^4$ (n = 4)

Tabelle 3: Ermittlung der LD_{50}

Virus	LD_{50} in Verdünnungs-stufen [1]	Titer des Infektions-materials in pbE [2]	LD_{50} für eine Maus in pbE [3]
VDM i.p	$10^{-5,5}$	$9{,}0 \times 10^5$	3,0
VDM i.z.	$10^{-4,88}$	$1{,}8 \times 10^5$	2,5
VD49 i.p.	$10^{-5,5}$	$15{,}0 \times 10^5$	5,0
VD49 i.z.	$10^{-3,13}$	$3{,}0 \times 10^5$	225

[1] = Werte wurden nach KÄRBER (17) anhand der Verdünnungsstufen berechnet.
[2] = Gehalt an pbE, der in einer applizierten Dosis der Verdünnungsstufe 10^0 enthalten war.
[3] = LD_{50} für eine Babymaus wurde aus den Werten [2] und [3] berechnet und gerundet.

Brutei-Technik

Bei der Beurteilung der CAM infizierter Bruteier am 6. Tag p. i. konnten unterschiedliche Pockenläsionen beobachtet werden: Bruteier, die mit hochtitrigen Virussuspensionen inokuliert worden waren, entwickelten schwartige Beläge. Je niedriger die inokulierte Dosis war, desto kleiner und abgegrenzter stellten sich die ausgebildeten Läsionen dar. Die solitären Pocken nach Applikation geringer Virusmengen wiesen eine Größe von 0,2 bis 1 mm und ein weiß-opakes bis weißes Erscheinungsbild auf. Damit entsprechen die ermittelte Größe und Farbe den in der Literatur beschriebenen Daten (1, 7, 8, 21, 22, 38). Eine Ausbreitung der Pockenläsionen über den beimpften CAM-Bereich hinaus trat nur in zwei (VD49, unverdünnte Virussuspension) von insgesamt 40 beimpften Eiern auf. Die Inokulation hoher Virus-Gehalte (Isolat-unabhängig) war mit dem Tod einiger Embryonen assoziiert. Diese Beobachtung muß aber vorsichtig bewertet werden, da bereits bis zum 11. Bebrütungstag 50% der Bruteier abgestorben waren. Aufgrund der in vitro ermittelten Titer werden zirka fünf plaquebildende Einheiten für die Ausbildung einer pockenbildenden Einheit benötigt.

Tierversuch

In Abbildung 1 sind prozentual die gestorbenen Tiere pro Verdünnungsstufe und Applikationsweise dargestellt. Deutlich ist hier der rasche Verlauf bei i. p. und der eher protrahierte Verlauf bei i. z. Infektion zu erkennen. Die i. p. Infektion stellt somit die bessere Methode dar. Desweiteren bestand ein direkter Zusammenhang zwischen Todeszeitpunkt und applizierter Dosis (siehe Abb. 2).

Die Ermittlung der LD_{50} für eine Babymaus in pbE wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde eine LD_{50} auf Basis der Verdünnungsstufen nach KAERBER (17) ermittelt. Diese Werte wurden dann über die ermittelten Titer der Virussuspensionen (MA-104 Zellen, Tab. 2) in pbE für eine Babymaus formuliert (Tab. 3).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

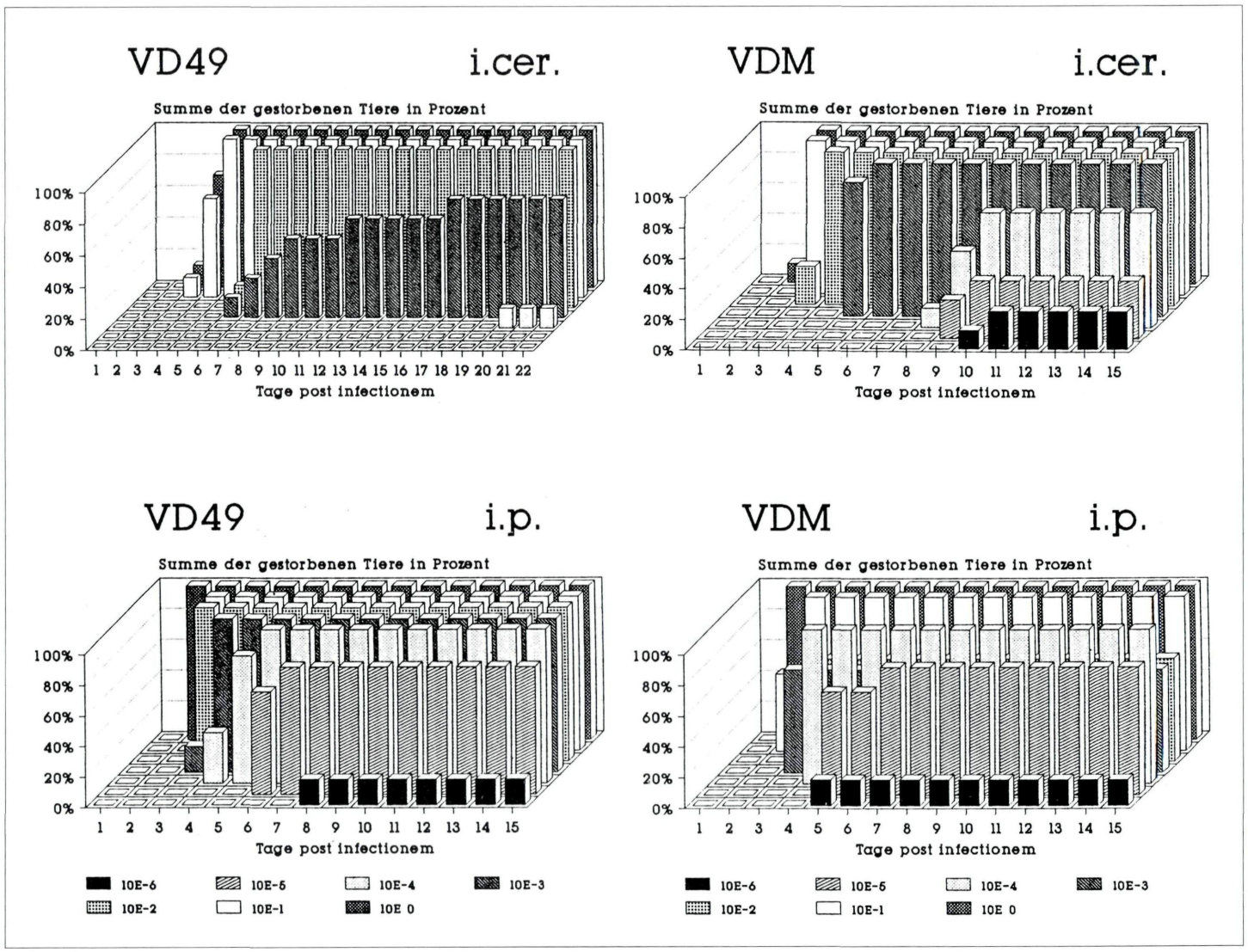

Abbildung 1:

Graphische Darstellung der Ergebnisse nach intrazerebraler und intraperitonealer Applikation der Kamelpockenvirus-Isolate VD49 und VDM in Babymäusen. Auf der Abszissenachse sind die Tage post infectionem (p.i.), auf der Ordinatenachse 1 die bis zu diesem Tag gestorbenen Tiere in Prozent und auf der Ordinatenachse 2 die Verdünnungsstufen der applizierten Dosen (unterschiedlich gemustert) dargestellt.

Der Stamm VDM zeigte folgende Charakteristika: Die LD_{50} für eine Babymaus betrug ca. 3 pbE unabhängig von der Applikationsweise. Innerhalb von zwölf Tagen verstarben alle erkrankten Tiere.

Beim Stamm VD49 war zum einen der Einfluß der Applikationsform auf die LD_{50} auffällig. So mußte i. z. mit 225 pbE die ca. 50fache Dosis gegenüber der i. p. Infektion (5 pbE) verabreicht werden, damit es zu Todesfällen kam. Zum anderen fällt im Vergleich mit VDM ein verzögerter Infektionsverlauf – bis zum Tag 20 noch Todesfälle – resp. eine verminderte Virulenz auf. Erst die 10- bis 100fache Dosis an pbE hatte eine dem VDM vergleichbare Wirkung (siehe Abb. 2).

Abschließend kann gesagt werden, daß Mäuse im Alter von 36 ±8 Stunden hoch empfänglich für CPV sind. Für weitere in vivo-Untersuchungen empfiehlt sich daher die Verwendung ein bis zwei Tage alter Mäuse.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

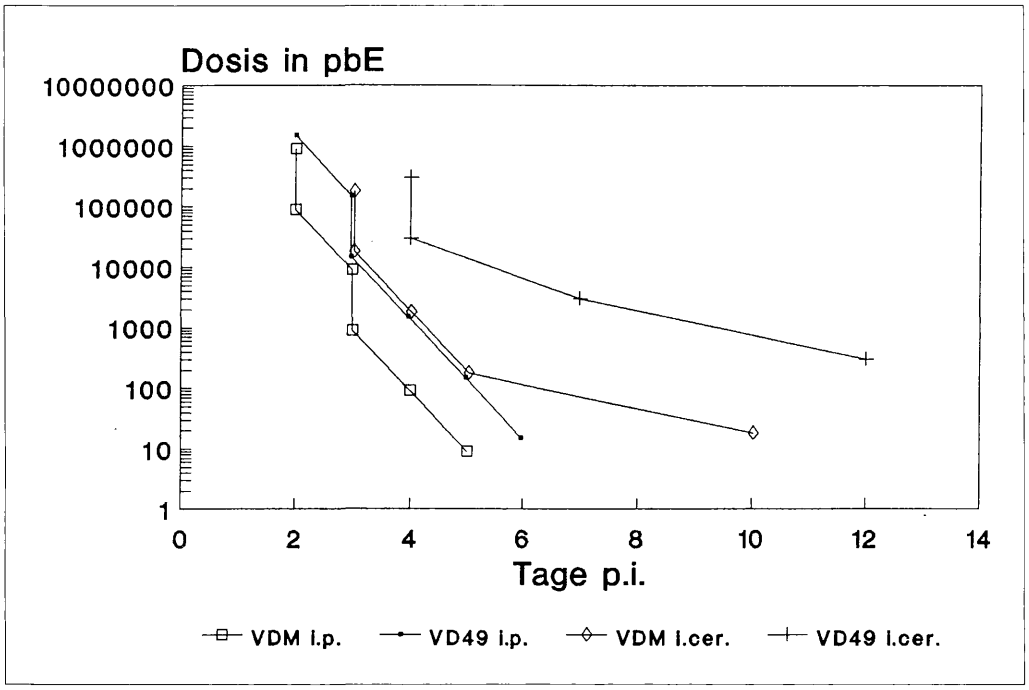

Abbildung 2:

Darstellung der Beziehung zwischen applizierter Dosis der Kamelpockenvirus-Isolate VDM sowie VD49 und Todeszeitpunkt infizierter Mäuse.
Auf der Abszissenachse ist die Zeit in Tagen p.i., auf der Ordinatenachse sind die pbE/Dosis logarithmisch aufgetragen. Als Todeszeitpunkt wurde der Tag definiert, an dem mehr als 50% der Tiere einer Versuchsgruppe gestorben waren.

Molekularbiologische Untersuchungen

Nach Gelelektrophorese der mit den Restriktionsenzymen Hind III bzw. Xho I verdauten CPV-DNS ergaben sich für die Isolate spezifische Wanderungsmuster. Die Bestimmung der Gesamtlänge erfolgte durch Summation der über einen Standard ermittelten Fragmentgrößen.

VDM:
Gesamtgenomlänge 194.000 bp
Xho I: 22 Fragmente zwischen 27 und 1,6 kbp
Hind III: 20 Fragmente zwischen 40 und 1,4 kbp

VD49:
Gesamtgenomlänge 167.000 bp
Xho I: 17 Fragmente zwischen 27 und 1,0 kbp
Hind III: 18 Fragmente zwischen 40 und 1,4 kbp

Mittels Southern Blot und DNS-DNS-Hybridisierung konnten physikalische Genomkarten erstellt werden (siehe Abb. 3). Durch die Cross-link-Präparation HindIII-verdauter DNS wurden für VDM die Fragmente 10,9 (F) und 8,5 kbp (H) und für VD49 die Fragmente 12,8 (E) und 7,9 kbp (J) als terminale Fragmente identifiziert.

Für beide Stämme erwies sich der linke und der mittlere Genombereich als nahezu identisch. Der rechte Genombereich hingegen war bei VD49 um ca. 27 kbp deutlich verkürzt.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß das Isolat VDM bezüglich der Genomlänge und der Verteilung der Restriktionsenzymschnittstellen den bisher untersuchten CPV-Isolaten sehr nahe kommt (9, 33). Das Isolat VD49 hingegen weist eine markante Verkürzung um 27 kbp im rechten Genombereich auf. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Verhaltens in Zellkuluturen sowie die geringere Pathogenität kann die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß diesem Isolat ein Teil der sogenannten „host-range-Gene" fehlen. Inwieweit dieser Verlust sich im Infektions- und Krankheitsverlauf bei Kamelen bemerkbar machte oder etwa durch die vorangegangene Kultivierung bedingt war, kann hier nicht beurteilt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse stellen die Grundlage für die phäno- und genotypische Charakterisierung der aus diesen Feldvirusstämmen durch Passagierung hervorgegangenen Varianten dar. Hierüber wird in Kürze berichtet werden (OTTERBEIN et al., in Vorbereitung).

Zusammenfassung

Nach einer kurzen synoptischen Darstellung der Kamelpocken werden im experimentellen Teil die biologischen und molekularbiologischen Charakteristika zweier afrikanischer Kamelpockenvirus-Isolate *(Orthopoxvirus cameli)* beschrieben, die aus Mauretanien (VDM) und dem Niger (VD49) stammen: Beide Stämme vermehren sich unter Ausbildung eines zytopathischen Effektes (cpE) in sieben Zellinien (BHK, Dubca, L929, MA-104, MDBK, MDCK, Vero). Der cpE war durch die Bildung vielkerniger Riesenzellen charakterisiert. Die Infektion von Dubca-Zel-

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

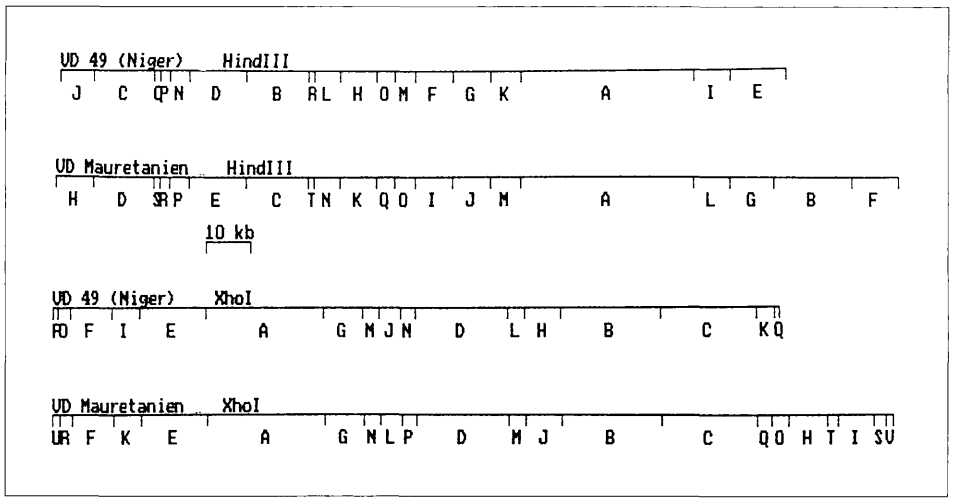

Abbildung 3:

Physikalische Genomkarten für die Kamelpockenvirus-Isolate VDM und VD49 nach Hind III- und Xho I-Digestion.

len (Kamelhautzellinie) mit VD49 führte zu einem deutlich niedrigeren Virus-Titer. Beide Stämme verursachten nach Infektion der Chorioallantoismembran am 6. Tag 0,2 bis 1 mm große, weiße Pocken ohne Anzeichen einer Generalisation. Die LD_{50} für eine ein bis zwei Tage alte Maus wurde nach intraperitonealer Infektion mit 3 bzw. 5 und nach intrazerebraler Infektion mit 3 bzw. 225 bpE ermittelt. Die Genomlänge betrug für VDM 194.000 und für VD49 167.000 Basenpaare. Im Vergleich mit VDM ist bei VD49 der rechte Genombereich verkürzt.

Die Ergebnisse stellen die Grundlage für den Vergleich mit Zellkultur-adaptierten CPV-Stämmen dar, die wir als potentielle homologe Impfstämme ansehen. Die Publikation der Charakterisierung dieser Zellkultur-attenuierten Varianten ist in Vorbereitung.

Schlüsselwörter

Orthopoxvirus cameli, biologische Eigenschaften, Genom.

Summary

Characterization of two african camelpoxvirus isolates

The introduction presents a synopsis of camelpox. The experimental part describes the biological and molecular biological characterization of two African camelpoxvirus isolates *(Orthopoxvirus cameli)* from Mauretania (VDM) and Niger (VD49) respectively: Both strains multiplied in 7 cell lines (BHK, Dubca, L292, MA-104, MDBK, MDCK, Vero) displaying a cytopathogenic effect (cpe). The cpe was characterized by the induction of polynucleated giant cells. However, it is remarkable that infection of Dubca cells (camel skin cell line) by VD49 leads to a significant lower virus yield. On the chorioallantoic membrane both strains caused proliferative pock lesions (0,2 mm to 1 mm diameter, white) six days post infection, generalization could not be observed. The LD_{50} for a 1 to 2 days old mouse was determined to be 3 resp. 5 plaque-forming units (pfu) after intraperitoneal and 3 resp. 225 pfu after intracerebral infection. The size of the VDM genome account for about 194,000 base paires and for VD49 167,000 base paires. Compared to VDM the right terminus of VD49 is truncated.

The results represent the basis for the comparison of cellculture-adapted camelpoxvirus strains. We consider these strains as potential homologue vaccines. Characterization of cell-culture-attenuated camelpoxviruses will be published in due course.

Key words *Orthopoxvirus cameli,* biological characterization, genome.

Danksagung Unser Dank gilt Frau Laura Chaudhuri und Frau Gudrun Zöller für ihre hervorragende Mitarbeit bei den labortechnischen Tätigkeiten.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Literatur

1. AL-FALLUJI, M. M., TANTAWI, H. H., SHONY, M. O. (1979):
Isolation, identification and characterization of camelpox virus in Iraq.
J. Hyg., Camb. 83, 267-272.

2. BAXBY, D. (1972):
Smallpox-like viruses from camels in Iran.
Lancet 2, 1063-1065.

3. BAXBY, D. (1974):
Differentiation of smallpox and camelpox viruses in cultures of human and monkey cells.
J. Hyg., Camb. 72, 251-254.

4. BINNS, M. M., MUMFORD, J., WERNERY, U. (1992):
Development of camel pox virus as a vaccine vector.
Proc. 1st Int. Camel Conf. 97-99.

5. BORISOVICH, YU. F. (1973):
Camelpox.
In: Orlov, F. M., 1973: Maloizvestnye zaraznye bolezni zhivotnykh, 2. Auflage.
Izdatel'stvo Kolos. Zitiert in Vet. Bull. 1974, 44,139.

6. BORISOVICH, YU. F., OREKHOV, M. D. (1966):
Camelpox.
Veterinariya, Moscow 3, 50-52. Zitiert in Vet. Bull. 1966, 36, 794.

7. CHAUHAN, R. S., KAUSHIK, R. K. (1987):
Isolation of camel pox virus in India.
Br. Vet. J. 143, 581-582.

8. DAVIES, F. G., MUNGAI, J. N., SHAW, T. (1975):
Characteristics of an Kenyan camelpox virus.
J. Hyg., Camb. 75, 381-385.

9. ESPOSITO, J. J., KNIGHT, J. C. (1985):
Orthopoxvirus DNA: A comparison of restriction profiles and maps.
Virol. 143, 230-251.

10. GESHELIN, P., BERNS, K. I. (1974):
Characterization and localization of the naturally occurring cross-links in vaccinia virus DNA.
J. Mol. Biol. 88, 785-796.

11. GOEBEL, S. J. et al. (1990):
The complete DNA sequence of vaccinia virus.
Virol. 179, 247-266.

12. HAFEZ, S. M. et al. (1992):
Development of a live cell culture camelpox vaccine.
Vaccine 10, 533-539.

13. HIGGINS, A. J. (1985):
The camel in health and disease: 6. Infectious diseases of the camel: viruses, bacteria and fungi.
Br. Vet. J. 141, 529-547.

14. HIGGINS, A. J., SILVEY, R. E., ABDELGHAFIR, A. E., KITCHING, R. P. (1992):
The epidemiology and control of an outbreak of camel pox in Bahrain.
Proc. 1st Int. Camel Conf., 101-104.

15. JEZEK, Z., KRIZ, B., ROTHBAUER, V. (1983):
Camelpox and its risk to the human population.
J. Hyg. Epidemiol. Mikrobiol. Immun. 27, 29-42.

16. KAADEN, O.-R., WALZ, A., CZERNY, C.-P., WERNERY, U. (1992):
Progress in the development of a camel pox vaccine.
Proc. 1st Int. Camel Conf., 47-49.

17. KAERBER, G. (1931):
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 162, 480.

18. KRIZ, B. (1982):
A study of camelpox in Somalia.
J. Comp. Path. 92, 1-8.

19. KROPP, E.-M. (1985):
Kamelpocken – eine synoptische Darstellung sowie der Nachweis von Antikörpern in Ostafrikanischen Dromedarseren mit einem ELISA.
Diss. Med. Vet., Ludwig-Maximilians-Universität München.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

20. MAHNEL, H. (1974):
Labordifferenzierung der Orthopockenviren.
Zbl. Vet. Med. B 21, 242-258.

21. MAHNEL, H., BARTENBACH, G. (1973):
Systematisierung des Kamelpockenvirus.
Zbl. Vet. Med. B 20, 572-576.

22. MARENNIKOVA, S. S., SHENKMAN, L. S., SHELUKHINA, E. L., MALTSEVA, N. N. (1974):
Isolation of camel pox virus and investigation of its properties.
Acta Virol. 18, 423-428.

23. MASSUNG et al. (1994):
Analysis of the complete genome of smallpox Variola Major virus strain Bangladesh 1975.
Virology 201, 215-240.

24. MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B., WITTMANN, G. (1974):
Virologische Arbeitsmethoden, Bd. 1: Zellkulturen, bebrütete Hühnereier, Versuchstiere.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

25. MEYER, H., RZIHA, H.-J. (1993):
Characterization of the gene encoding the A-type inclusion protein of camelpox virus and sequence comparison with other orthopoxviruses.
J. Gen. Virol. 74, 1679-1684.

26. MUNZ, E., KROPP, E.-M., REIMANN, M. (1986):
Der Nachweis von Antikörpern gegen Orthopoxvirus cameli in ostafrikanischen Dromedarseren mit einem ELISA.
J. Vet. Med. B 33, 221-230.

27. MUNZ, E. et al. (1986):
Serological and etiological investigations on camelpox in african dromedaries.
Proc. 5th Conf. Inst. Trop. Vet. Med. Kuala Lumpur, Malaysia, 75-76.

28. MUNZ, E., SCHILLINGER, D., REIMANN, M., MAHNEL, H. (1986):
Electron microscopical diagnosis of ecthyma contagiosum in camels (Camelus dromedarius).
First report of the disease in Kenya.
J. Vet. Med. B 33, 73-77.

29. MUNZ, E., MOALLIN, A. S. M., MAHNEL, H., REIMANN, M. (1990):
Camel papillomatosis in Somalia.
J. Vet. Med. B 37, 191-196.

30. OTTERBEIN, C. K. (1994):
Phäno- und genotypische Untersuchung zweier Kamelpockenvirusisolate vor und nach Attenuierung durch Zellkulturpassagen.
Diss. Med. Vet., Ludwig-Maximilians-Universität München.

31. PFAHLER, W., MUNZ, E. (1989):
Camelpox.
Int. J. Anim. Sci. 4, 109-114.

32. RAMYAR, H., HESSAMI, M. (1972):
Isolation, cultivation and characterization of camel pox virus.
Zbl. Vet. Med. B 19, 182-189.

33. RENNER-MÜLLER, I. C. E., MEYER, H., MUNZ, E. (1995):
Biological characteristics and genetic maps of camelpoxvirus isolates from Africa and Arabia.
Vet. Microbiol. 45, 371-381.

34. RICHARD, D. (1979):
Study of the pathology of the dromedary in Borana Awaraja (Ethiopia).
Diss. Med. Vet., Universität Creteil.

35. SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989):
Molecular cloning: A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

36. SEDOV, V. A. (1973):
Official communication: measures for the prevention and eradication of camel pox.
Veterinariya, Moscow 12, 63-64. Zitiert in: Vet. Bull. 1974, 44, 295.

37. TANTAWI, H. H. (1974):
Comparative studies on camel pox, sheep pox and vaccinia viruses.
Acta Virol. 18, 347-351.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

38. TANTAWI, H. H., EL-DAHABY, H., FAHMY, L. S. (1978):
Comparative studies on poxvirus strains isolated from camels.
Acta Virol. 22, 451-457.

39. WÜNSCH, A. B. (1992):
Zuchtgeschichte von sechs Mäuse-Inzuchtstämmen.
Diss. Med. Vet., Ludwig-Maximilians-Universität München.

Korrespondenzadresse: Dr. Christian Karl Otterbein
Institut für Mikrobiologie — Bereich Studien und Wissenschaft
Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr

Neuherbergstraße 11
D-80937 München · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1995

Band/Volume: 17

Autor(en)/Author(s): Otterbein Christian Karl, Meyer Hermann, Renner-Müller Ingrid, Münz Eugen

Artikel/Article: Charakterisierung zweier afrikanischer Kamelpocken virus-Isolate. 7-16