

Aus dem Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) in Greifswald - Insel Riems
und der Professur für Tiergesundheit und Tierschutz
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

Zusammenfassung der kumulativen Dissertation

**Serodiagnosis of influenza virus and
Newcastle disease virus – new molecular approaches**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Agrarwissenschaften (doctor agriculturae (Dr. agr.))

an der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von M. Sc. Na Zhao
aus Qiqihar/China

Verteidigung am 26. Mai 2023

In dieser Arbeit wurden mehrere rekombinante Proteine des Influenza A- Virus (IAV) und des aviären Paramyxovirus-1 (Newcastle Disease virus, NDV) in einem bakteriellen Expressionssystem exprimiert und diese in vitro in authentisch gefaltete Proteine konvertiert. Bakteriell exprimierte rekombinante Proteine von IAV und NDV wurden als diagnostische Reagenzien in indirekten ELISA Verfahren eingesetzt; das Expressionssystem erwies sich als schnell und kostengünstig, da auch eine technisch einfache Reinigungsmethode angewendet werden konnte. Die mit diesen rekombinanten Proteinen hier entwickelten serologischen Tests stellen eine mögliche alternative Methode zum Hämagglutinationshemmtest (HAH) dar, der als Goldstandard in der serologischen Diagnostik dieser Virusinfektionen gilt, jedoch zeitaufwändig und schwer zu standardisieren ist.

Wir haben gezeigt, dass das gut konservierte Influenza-Nukleokapsid (NP)-Protein, das mit dem Biotin-Tag verknüpft wurde, zum serologischen Nachweis verwendet werden kann, der zwischen einer Influenza-spezifischen und einer Infektion mit anderen Erregern von Atemwegserkrankungen unterscheidet. Im Vergleich zum HAH und zu kommerziellen kompetitiven ELISA-Tests ergab sich eine gute Übereinstimmung mit Seren aus experimentellen Infektionen als auch mit Feldseren. Daher kann die entwickelte Methode als Alternative zur routinemäßigen Serodiagnostik in Betracht gezogen werden. Im Gegensatz dazu zeigte der stark variable Teil des IAV-HA-Proteins (HA1) als diagnostisches Antigen eine gewisse Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Subtypen. Obwohl trunkierte HA1-Proteine in indirekten ELISAs eine interessante Alternative zum HAH darstellen, war es nicht möglich, sie zur serologischen Subtypisierung oder zu einer linienspezifischen Diskriminierung porciner Influenzaviren zu verwenden.

Die bakteriell exprimierten rekombinanten NDV Volllängenproteine NP und P von NDV zeigten als Antigene in indirekten ELISA Verfahren ebenfalls einen gewissen Grad an Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Serotypen aviärer Paramyxoviren. Die Kreuzreaktivität wurde jedoch aufgehoben, wenn lediglich ein gering konserviertes C-terminales Fragment des NP von NDV in APMV-Subtyp-spezifischen ELISA-Assays verwendet wurde. In reziproker Weise funktionierte ein C-terminales NP Fragment des APMV Subtyps 8. Zur serologischen Unterscheidung geimpfter und infizierter Tiere werden sogenannte DIVA-Tests eingesetzt. Der von uns entwickelte DIVA-Test für NDV basierte auf bakteriell exprimierten viralem V Protein, das im Wesentlichen in infizierten Zellen exprimiert, jedoch nicht oder nur in Spuren in Virionen eingebaut wird. Allerdings erwies sich dieser Test als nicht ausreichend diskriminativ und kann daher nicht für die serologische DIVA-Strategie für das APMV-1-Virus verwendet werden.

Im letzten Teil der Studie wurde ein kompetitiver Suspensionstest basierend auf der Luminex ® Bead - Technologie entwickelt. In diesem Test sollten Antikörper gegen Influenza A Viren und NDV gleichzeitig in Geflügelseren gemessen werden. Dieses Testdesign bietet Vorteile in Bezug auf einen hohen

Durchsatz, Zeitersparnis und Speziesunabhängigkeit. In unserer Pilotstudie mit Seren aus experimentellen Infektionen und aus dem Feld ergaben sich gute Leistungsdaten hinsichtlich Sensitivität und Spezifität. Da das Luminex Bead System die Kombination von bis zu 500 unterschiedliche Testantigene erlaubt, hat diese Testplattform erhebliches Erweiterungspotenzial zum Nachweis von Antikörpern auch gegen weitere relevante Krankheitserreger.