

Amtliche Methodensammlung

Schmallenberg-Virus

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Schmallenberg-Virus

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Das erstmals im Herbst 2011 in Deutschland nachgewiesene, durch Gnitzen (blutsaugende Mücken) übertragene Schmallenberg-Virus (SBV) gehört zur Familie *Bunyaviridae*, Genus Orthobunyavirus. Vergleichende Analysen des Erbmaterials ergaben, dass es sich um ein Virus aus der Simbu-Serogruppe handelt, Vertreter dieser Serogruppe (z. B. Sathuperi-, Shamonda-, Aino- und Akabane-Virus) sind bisher nur in Australien, Asien, Afrika und Südamerika nachgewiesen worden.

Beginnend im deutsch-niederländischen Grenzgebiet hat sich SBV innerhalb kürzester Zeit deutschlandweit und über weite Teile Europas ausgebreitet.

1.2 Klinische Symptomatik

SBV löst Erkrankungen vor allem bei Wiederkäuern aus. Infizierte adulte Tiere zeigen keine oder kurzzeitig milde Symptome wie Fieber, Milchleistungsrückgang oder Durchfall. Die Virämie dauert nur wenige Tage an, virales Genom ist etwa 5 bis 6 Tage im Blut akut infizierter Tiere nachzuweisen.

Werden Tiere allerdings während einer empfänglichen Phase der Trächtigkeit, Rinder mutmaßlich zwischen dem 75. und 175. Tag und Schafe etwa zwischen dem 30. und 50. Tag, infiziert, können schwere kongenitale Schäden auftreten. Die durch die Viren der Simbu-Serogruppe induzierten Missbildungen werden unter dem Begriff „Arthrogrypose-Hydranenzephalie-Syndrom“ (AHS) zusammengefasst. Auftreten können verschiedenste Grade von Por- oder Hydranenzephalie (Lückenbildung in der Hirnsubstanz bis hin zum völligen Verlust des Großhirns unter Umbildung in eine flüssigkeitsgefüllte Blase), ein Torticollis (fixierte Kopffehlstellung) oder eine Arthrogrypose (Gelenkversteifung in Beugestellung). Weiterhin sind Spätaborte, mumifizierte Föten oder Totgeburten möglich, in den meisten Fällen kommt es aber zur Geburt klinisch unauffälliger Nachkommen. Nach einer Infektion zu einem späteren Trächtigkeitzeitpunkt ist auch die Geburt serologisch positiver Kälber und Lämmer möglich, persistente SBV-Infektionen wurden bisher nicht nachgewiesen. Nach den bisherigen Beobachtungen verläuft eine Infektion mit SBV im Schaf effizienter als im Rind.

Einmal mit SBV infizierte Tiere bilden einen Immunschutz aus und sind nach bisherigen tierexperimentellen Untersuchungen und Kenntnissen zu verwandten Viren in der Regel vor einer erneuten Infektion geschützt.

1.3 Differentialdiagnose

Aufgrund des meist kurzzeitigen, milden und unspezifischen klinischen Bildes in adulten Wiederkäuern sind als Differentialdiagnosen viele andere Erkrankungen viraler, bakterieller und nicht-infektiöser Genese denkbar. Im Fall von pränataler SBV-Infektion kommen alle Infektionen/Zustände, die zu Fruchtbarkeitsstörungen, kongenitalen Missbildungen und Aborten führen, in Frage.

1.4 Diagnostische Indikation

Bei gehäuftem Auftreten von kongenitalen Missbildungen in Rinder-, Schaf- oder Ziegenbeständen sollte immer auch an eine mögliche SBV-Infektion gedacht werden.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungseinrichtungen in den Ländern
- Nationales Referenzlabor für SBV am Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald - Insel Riems, Tel. 0383517-1212

1.6 Rechtsgrundlagen

Bei der Infektion mit dem Schmallenberg-Virus handelt es sich um eine meldepflichtige Tierkrankheit (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Februar 2011 (BGBl. I S. 252), die zuletzt durch Artikel 5 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388) geändert worden ist).

2. Untersuchungsmaterial

Geeignete Probenmaterialien zum Nachweis akut infizierter adulter Tiere sind Serum oder EDTA-Blut. Erfolgversprechend ist aber nur die Untersuchung von Probenmaterial, das während der sehr kurzen klinischen Phase (Fieber, Durchfall, Milchrückgang) entnommen wurde. Probenmaterial der Wahl für den Antikörpernachweis ist Serum.

Der Erregernachweis bei Aborten, Totgeburten oder missgebildet geborenen Lämmern oder Kälbern erfolgt zunächst aus dem Gehirn. Als ergänzendes Probenmaterial kommen insbesondere Herzblut, Milz, Fruchtwasser (Felltupfer, Innenohr, Magen) und Mekonium in Frage. Allerdings ist selbst bei typischen Missbildungen mitunter kein Virus mehr nachweisbar, was auch für nahverwandte Viren beschrieben wurde. In diesen Fällen kann durch den Nachweis SBV-spezifischer Antikörper im Fötus die Ätiologie abgeklärt werden. Bei Totgeburten ist hier Herzblut als Probenmaterial geeignet. Werden verdächtige Tiere lebend geboren, sollten Serumproben unbedingt vor der Kolostrumaufnahme genommen werden, da andernfalls der Antikörpernachweis nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt.

Vereinzelt wurde SBV-Genom im Sperma infizierter Bullen nachgewiesen. Der zuverlässige SBV-Nachweis aus Frischsperma und Spermapailletten hängt entscheidend von der Verwendung geeigneter Extraktionsverfahren ab.

Die zu untersuchenden Proben sind unbedingt gekühlt oder gefroren zu transportieren. Im Anschreiben ist anzugeben, wer einsendet, was eingesandt wird (Art des Materials, von welchen Tieren, Anzahl etc.), aus welchem Bestand die Proben stammen und was im entsprechenden Bestand festgestellt wurde (anamnestischer Kurzbericht).

3. Untersuchungsgang

3.1 Virusnachweis

Die Polymerase-Ketten-Reaktion in Echtzeit (real-time PCR) dient dem Nachweis von Virusgenom in Blut-, Gewebe- oder Organproben. Kleine Fragmente viraler RNA werden durch die PCR zu nachweisbaren Mengen amplifiziert. Da sich mit diesem Test nur virales Genom nachweisen lässt, kann die PCR auch einen Positivbefund ergeben, wenn kein lebensfähiger Infektionserreger mehr vorhanden ist (z. B. in autolytischen Geweben). Der Nachweis von SBV-RNA in Blut- bzw. Organproben kann mittels verschiedener kommerziell erhältlichlicher Kits erfolgen. Zusätzlich kommen real-time RT-PCR Verfahren entsprechend den Literaturangaben zur Anwendung (Bilk et al. 2012 [Vet Microbiol. 2012 Sep 14;159(1-2):236-8.], Fischer et al. 2013 [Virology 2013 Nov 5;10(1):327.]).

Weiterhin kann eine Virusanzucht auf Insekten- und Hamsterzelllinien versucht werden.

Für den sicheren Nachweis von SBV-Genom mittels real-time PCR aus Frischsperma und Spermapailletten ist das verwendete Verfahren zur Extraktion viraler RNA aus den Proben entscheidend.

Nukleinsäureextraktion aus Bullensperma

Im Rahmen umfangreicher Validierungsstudien hat sich das im Folgenden beschriebene Protokoll als das sensitivste Extraktionsverfahren erwiesen, es kombiniert eine TRIzol® LS Reagent-basierte Lyse mit einer RNA-Reinigung basierend auf magnetischen Partikeln.

Mittels TRIzol® LS Reagent werden die Zellen lysiert und Zellbestandteile aufgelöst. Durch die Zugabe von Chloroform und die folgende Zentrifugation wird die Lösung in 3 Phasen separiert: eine wässrige (klare), die die RNA enthält, eine Interphase und eine organische (Phenol/Chloroform) Phase. Die RNA befindet sich ausschließlich in der klaren Phase. Durch Zugabe von Isopropanol wird die RNA der Probe ausgefällt. Diese RNA wird an Silicapartikel, die Eisenkerne enthalten, aus dem MagAttract VirusMini M48 Kit (Qiagen) gebunden, was im Folgenden eine Aufreinigung über Magneten ermöglicht. Die zur weiteren Reinigung erforderlichen Wasch- und Elutionsschritte der Silicapartikel werden anschließend durch Überführen der magnetisch gebundenen Partikel in verschiedene Pufferlösungen automatisiert entsprechend der Herstellerangaben abgearbeitet.

Durchführung:

- Vorlage von 750 µl Trizol LS Reagent in ein beschriftetes 2 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe von 250 µl Probe, Lysat 15 s kräftig per Hand schütteln, 5 s bei 8000 rpm zentrifugieren, Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 200 µl Chloroform, Lysat-Chloroform-Gemisch kräftig 15 s per Hand schütteln, Inkubation für 5 - 10 min bei Raumtemperatur, Zentrifugation: 13000 rpm bei 4 °C für 10 min
- vorsichtig und langsam 425 µl der oberen wässrigen Phase in eine Deepwell-Platte überführen

- 20 µl MagAttract Suspension B (Beads) zugeben (ACHTUNG: gut und lange (mind. 1 min) vortexen; nur für 1 - 3 Reihen aufziehen, zügig arbeiten, da Combitip-Spitze schnell verstopft; zwischendurch wiederholt vortexen)
- 250 µl Isopropanol (2-Propanol) zugeben, optionale Zugabe von 10 µl IC2 RNA
- Verschließen der Platte mit Aluminiumfolie
- Platte zum Mischen kurz schütteln (z.B.: Eppendorf Thermomixer 1000 rpm für 30 s) und kurz zentrifugieren
- Bestücken des Extraktionsautomaten entsprechend der Herstellerangaben, Waschschritte entsprechend der Angaben des Herstellers des Extraktionskits

Zur sicheren Analyse von Spermachargen sollten mindestens zwei Pailletten extrahiert (biologische Replikate) und in der RT-qPCR doppelt untersucht werden (technische Replikate).

Alternative Extraktionskits bzw. -geräte können verwendet werden, allerdings sollten diese alternativen Verfahren im Vorfeld validiert und vergleichend zu dem empfohlenen Verfahren getestet werden.

3.2 Antikörpernachweis

Neutralisierende SBV-spezifische Antikörper sind ab etwa zwei Wochen nach einer Infektion nachweisbar. Für die Detektion mittels ELISA sind mehrere kommerzielle ELISA-Kits verfügbar, die Anwendung erfolgt nach Empfehlungen der entsprechenden Hersteller.

Zur Bestätigung und zur Abklärung möglicherweise auftretender Kreuzreaktionen mit anderen Viren der Simbu-Serogruppe stehen der Neutralisationstest und der indirekte Immunfluoreszenztest zur Verfügung.

Neutralisationstest

Der Neutralisationstest ist die empfindlichste und zuverlässigste Methode zum Nachweis von SBV-spezifischen Antikörpern. Dieser Test basiert auf einer *in vitro* Neutralisation einer definierten Virusmenge durch spezifische neutralisierende Antikörper in Seren. Durch logarithmische Verdünnung der Seren wird der neutralisierende Antikörpertiter bestimmt. Die Ablesung der Testergebnisse erfolgt durch Beurteilung eines zytopathischen Effektes (CPE).

Der Neutralisationstest wird routinemäßig mit Serum durchgeführt. In Ausnahmefällen, wenn kein Serum zur Verfügung steht, kann der Test auch mit Plasma durchgeführt werden. Verdünnungen < 1 : 20 sind dann aber i. d. R. nicht oder nur eingeschränkt auswertbar. Für die Verwendung im Neutralisationstest werden die Seren für 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Verdünnungsreihen: Der Test wird in 96-well-Mikrotiterplatten unter Verwendung von Zellkulturmedium mit Antibiotikazusatz durchgeführt. Es wird eine Serumverdünnungsreihe in 2er-Stufen von 1 : 5 bis

Schmallenberg-Virus

1 : 640 mit je einem Volumen von 50 µl pro Kavität hergestellt. Pro Serumverdünnungsstufe werden zwei oder vier Kavitäten (Doppelansatz, bzw. Vierfachansatz) nebeneinander beschickt. In die Kavitäten der ersten Vertiefungsreihe werden 80 µl, in die Kavitäten der anderen Reihen 50 µl Kulturmedium vorgelegt. Zur ersten Vertiefungsreihe wird dann 20 µl Serumprobe zugegeben. Mit einer Multikanalpipette werden aus der ersten Verdünnungsstufe (1 : 5 Verdünnung) 50 µl aufgenommen, in die nächste Reihe gegeben, durchmischt, und die Verdünnungsreihe fortgesetzt (8 - 12 Verdünnungsstufen). Die letzten 50 µl werden verworfen. Jede Kavität enthält jetzt 50 µl einer Serum-Medium-Verdünnung. Das positive Referenzserum und ein bekannt negatives Serum werden in gleicher Weise als Kontrollen ausverdünnt.

Testvirus: In jede Kavität werden danach 50 µl mit 100 KID₅₀ der Testvirussuspension gegeben. Die Testvirussuspension muss unmittelbar vor Gebrauch mit Kulturmedium auf 100 KID₅₀/50 µl (2000 KID₅₀/ml) eingestellt werden. Die benötigte Menge an Testvirus (ca. 5 ml pro Mikrotiterplatte) ist in einem Ansatz herzustellen. Um die Testvirussuspension auf 100 KID₅₀/50 µl einzustellen, wird der Verdünnungsfaktor rechnerisch ermittelt.

Rechenbeispiel:

Die im Neutralisationstest zum Einsatz kommende Virussuspension (Testvirus) soll einen Titer von 100 KID₅₀/50 µl haben. Folglich muss das hochtitrigere Ausgangsvirus entsprechend verdünnt werden.

Die Berechnung des Verdünnungsfaktors erfolgt nach der Formel:

Titer $\log_{10} \text{KID}_{50}/0,1 \text{ ml Ausgangsvirus minus } 10^{2,3} = \log_{10} \text{ Virusverdünnung; entlogarithmieren.}$

Reziproker Wert = Virusverdünnung (* $10^{2,3} = 200 \text{ KID}_{50} \text{ pro } 0,1 \text{ ml}$)

Beispiel: Der Titer des Ausgangsvirus beträgt $10^{6,3} \text{ KID}_{50}/\text{ml}$. Das sind $10^{5,3} \text{ KID}_{50}/0,1 \text{ ml}$.

Berechnung: $10^{5,3} - 10^{2,3} = 10^3$

Entlogarithmierung $3,0 \log_{10} = 1000$

Das Ausgangsvirus muss also 1 : 1000 in Kulturmedium verdünnt werden.

Kontrollen: Neben den positiven Serumkontrollen werden eine Zellkontrolle (100 µl Kulturmedium ohne Serum und Virus), je zu testendes Serum eine virusfreie Serumkontrolle (1 : 5 Basisverdünnung) und eine Viruskontrolle mitgeführt. In jedem Test wird außerdem eine Rücktitration des Testvirus zur Bestimmung der eingesetzten KID₅₀ vorgenommen. Mit der Rücktitration kontrolliert man den tatsächlichen Virusgehalt im Test. Hierbei wird die im Test eingesetzte Virusverdünnung in log-2-Schritten als Doppel- oder Vierfachansatz, beginnend bei 1 : 10 bis 1 : 1280 ausverdünnt. 180 µl Kulturmedium werden vorgelegt, 20 µl 1 : 10 verdünnte Testvirussuspension dazugegeben und anschließend ausverdünnt.

Neutralisation: Die Mikrotiterplatte inkubiert daraufhin für 2 Stunden bei 37 °C in einer feuchten Umgebung in einem CO₂-Schrank (2,5 % bzw. 5 % CO₂). Während dieser Zeit findet der Neutralisationsprozess statt.

Zellsuspension: Nach der Inkubationszeit werden in jede Kavität 100 µl der entsprechenden Zellsuspension hinzugefügt. Die Zelldichte muss so eingestellt sein, dass nach 24 Stunden ein konfluenten Zellrasen entsteht. Die Mikrotiterplatte verbleibt zur Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Umgebung im CO₂-Schrank (2,5 % bzw. 5 % CO₂).

Auswertung: Die Auswertung erfolgt über die Beurteilung des zytopathischen Effektes. Die Endablesung erfolgt am 3. bis 4. Tag nach dem Ansetzen des Testes. Der Test ist valide, wenn die Rücktitration zwischen 30 KID₅₀ und 300 KID₅₀ liegt und das positive Kontrollserum den angegebenen Titer (+/- eine log₂ Stufe) aufweist.

Die Berechnung des Antikörpertiters erfolgt als ND₅₀ nach Behrens und Kaerber:

Neutralisationstiter = $V - d \times (S - 0,5)$

V: lg der ersten 100 % pos. Serumverdünnung

D: lg des Verdünnungsfaktors (i.d.R. 0,3)

S: Summe der pos. Reagenten bis 100 %/Reagentenzahl je Verdünnung

Immunfluoreszenztest

Neben dem Neutralisationstest und ELISA-Techniken kann ein indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) an mit SBV infizierten Zellkulturen eingesetzt werden. Der Test basiert auf einer Bindung von SBV-Antikörpern in Rinder- und Schafseren an eine virusantigenhaltige Matrix (virusinfizierte Zellkultur). Die Bindung wird mit einem FITC-anti-Spezies-Antikörper (Konjugat) visualisiert.

Der IIFT kann an Seren oder Plasma durchgeführt werden. Eine Inaktivierung ist i. d. R. nicht erforderlich.

Herstellung der virusinfizierten Testmatrix: Durch Vermehrung von SBV in BHK-21-CT-Zellen (Sammlung von Zellkulturen für die Veterinärmedizin (CCLV), Insel Riems, L164) oder einer anderen empfänglichen BHK-Sublinie wird ein Masterstock hergestellt, aliquotiert und titriert. Die Virusernte erfolgt bei 100 % lytischem CPE, der i. d. R. in BHK-CT-Zellen nach 3 Tagen erreicht ist. Die BHK-21 Sublinie BSR5 (epitheloides Zellbild, CCLV L194) zeigt keinen lytischen CPE. Hier werden nach 2 - 3 Tagen Ansammlungen von Rundzellen prominent, wobei der Monolayer lange erhalten bleibt. Wegen dieser Eigenschaft sind BHK-21 BSR5-Zellen als Testmatrix für den Immunfluoreszenztest besonders geeignet. Alternativ können auch Vero-Zelllinien eingesetzt werden, die jedoch zu unspezifischen Anfärbungen neigen.

Eine BHK-21 BSR5-Zellsuspension wird auf 96-well Gewebekulturplatten zu je 100 µl/Well ausplattiert und 24 h bei 37 °C im CO₂ Schrank (2,5 % bzw. 5 % CO₂) inkubiert. Am folgenden Tag (~ 90 % geschlossener Monolayer) werden die senkrechten Reihen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 mit jeweils 100 - 200 KID₅₀ SBV inokuliert.

Rechenbeispiel:

Titer des Masterstockvirus 10^{6,0}/ml (10^{3,0}/µl)

1 : 100 Verdünnung \cong 10^{1,0} /µl

Inokulation von 20 µl \cong 200 KID₅₀/well

Schmallenberg-Virus

Die infizierten Platten werden für 2 - 3 Tage bei 37 °C unter CO₂ Bedingungen inkubiert. Bei Sichtbarwerden von multiplen Herden apoptotischer Zellen (tägliche mikroskopische Kontrolle, gut ausgeprägt bei Vero-Zellen, weniger gut bei BHK-21 BSR5-Zellen) wird das Medium abgesaugt, die Platte einmal vorsichtig mit TBST gewaschen und luftgetrocknet (Fön oder über Nacht bei Zimmertemperatur). Die Herde sollten keinesfalls konfluieren, da die Beurteilung an 100 % infiziertem Monolayer schwierig ist. Die Fixierung erfolgt im Wärmeschrank für 2 h bei 80 °C.

Die Platten können für 2 - 3 Tage im Kühlschrank gelagert werden oder werden bei -20 °C über längere Zeit aufbewahrt.

Durchführung der Immunfluoreszenzreaktion: Seren werden in einer Verdünnung von 1 : 100 getestet. Dazu werden jeweils 100 µl der Verdünnung in ein infiziertes Well und ein Kontrollwell gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (2-mal kurz, 1-mal 5 - 10 min) erfolgt eine Inkubation mit 100 µl FITC-markiertem Anti-Spezies Konjugat (z. B. Anti Bovine IgG-FITC, SIGMA, F7887, 1 : 400 Anti-sheep IgG-FITC, SIGMA, F5137, 1 : 400) wiederum für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend 3-mal Waschen (2-mal kurz, 1-mal 5 - 10 min), 50 µl A.dest oder Fluoreszenzerhaltungspuffer (1 : 1 mit A. dest).

Auswertung im inversen Fluoreszenzmikroskop.

Waschpuffer: TBST

Proben- und Konjugatverdünner: TBST

0,05 M Tris

0,138 M NaCl

0,0027 M KCL, pH 8,0

0,05 % Tween20

(SIGMA, T-9039, Tris buffered saline with Tween 20, pH 8,0)

Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO): SIGMA Best.-Nr. D 2522

2,5 g 1,4-Diazobicyclo[2,2,2]-octan (DABCO)

in 90 ml Glycerol lösen (37 °C, Wasserbad)

+ 10 ml PBS

pH mit HCl konz. auf 8,6 einstellen (wenige Tropfen)

für rote Kernfärbung: zu 100 ml Fluoreszenzpuffer 100 µl Propidiumiodid-Stammlösung (2 mg/ml) zugeben
-> 1 : 1000 = 4 µl zu 4 ml geben

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.bund.de