FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methodensammlung

# Klassische Schweinepest

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Klassische Schweinepest

# 1. Charakterisierung der Infektion

## 1.1 Erreger

Der Erreger der Klassischen Schweinepest (KSP) ist ein lipidumhülltes RNA-Virus des Genus *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae*. ~~Er~~ Das KSP-Virus (KSPV) ist verwandt mit den für die Virusdiarrhoe des Rindes (BVD) und die Border Disease des Schafes (BD) verantwortlichen Pestiviren. Diese Verwandtschaft ist für die KSP-Diagnostik insofern bedeutsam, als Kreuzreaktionen auftreten, die zu falsch-positiven Laborbefunden führen können. In den letzten Jahren wurden darüber hinaus diverse neue Pestiviren beschrieben (für Schweine z. B. das sogenannte atypische porzine Pestivirus, APPV), die aber bislang nicht zu relevanten Kreuzreaktionen geführt haben.

Das KSPV ist in Exkreten infizierter Schweine, in Schlachtkörpern, frischem Schweinefleisch und bestimmten Schweinefleischerzeugnissen (z. B. Rohwurstprodukten) relativ stabil. Es lässt sich durch Detergenzien, flüssige Lösungsmittel, Proteasen und gängige Desinfektionsmittel wirksam ~~abtöten~~ inaktivieren.

## 1.2 Klinische Symptomatik

Die KSP ist eine seuchenhaft verlaufende Infektionskrankheit der Haus- und Wildschweine und kann - abhängig von Wirts- und Erregereigenschaften sowie dem Infektionszeitpunkt (prä- oder postnatal) - in der akuten, chronischen oder "late onset" Verlaufsform auftreten. Besonders die letzteren beiden Formen bereiten Schwierigkeiten bei der klinischen Diagnose und tragen so in besonderem Maße zur Verbreitung des Virus bei. Die meisten Schweine in einer Herde erkranken an der akuten Form der KSP. Je nach Alter des Tieres, seiner Konstitution und Kondition, kann die akute Infektion entweder transient oder letal verlaufen. Bei der akut-letalen Form sind die Symptome in der Regel ausgeprägter als bei der transienten Form, die mild oder sogar subklinisch verläuft. Die Mortalität ist bei Jungtieren wesentlich höher als bei adulten Schweinen.

Die Inkubationszeit der KSP beträgt rund eine Woche. Zu den frühen, eher unspezifischen Symptomen gehören hohes Fieber, Appetitlosigkeit, Bindehautentzündung und Bewegungsunlust. Die Tiere liegen in Haufen übereinander und verhalten sich auch beim Betreten des Stallabteils auffällig ruhig. Nasenausfluss sowie diverse, häufig durch Sekundärinfektionen hervorgerufene respiratorische und gastrointestinale Symptome können hinzutreten.

Im weiteren Verlauf zeigen die kranken Tiere unsichere Bewegungen, Zittern und schließlich eine Hinterhandparese. In der Spätphase der akut-letalen Erkrankungsform kann sich ein hämorrhagisches Syndrom entwickeln: Zyanotische Verfärbungen des Abdomens, der Schnauze und der Ohren sowie der medialen Teile der Gliedmaßen, petechiale bis hin zu landkartenähnliche Blutungen in äußerer Haut und Schleimhäuten. Labordiagnostisch ist eine Leukopenie und Thrombozytopenie feststellbar, die bei den akut erkrankten

Schweinen bis zum Tode bestehen bleiben. Eine Übersicht des akuten klinischen Verlaufes ist in Abbildung 1 dargestellt.

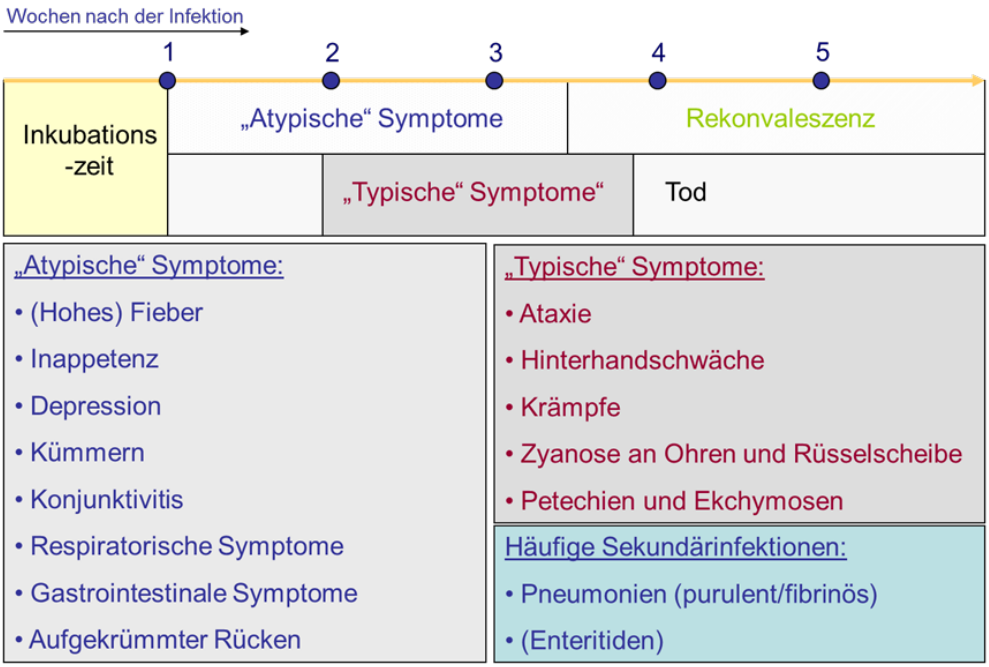


*Abbildung 1: Symptome der akuten KSP*

Wenige Schweine, die nach der akuten Infektionsphase weder genesen noch sterben, entwickeln die chronische Form der KSP (Abb. 2).

## Klassische Schweinepest

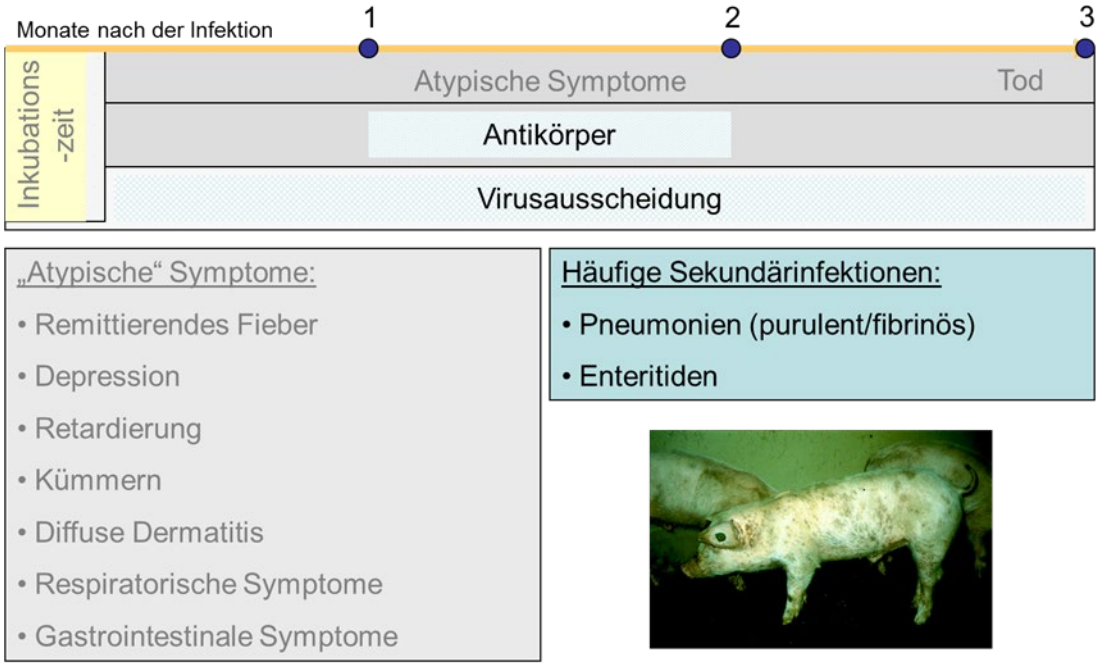


*Abbildung 2: Chronische Verlaufsformen der KSP*

Dieser Krankheitsverlauf ist durch einen protrahierten Verlauf gekennzeichnet. Die klinischen Erscheinungen ähneln denen der akuten Infektion, treten jedoch schwächer in Erscheinung. Die betroffenen Tiere bleiben bis zu ihrem Tode über einen Zeitraum von mehreren Monaten virämisch. Es kommt abwechselnd zu Phasen klinischer Besserung mit nachlassendem Fieber gefolgt von erneuten Krankheitsschüben mit Symptomen wie Anorexie, Fieber, Durchfall, Alopezie und Dermatitis. Die Tiere zeigen deutliche Entwicklungsrückstände und kümmern. In einer betroffenen Herde sind sowohl die akut-letale, als auch die transiente Form der KSP zu beobachten. Chronische Formen sind unter Feldbedingungen beim Hausschwein nur selten zu beobachten, z. B. wenn eine Infektion in einer Herde lange unerkannt bleibt.

Das KSP-Virus kann in tragenden Tieren, die nur transient (milde Verlaufsform) erkranken, die Plazentaschranke überwinden und die Feten infizieren („carrier sow syndrome“). Abhängig vom Trächtigkeitsstadium kommt es zu embryonalem bzw. fetalem Tod, zu teratogenen Veränderungen unterschiedlichster Art, zur Geburt moribunder oder toter Ferkel, oder zur Geburt gesunder, persistent virämischer Ferkel. Die zuletzt genannten Ferkel können über einen Zeitraum von Wochen oder Monaten klinisch unauffällig bleiben, bis sie die Spätform („late onset disease") der Schweinepest entwickeln. Als einziger klinischer Hinweis wäre ein Wachstumsrückstand (Kümmern) gegenüber den Wurfgeschwistern zu nennen. Sie sind dem KSPV gegenüber immuntolerant, bilden keine homologen Antikörper und scheiden permanent KSPV aus. Somit stellen sie eine dauernde Infektionsquelle dar und sorgen für die Verbreitung des Erregers innerhalb der Population. Nach mehreren Wochen oder Monaten verschlechtert sich der Gesundheitszustand solcher Tiere und sie

sterben. Die längste Überlebenszeit für persistent infizierte Ferkel ist mit elf Monaten angegeben worden. Das carrier sow syndrome mit der Folge eines late onset Verlaufes sind zwar seltene Ereignisse, spielen aber in der Epidemiologie der KSP eine Schlüsselrolle, die häufig unterschätzt wird. Kürzlich wurde gezeigt, dass auch die frühe postnatale Infektion (bis zu 72 Stunden nach der Geburt) bei Ferkeln eine chronische/persistierende Infektion auslösen kann (in der Literatur als postnatale Persistenz bezeichnet). Die klinischen Anzeichen ähneln der chronischen Verlaufsform. Die betroffenen Tiere scheiden konstant große Mengen KSPV aus und bilden keine Antikörper.

## 1.3 Differentialdiagnose

Neben der Afrikanischen Schweinepest (ASP) gehören bakterielle Septikämien, Circovirusinfektionen und die Aujeszkysche Krankheit zu den vorrangigen Differentialdiagnosen. Aufgrund des variablen klinischen Bildes kommen jedoch auch viele andere Erkrankungen viraler, bakterieller und nicht-infektiöser Genese in Frage.

Der Nachweis der Klassischen Schweinepest kann sich vor allem in Zuchtbeständen als schwierig erweisen, in denen die Seuche möglicherweise sehr mild verläuft und daher mit vielen anderen pathologischen Zuständen verwechselt werden kann.

## 1.4 Diagnostische Indikation

Gemäß Schweinepest-Verordnung.

## 1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsämter der Länder. Bestätigung und Virustypisierung durch das Friedrich-Loeffler-Institut (Nationales Referenzlabor für Klassische Schweinepest), Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems.

## 1.6 Rechtsgrundlagen

- Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung
- Richtlinie 2001/89/EG sowie
- Entscheidung 2002/106/EG (Diagnostik-Handbuch)

## 2. Untersuchungsmaterial

Bevor mit der Probennahme in einem seuchenverdächtigen Betrieb begonnen wird, ist ein Grundriss des Betriebs anzufertigen, auf dem die epidemiologischen Untereinheiten eingezeichnet sind. Wenn zu erwarten ist, dass eine Zweitbeprobung notwendig werden könnte, sind die betreffenden Schweine unverwechselbar in einer Weise zu kennzeichnen, dass sie leicht erneut beprobt werden können. Allen Proben müssen bei der Beförderung zum Labor die von der zuständigen Behörde vorgegebenen Formulare beiliegen, die Angaben zur Krankheitsgeschichte der beprobten Schweine sowie über die klinischen Symptome bzw. Sektionsbefunde enthalten. Es sind genaue Angaben über Alter, Kategorie und Herkunftsbetrieb der beprobten Tiere zu machen. Es wird empfohlen, den Standort jedes beprobten Schweins, zusammen mit seinem Einzelkennzeichen zu erfassen.

**Untersuchungsmaterial zum Erregernachweis:**
Der Erregernachweis (virologische Untersuchungen) wird insbesondere im Falle kranker Tiere empfohlen. Der Wert der virologischen Untersuchungen ist in der Regel begrenzt, wenn sie zur Überwachung von Tieren ohne klinische Krankheitsanzeichen angewandt werden. Besteht das Ziel einer umfangreichen Stichprobenuntersuchung jedoch darin, den KSP-Erreger schon in der Inkubationszeit nachzuweisen, so sind Blutproben mit Gerinnungshemmer (z. B. EDTA-Blut) oder Tonsillen das geeignetste Probenmaterial.
Zum Nachweis des Virus, Antigens oder Genoms bei toten oder schmerzlos getöteten Schweinen sind Proben von Tonsillen, Milz und Lymphknoten am besten geeignet. Ferner können Proben von Niere, Lunge und Ileum entnommen und zur Untersuchung eingeschickt werden.
Für die Untersuchung von Fallwild im Rahmen der passiven Surveillance in freien Gebieten (siehe ASP) eignen sich alternativ in Blut bzw. bluthaltige Körperflüssigkeiten getauchte Tupfer (trockene Tupfer, z. B. Genotubes). Diese Tupfer sind jedoch mit einem höheren Aufwand im Labor verbunden, so dass man sie besonders dort einsetzen sollte, wo die Entnahme anderer Matrizes schwierig ist. Eine Virusisolierung gelingt aus Bluttupfern nur in Ausnahmefällen. Im Falle autolytischer Tierkörper ~~sind~~ können ein Röhrenknochen oder das Sternum ~~das geeignetste Probenmaterial~~ eingeschickt werden. Die diagnostische Eignung ist aufgrund der schwierigen Gewinnung roten Knochenmarks bei subadulten und adulten Tieren jedoch sehr eingeschränkt. Blutproben sowohl mit als auch ohne Gerinnungshemmer sind in jedem Falle von Hausschweinen zu entnehmen, die Anzeichen von Fieber oder sonstige Krankheitsanzeichen zeigen.

Für den Genom- und Antikörpernachweis (siehe unten) gleichsam geeignet ist Serum.

**Untersuchungsmaterial für den Antikörpernachweis:**
Für den Antikörpernachweis werden Blutproben ohne Gerinnungshemmer (Serumproben) benötigt. In Ausnahmefällen können auch Blutproben mit Gerinnungshemmer (Plasmaproben) untersucht werden.

Blutproben sind von einer größeren Zahl von Tieren einzusenden. Das Diagnostik-Handbuch enthält Festlegungen hierzu und auch zur Untersuchung klinisch unauffälliger Kontaktbestände.

**Monitoring beim Schwarzwild:**
Wenn eine Monitoringprobe sowohl auf Klassische als auch auf Afrikanische Schweinepest untersucht werden soll, sind bei der Auswahl der Probenmatrizes Kompromisse zu schließen. Hier haben Validierungsstudien gezeigt, dass Serum eine Probenmatrix ist, die sich grundsätzlich für alle Tests eignet, und gut in automatisierten Systemen einsetzbar ist. Serum ist auch für die zellkulturbasierten Bestätigungsmethoden der KSP-Serologie optimal, die mit Plasma u. U. deutliche Probleme aufweisen. Für die ASP-Diagnostik nimmt man allerdings in Kauf, dass Serum eine geringfügig verminderte PCR-Sensitivität mit sich bringt. Die zusätzliche Übermittlung einer Milzprobe gleicht diesen Umstand aus, da sie für alle Methoden der Erregerdetektion bei KSP und ASP gut geeignet ist. KSP lässt sich zudem sehr gut aus Tonsillen und Lymphknoten isolieren.
Für die Untersuchung von Fallwild im Rahmen der passiven Surveillance in freien Gebieten (siehe ASP) eignen sich alternativ in Blut bzw. bluthaltige Körperflüssigkeit getauchte Tupfer (s. o.).

*Optimaler Probensatz Monitoring beim Schwarzwild: EDTA-Blut (10 ml), Serum (5 ml), Tonsille/Lymphknoten und Milz*

*Minimaler Probensatz: EDTA-Blut, Serum oder trockener Bluttupfer (letzterer insbesondere für Fallwild)*

**Beförderung der Proben:**
Frische Proben sind gekühlt, aber nicht gefroren zu versenden. Die Probenverpackung muss den ADR-Vorschriften entsprechen.

Das Empfängerlabor ist im Voraus über den Zeitpunkt und die Art der Probensendung zu informieren.

Für die Einsendung an das NRL ist nach Möglichkeit das Einsendeformular für Probenmaterial zu verwenden. Es befindet sich auf dem Formularserver (https://fms.fli.de/lip/action/invoke.do?id=ivd_einsendebogen-KlassischeSchweinepest) und gestattet die einfache Überführung ins LIMS.
Die Proben sind nach Möglichkeit per Kurier (dieser sollte die Sendungsverfolgung erlauben) zum Friedrich-Loeffler-Institut, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems zu schicken und dort telefonisch anzukündigen (0383517-0). Sie sind als biologische Substanzen der Kategorie B (UN3373) zu deklarieren.
Vereinfachte Verfahren können ggf. für Proben (insbesondere trockene Bluttupfer) von Wildschweinen aus freien Gebieten zur Anwendung kommen.
Details zum Versand sind in dem entsprechenden Kapitel der Amtlichen Methodensammlung niedergelegt (Probenversand, Diagnostische Proben).

# 3. Untersuchungsgang

**Erregernachweis:**

- Für den Erregernachweis stehen zur Verfügung:
- die zellkulturelle Virusisolierung zum Nachweis,
- die real-time RT-PCR zum Nachweis von KSPV-Genom,
- der Immunfluoreszenztest (IFT), auch als Fluoreszenzantikörpertest (FAT) bezeichnet, zum Nachweis von KSPV-Antigen,
- der Antigen-ELISA zum Nachweis von KSPV-Antigen

Qualität und Effizienz der von den Untersuchungseinrichtungen angewandten Diagnosemethoden werden im Rahmen der laborübergreifenden Vergleichstests (KSP-Ringtest), die das Referenzlabor ~~jährlich~~ regelmäßig durchführt, kontrolliert.

## 3.1 Zellkulturelle Virusisolierung

Die zellkulturelle Virusisolierung wird zum qualitativen Nachweis von Pestiviren in Untersuchungsmaterial (Leukozyten, Serum, Vollblut, Organanreibungen) eingesetzt ~~und gilt als der Goldstandard der direkten Nachweisverfahren~~. Das zu untersuchende Material wird auf empfängliche Zellkulturen verimpft. Im positiven Falle vermehrt sich das Pestivirus in der Zellkultur und wird durch eine Immunfärbung nachgewiesen.
Die Virusisolierung, die hauptsächlich die Rolle eines Bestätigungstests hat, ist am besten zur Untersuchung von Proben kleiner Tiergruppen und weniger zur Überwachung großer Bestände geeignet. Die Virusisolierung ist arbeitsintensiv und zeitaufwendig (Ergebnisse liegen frühestens nach drei Tagen vor). Zwei weitere Zellkulturpassagen können erforderlich sein, um eine kleine Virusmenge in der Probe nachweisen zu können. Bis ein Endergebnis vorliegt, können 10 Tage (in Ausnahmefällen sogar mehr) vergehen.
Autolytische Proben können einen zytotoxischen Effekt auf die Zellkultur haben und den Test entsprechend beeinträchtigen.

Bei Primärausbrüchen ist die zellkulturelle Virusisolierung als Referenzmethode empfohlen. Alle KSPV-Isolate aus Primärausbrüchen bzw. Primärfällen in der Schwarzwildpopulation müssen im nationalen Referenzlabor einer genetischen Typisierung unterzogen werden. In jedem Falle sind diese Virusisolate für die Virussammlung unverzüglich an das Referenzlabor weiterzuleiten.

Ein Arbeitsprotokoll für die zellkulturelle Virusisolierung befindet sich im Anhang I.

## 3.2 Immunfluoreszenztest (IFT) / Fluoreszenzantikörpertest (FAT)

Testprinzip ist der Nachweis von Virusantigen in dünnen Kryostatschnitten von Organproben KSP-verdächtiger Schweine. Das intrazelluläre Antigen wird entweder direkt oder indirekt mit Hilfe eines spezifischen KSP-Antikörpers nachgewiesen. Die im direkten IFT anzuwendenden polyklonalen KSP-Konjugate können mit Unzulänglichkeiten behaftet sein, wie Kreuzreaktionen mit anderen Pestiviren oder zusätzlichem Gehalt an markierten Antikörpern gegen andere Virusarten. Dies erschwert die Diagnosestellung oder kann zu Fehldiagnosen führen. Deshalb sollte nach Möglichkeit auf die Verwendung polyklonaler Konjugate verzichtet werden. Als die bessere Alternative bietet sich für die Routinediagnostik die Anwendung des indirekten IFT mit kommerziell verfügbaren und behördlich zugelassenen Anti-KSPV-monoklonalen Antikörpern an, zumal ein mit polyklonalem Konjugat erhobener Positivbefund ohnehin durch erneutes Anfärben mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper zu bestätigen ist.

Als Organproben eignen sich Tonsillen, Nieren, Milz, diverse Lymphknoten und Ileum. Bei Wildschweinen kann auch ein Knochenmarkabstrich verwendet werden, falls Organmaterial nicht erhältlich oder autolytisch ist. Der Test lässt sich innerhalb eines Tages durchführen. Da Organproben nur von toten Tieren entnommen werden können, ist der Test für Screeningzwecke nur begrenzt geeignet. Die Zuverlässigkeit der Testergebnisse kann durch unklare Immunreaktionen beeinträchtigt werden, insbesondere, wenn die Erfahrung des Untersuchers noch begrenzt ist oder das Ausgangsmaterial autolytisch war.

Ein Arbeitsprotokoll für den IFT befindet sich im Anhang II.

Für die direkte Immunfluoreszenzfärbung an Gewebeschnitten ist ein kommerzielles Konjugat zugelassen:

- Anti-CSFV FITC Konjugat Bio-X Diagnostics BFAV-B 360

## 3.3 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR)

Die PCR dient dem Nachweis von Virusgenom in Blut- ~~oder~~ Organ- oder Tupferproben. Kleine Fragmente viraler RNA werden in DNA-Fragmente transkribiert, die sich durch die PCR zu nachweisbaren Mengen amplifizieren. ~~Da sich mit diesen Tests nur eine Genomsequenz des Virus nachweisen lässt~~Dieser Test weist die Erbinformation des Virus auch dann nach, wenn es nicht mehr replikationsfähig ist~~kann die PCR auch einen Positivbefund ergeben, wenn kein lebensfähiger Infektionserreger mehr vorhanden ist~~ (z. B. in autolytischen Geweben oder Proben von rekonvaleszenten Schweinen). Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Verfahrens können grundsätzlich mehrere Proben ~~(bis zu 20)~~ gepoolt werden. Die real-time RT-PCR eignet sich sehr gut zur Routineuntersuchung bei einem hohen Probenaufkommen und ist automatisierbar (Massendiagnostik).

Die real-time RT-PCR lässt sich innerhalb eines Tages durchführen. Sie setzt eine geeignete Laborausrüstung, spezielle Räumlichkeiten und erfahrenes Laborpersonal voraus. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass

infektiöse Viruspartikel nicht im Labor repliziert werden müssen. Der Test ist hochempfindlich, allerdings kann es auch zu Kontaminationen kommen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen. Strenge Qualitätskontrollen sind daher unerlässlich. Einige real-time RT-PCR-Protokolle sind pestivirusspezifisch und machen weitere Bestätigungstests, wie beispielsweise die Sequenzierung des PCR-Produkts, erforderlich.

Kritischer Punkt der RT-PCR ist die geeignete Extraktionsmethode.

Derzeit sind zwei kommerzielle RT-PCR Systeme in Deutschland zugelassen:

- virotype CSFV RT-PCR Kit (INDICAL Bioscience)
- gerbion SwineFever combi (gerbion; ASPV/KSPV multiplex PCR)

Zur Bestätigung kommen darüber hinaus am NRL validierte Verfahren zur Anwendung.

## 3.4 ELISA zum Antigennachweis

Virusantigen lässt sich mittels eines~~verschiedenen~~ kommerziell erhältlichen ELISA-Kits bei klinisch kranken Tieren nachweisen. Die Empfindlichkeit ist grundsätzlich mit der einer Virusisolierung vergleichbar, liegt aber deutlich unter der einer PCR. Derzeit ~~sind zwei~~ist nur ein Systeme in Deutschland zugelassen, wobei ~~ein Test KSPV-spezifisch ist, der zweite~~der Test ~~weist~~ auch andere Pestiviren nachweist (pestivirusspezifisch):

- IDEXX CSFV Ag Serum Plus IDEXX FLI-B 492 (Pestivirus spezifisch)

Es dürfen nur vom Referenzlabor geprüfte Chargen zugelassener Antigen-ELISA verwendet werden.

~~Während die Empfindlichkeit des pestivirusspezifischen Tests mit der Virusisolierung vergleichbar ist, liegt die Sensitivität des KSPV-spezifischen Antigen-ELISAs weit darunter.~~

### 3.4.1 Auswertung der Ergebnisse virologischer Untersuchungen

Ein Positivbefund im Antigen- oder Genomtest (PCR, IFT, ELISA) setzt voraus, dass der betreffende Test mit KSPV-spezifischen Antikörpern oder spezifischen Primern durchgeführt wurde. War der angewandte Test nicht KSPV-, sondern lediglich pestivirusspezifisch, so muss er mit KSPV-spezifischen Reagenzien bestätigt werden.

Bei Primärausbrüchen sollte~~ist~~ die zellkulturelle Virusisolierung als Referenzmethode eingesetzt werden~~zu-setzen~~. Die Virusisolierung ist auch im Falle positiver IFT-, ELISA- oder PCR-Befunde, die nicht mit klinischen Symptomen oder Läsionen assoziiert sind, sowie in anderen Zweifelsfällen erforderlich. Sekundärausbrüche

können bestätigt werden, wenn bei den betreffenden Tieren zusätzlich zu einem epidemiologischen Zusammenhang mit einem bestätigten Seuchenherd oder Seuchenfall klinische Symptome oder Läsionen nachgewiesen wurden und für einen Antigen- oder Genomtest (PCR, IFT, ELISA) ein Positivbefund vorliegt.

Ein Primärherd in der Wildschweinpopulation kann nach der Virusisolierung bestätigt werden oder wenn für mindestens zwei Antigen- oder Genomtests ein Positivbefund vorliegt. Jedoch kann die Feststellung von KSP-Virusantigen mittels IFT allein zu einer Bestätigung führen, wenn für KSP sprechende klinische Befunde und Läsionen vorliegen. Weitere KSP-Fälle bei Wildschweinen, bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang mit zuvor bestätigten Fällen nachgewiesen wurde, können bestätigt werden, wenn für einen Antigen- oder Genomtest ein Positivbefund vorliegt.

### 3.4.2 Antikörpernachweis

Bei rekonvaleszenten Schweinen lassen sich schützende neutralisierende Antikörper ab der zweiten Woche *post infectionem* noch mehrere Jahre nach der Infektion oder sogar lebenslang nachweisen. Antikörper werden sporadisch auch bei moribunden Tieren in der Endphase der Erkrankung festgestellt. Bei einigen chronisch KSP-kranken Schweinen sind Antikörper möglicherweise für einige Tage am Ende des ersten Monats *post infectionem* nachweisbar. Die Halbwertszeit maternaler Antikörper beträgt ungefähr zwei Wochen. Daher sind maternale Antikörper ab dem 3. Lebensmonat in der Regel nicht mehr nachweisbar (in Ausnahmefällen können jedoch deutlich längere Nachweiszeiten beobachtet werden). Das bedeutet, dass KSPV-Antikörper in über 3 Monate alten Ferkeln auf einen aktiven Immunschutz hinweisen.

Der Nachweis von KSPV-Antikörpern in Serum-oder Plasmaproben dient der Untermauerung der KSP-Diagnose in seuchenverdächtigen Betrieben, der Bestimmung der Infektionsdauer bei bestätigten Ausbrüchen sowie der Seuchenüberwachung. Bei erst seit kurzem bestehenden Infektionen sind serologische Nachweisverfahren jedoch nur von begrenztem Wert. Eine geringe Anzahl seropositiver Schweine mit niedrigem Neutralisationstiter deutet auf eine junge Infektion hin (die erst seit zwei bis vier Wochen besteht). Viele Tiere mit hohem Neutralisationstiter legen den Schluss nahe, dass das Virus schon vor über einem Monat in den Betrieb eingeschleppt wurde. Der Standort seropositiver Schweine im Haltungsbetrieb kann ein wichtiger Anhaltspunkt für den Einschleppungsweg sein. Die Befunde der serologischen Untersuchungen müssen jedoch sorgfältig ausgewertet werden, wobei allen Ergebnissen der klinischen, virologischen und epidemiologischen Untersuchungen Rechnung zu tragen ist.

In seltenen Fällen können Einzelreagenten zu falsch positiven serologischen Reaktionen führen. Einzelreagenten können virusneutralisierende Antikörpertiter aufweisen, die vom Grenzfall (die Regel) bis zu stark positiven Befunden reichen. Bei Wiederholungsuntersuchungen können Einzelreagenten einen abnehmenden oder konstanten Titerwert zeigen. Im Allgemeinen manifestieren sich diese falsch positiven Reaktionen nur bei wenigen, in der Regel älteren Tieren eines Bestands. Die Ursache für diese Reaktionen ist unbekannt.

Der Antikörpernachweis kann entweder mit dem Neutralisationstest oder mit dem Antikörper-ELISA durchgeführt werden. Qualität und Effizienz der von den Untersuchungseinrichtungen angewandten serologischen Diagnosemethoden müssen im Rahmen der laborübergreifenden Vergleichtests (KSP-Ringtest), die das Referenzlabor durchführt, regelmäßig kontrolliert werden.

## 3.5 Neutralisationstest

Der NT dient der Bestimmung der virusneutralisierenden Aktivität der Serumantikörper. Für Screeningzwecke werden die zu untersuchenden Seren zunächst 1 : 10 verdünnt. Ist eine vollständige Titration zur Bestimmung des Antikörpertiters erforderlich, müssen Serumverdünnungen beginnend mit 1 : 2 oder 1 : 5 angesetzt werden. Der technische Anhang des Diagnosehandbuchs der EU (Entscheidung der Kommission 2002/106/EG) empfiehlt für diagnostische Neutralisationstests eine Anfangsverdünnung von 1 : 5.

Der NT ist die empfindlichste und zuverlässigste Methode zum Nachweis von KSPV-Antikörpern und wird daher für die serologische Untersuchung sowohl einzelner Tiere als auch ganzer Bestände empfohlen. Mit diesem Test können jedoch auch kreuz-neutralisierende Antikörper festgestellt werden, die bei Infektionen mit ruminanten Pestiviren auftreten können. Der NT zum Nachweis von BVDV- und BDV-Antikörpern folgt denselben Prinzipien und wird zur serologischen Differentialdiagnose der KSP angewandt.

Pestivirus-Stämme, die in Neutralisationstests verwendet werden, müssen der Empfehlung des Referenzlabors entsprechen. Ein Arbeitsprotokoll für den NT befindet sich im Anhang III.

Für die Färbung zugelassene Reagenzien:
Anti-CSFV Monoklonaler Antikörper (Bio 275) Bio-X Diagnostics BFAV/KSP/D13/01

## 3.6 Antikörper-ELISA

Für den Antikörpernachweis mittels ELISA dürfen nur vom Referenzlabor geprüfte Chargen zugelassener ELISA verwendet werden. Derzeit sind vier ELISAs zugelassen, die Antikörper gegen das virale E2 Glykoprotein nachweisen. Zwei weitere Tests weisen Erns spezifische Antikörper nach:

IDEXX CSFV Ab IDEXX BFAV/KSP/D11a/98
ID Screen Classical Swine Fever E2 Competition, ID Vet FLI-B 530
PrioCHECK CSFV Ab 2.0 Prionics BFAV-B 301
PrioCHECK CSFV Ab Prionics BFAV/KSP/D10/98
PrioCHECK CSFV Erns Prionics BFAV/KSP/D12/2000
pigtype CSFV Erns Ab, INDICAL Bioscience FLI-C 006

Der ELISA gilt grundsätzlich als weniger empfindlich als der NT und sollte daher ~~nur~~vorrangig zum Screening auf Herden- bzw. Populationsbasis eingesetzt werden. Nicht alle zugelassenen und im Handel erhältlichen ELISA können sicher zwischen KSP-Virus und anderen Pestiviren unterscheiden. Daher müssen in Zweifelsfällen, positive serologische Befunde im NT abgeklärt werden. Proben schlechter Qualität (z. B. vom Schwarzwild) zeigen häufiger falsch positive Reaktionen. Eine Hitzeinaktivierung der Proben (30 min bei 56 °C) kann in einigen Fällen zur Klärung der Befunde beitragen. Gleiches gilt für einen Gefrier-Tau-Zyklus.

Der ELISA muss gewährleisten, dass alle KSP-Infektionen im Rekonvaleszenzstadium (nach Tag 21 post infectionem) erkannt werden, und es sollte möglichst nicht zu Interferenzen durch kreuzreagierende Antikörper gegen Wiederkäuer-Pestiviren kommen.

### Auslegung serologischer Testergebnisse und Differentialdiagnose zur Abgrenzung von Wiederkäuer-Pestivirus-Infektionen (BVD und BD)

Bei Nachweis eines KSPV-Neutralisationstiters von gleich oder höher als 10 $ND_{50}$ oder bei einem positiven ELISA-Befund muss eine differentialdiagnostische Abklärung erfolgen, wenn die KSP nicht schon mit anderen Nachweisverfahren (Erregernachweis) nachgewiesen wurde. Die Proben sind in einem zweiten Untersuchungsgang auf neutralisierenden Antikörper gegen das KSPV und gegen Wiederkäuer-Pestiviren (vergleichende Endpunkt-Titrationen) erneut zu testen

Zeigen die vergleichenden Neutralisationstests Antikörper gegen Wiederkäuer-Pestiviren und keine oder weniger als das Dreifache (oder zwei Titerstufen) Antikörper gegen das KSP-Virus, so gilt der KSP-Verdacht als entkräftet, es sei denn, es existieren andere Gründe, die für KSP sprechen. Zeigen die vergleichenden Tests einen Neutralisationstiter von gleich oder höher als 10 $ND_{50}$ und ist dieser Titer gleich oder höher als die Titer gegen andere Pestiviren, kann die KSP bestätigt werden, vorausgesetzt, in dem betreffenden Betrieb liegen entsprechende epidemiologische Befunde vor.

Wenn die epidemiologische Untersuchung keinen Seuchenbefund ergab oder wenn die serologischen Ergebnisse unschlüssig sind, müssen so schnell wie möglich weitere serologische und virologische Untersuchungen durchgeführt werden, um den KSP-Verdacht zu bestätigen oder zu entkräften. Kann der KSP-Verdacht mit weiteren Untersuchungen jedoch nicht entkräftet werden (unklare serologische Befunde, negativer Erregernachweis), so werden frühestens zwei Wochen nach den letzten Untersuchungen in dem betreffenden Betrieb weitere Blutproben für serologische Untersuchungen entnommen.

Im Rahmen dieser weiteren Untersuchungen werden die bereits untersuchten Schweine, d. h. deren zuvor entnommene Proben, erneut einer vergleichenden serologischen Untersuchung unterzogen (Probenpaare), um eine etwaige Serokonversion in Bezug auf KSP oder Wiederkäuer-Pestiviren festzustellen. Lässt sich die KSP aufgrund dieser Untersuchungen nicht bestätigen, so gilt der Verdacht als entkräftet.

## Anhang

Im Anhang befinden sich die Arbeitsprotokolle der im Referenzlabor durchgeführten Tests, die nicht kommerziell erhältlich sind. Es handelt sich um Protokollvorschläge, die entweder so in die Routinediagnostik übernommen werden können oder als Referenzmethode zur Validierung der eigenen Hausmethoden geeignet sind. Sollte mit den Hausmethoden unbefriedigende Ergebnisse in dem jährlich durchgeführten KSP-Ringtest erzielt werden, wird empfohlen, die hier aufgezeigten Arbeitsprotokolle zu übernehmen. Für Fragen und Hilfestellung bei der KSP-Diagnostik steht das Referenzlabor jederzeit zur Verfügung.

### Anhang I

**Zellkulturelle Virusisolierung**

Die zellkulturelle Virusisolierung wird zum qualitativen Nachweis von Pestiviren in Untersuchungsmaterial (Leukozyten, Serum, Vollblut, Organanreibungen) eingesetzt. Das zu untersuchende Material wird auf empfängliche Zellkulturen verimpft. Im positiven Falle vermehrt sich das Pestivirus in der Zellkultur und wird durch eine Immun-färbung nachgewiesen.

**Probenaufarbeitung**

*Gewinnung von Leukozyten*

Die Leukozytenfraktion wird bevorzugt aus EDTA-Blutproben gewonnen. Dafür wird wie folgt verfahren:
EDTA-Blutprobe (5 bis 10 ml) mit 1 ml Dextransulfatlösung versetzen und nach vorsichtigem Schwenken etwa 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur (alternativ 30 Minuten bei 37 °C) stehen lassen. In dieser Zeit setzen sich die Erythrozyten ab.
Den leukozytenhaltigen milchig-trüben Überstand absaugen und für 10 Minuten bei 2000g zentrifugieren.

Das Sediment wird nach zweimaligem Waschen in je 5 ml Ca-Mg-freier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-minus) in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. (Jedem Waschschritt folgt ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 2000g.) Die konzentrierte Leukozytensuspension dient als Inokulum für die weiteren Arbeitsschritte. Für den späteren Gebrauch kann das Material bei –70 °C gelagert werden.

Aufarbeitungen mittels Dichtegradientenzentrifugation (z.B. Pancoll) sind ebenfalls einsetzbar und sind weniger zeitaufwendig.

*Herstellung von Organanreibungen*

Organanreibungen können mittels der traditionellen Seesand-Anreibemethode oder mit einem Homogenisator wie dem TissueLyzer (Qiagen) aufgearbeitet werden.
Für die traditionelle Aufarbeitung werden ca. 1 g schwere Organteilchen (z. B. aus Milz, Lymphknoten, Tonsille, Niere etc.) mit der Schere fein zerkleinert und mit der neunfachen Menge Kulturmedium und dem

Zehnfachen der üblichen Konzentration an Antibiotika in einem Mörser zusammen mit sterilem Seesand verrieben. Nach einstündiger Einwirkung des Antibiotikums bei Raumtemperatur wird die Organsuspension für 15 Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand dient als Inokulum für die weiteren Arbeitsschritte. Für den späteren Gebrauch kann das Material bei –70 °C gelagert werden.

*Serumgewinnung*

Blutproben ohne gerinnungshemmenden Zusatz werden für 15 Minuten bei 1300g zentrifugiert. Das Serum dient als Inokulum für die weiteren Arbeitsschritte. Für den späteren Gebrauch kann das Serum bei –20 °C gelagert werden.

**Inokulation der Zellkulturen**

Jeweils 0,1 bis 0,3 ml des zu untersuchenden Materials (Leukozytensuspension, Organanreibung, Serum) wird auf eine ein bis zwei Tage alte PK15-Zellkultur im Doppelansatz inokuliert (1. Passage). Die Zellen können in Makrotiterplatten, Kulturflaschen oder Kulturröhrchen gezüchtet werden. In jedem Test werden zusätzlich eine Zellkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt. Bei der Zellkontrolle wird statt Untersuchungsmaterial Kulturmedium eingesetzt.

Vor der Inokulation der Zellkulturen wird das Kulturmedium verworfen. Nach der Inokulation bildet das Inokulum einen dünnen Film auf dem Zellrasen.
Nach einer ein- bis zweistündigen Adsorptionszeit wird das Inokulum verworfen, der Zellrasen einmal mit Medium oder PBS-minus gewaschen und anschließend mit Kulturmedium versorgt.
Die Zellkulturen werden mindestens 2 maximal 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellkulturen regelmäßig mikroskopiert um auftretende zytopathische oder zelltoxische Effekte zu beobachten.
Die Makrotiterplatten können anschließend einer Immunfärbung unterzogen werden, die Kulturflaschen bzw. Kulturröhrchen werden bei -70 °C eingefroren, um eine weitere Passage durchzuführen.
Für die zweite Passage werden tiefgefrorene Kulturröhrchen zügig aufgetaut und für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert.
Je 0.2 ml des Überstandes werden in 2 Vertiefungen einer 48-Loch-Makrotiterplatte mit einen Tag alten Zellkulturen inokuliert (am Vortag die Platte vorbereiten!). Vor der Inokulation der Makrotiterplatte wird das Kulturmedium verworfen. Nach der Inokulation bildet das Inokulum einen dünnen Film auf dem Zellrasen.
Nach einer ein- bis zweistündigen Adsorptionszeit wird das Inokulum verworfen, der Zellrasen einmal mit PBS-minus oder Zellkulturmedium gewaschen und anschließend mit Kulturmedium versorgt.
Die Platten werden 2 bis 4 Tage im $CO_2$-Schrank bei 37 °C inkubiert.

## Klassische Schweinepest

**Immunreaktion**

*Fixation*

Das Kulturmedium wird abgesaugt und der Zellrasen einmal mit 1/3 PBS-minus gewaschen. Flüssigkeitsreste müssen gründlich abgesaugt werden. Durch Inkubation für 2 – 3 Stunden in einem Trockenschrank bei 80 °C wird der Zellrasen fixiert. Nach dem Abkühlen der Platten erfolgt die Immunfärbung. Wenn die zu untersuchenden Platten nicht sofort weiterbearbeitet werden können, besteht die Möglichkeit sie kurzfristig (< 1 Woche) bei 4 °C und längerfristig (> 1 Woche) bei –20 °C zu lagern.

*Immunfärbung*

Die Immunfärbung kann direkt mit einem geprüften Pestiviruskonjugat durchgeführt werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, indirekt mit einem monoklonalen Antikörper, der an das KSP-Virus bindet und einem Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat, das an den monoklonalen Antikörper bindet, zu arbeiten. Die fixierten Platten werden vor der Zugabe des Konjugates oder des monoklonalen Antikörpers mit 1/3 PBS-minus angefeuchtet und anschließend ausgeklopft.

*a) Direkte Methode*

Zugabe von 100-150 µl pro Vertiefung (48-Loch-Platte) eines KSP-Konjugates in der entsprechenden Gebrauchsverdünnung. Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Die Gebrauchsverdünnung des Konjugates wird vom Hersteller mitgeteilt, muss aber im Labor verifiziert werden.

*b) Indirekte Methode*

Pro Vertiefung (48-Loch-Platte) 100-150 µl eines geeigneten monoklonalen Antikörpers, in der Gebrauchsverdünnung zugeben und 1 Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren. Der Antikörper wird in Waschpuffer verdünnt. Anschließend 3-mal mit Waschpuffer waschen.

Danach erfolgt die Zugabe von 100-150 µl eines vorab getesteten Anti-Maus-Peroxidase-Konjugates und die Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C. Das Konjugat wird in Waschpuffer verdünnt. Anschließend 3-mal mit Waschpuffer und danach 1-mal mit Aqua bidest waschen.

**Farbreaktion**

Nach der Immunreaktion erfolgt die eigentliche Färbung der Zellen mittels Chromogen/Substratlösung. Es werden 100-150 µl Chromogen/Substratlösung pro Vertiefung zugegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für ca. 15 bis 25 Minuten inkubiert, danach entfernt und ca. 300 µl Aqua bidest zugegeben. Die Chromogen/Substratlösung muss immer frisch aus Stammlösungen hergestellt werden.

**Auswertung**

Das Zytoplasma antigenhaltiger Zellen färbt sich braunrot an. Jede einzelne Kavität der Platte wird mittels Umkehrmikroskop ausgewertet. Dabei gilt eine Kavität bereits als infiziert, wenn das Zytoplasma nur einer Zelle spezifisch gefärbt ist.

## Anhang II

**Immunfluoreszenztest (IFT)**

***Methodische Empfehlungen***

Es wird empfohlen, in der Labordiagnostik der KSP nach Möglichkeit auf die Verwendung polyklonaler Konjugate zu verzichten und – solange monoklonale Konjugate nicht auf dem Markt sind - den indirekten IFT mit monoklonalen Antikörper (mAk) anzuwenden

***Organproben***

Organproben (Tonsille, Milz, Lymphknoten, Niere, Ileum) werden in einer Größe von ca. 10 mm x 10 mm x 5 mm in flüssigem Stickstoff oder in auf ca. -70 °C herabgekühltem n-Heptan schockgefrostet. Die Lagerung der Organproben erfolgt bei ca. -70 °C.

Fixierung der Kryostatschnitte

Etwa 5 µm dicke Kryostatschnitte werden luftgetrocknet (ca. 30 Minuten). Die Fixierung erfolgt in auf ca. -20 °C vorgekühltem Azeton für 15 bis 20 Minuten bei ca. -20 °C.
Fixierte Kryostatschnitte können mehrere Monate bei ca. -20 °C gelagert werden.

***Nachweis des KSP-Virusantigens mit dem indirekten IFT***

In einem Prüfansatz werden bearbeitet:
Schnitte von verdächtigen Organproben,
Schnitte von Organproben eines KSPV-freien Schweines ( = negative Kontrollen),
Schnitte von KSPV-positiven Organproben ( = positive Kontrollen).

In jedem Prüfansatz kommen zur Anwendung:
Anti-KSPV-mAk,
irrelevanter mAk.

***Protokoll***

Alle folgenden Schritte erfolgen bei Raumtemperatur.
Waschen der fixierten Kryostatschnitte in PBS für 5 min
Blockierung mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS für 30 Minuten
Kurz waschen in PBS
Inkubation mit mAk in vom Hersteller empfohlener Arbeitsverdünnung in PBS für 60 Minuten
Waschen in PBS: 3 x 5 Minuten

Inkubation mit FITC-markiertem Sekundärantikörper (Anti-Maus-Ig-FITC-Konjugat) in empfohlener Arbeitsverdünnung für 60 Minuten:
Verdünnung in PBS und Zusatz des Kontrastfarbstoffes Evans blue (3 Teile Konjugat-Arbeitsverdünnung + 1 Teil 0,005 % Evans blue in PBS).
Waschen in PBS: 3 x 5 Minuten
Waschen in Aqua dest. für mindestens 5 Minuten
Lufttrocknung bis zum feuchten Glanz
Eindecken der noch leicht feuchten Schnitte mit
PBS-Glycerol-Gemisch (1 Teil PBS + 9 Teile Glycerol) oder
DABCO-Fluoreszenzerhaltungs-Puffer

***Mikroskopische Beurteilung der Schnitte***

Für die mikroskopische Beurteilung der Schnitte ist ein aufrechtes Mikroskop mit Auflichtfluoreszenz erforderlich. Die Fluoreszenzeinrichtung sollte mit einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 W ausgerüstet sein.
Die Beurteilung der Schnitte erfolgt im exakten Vergleich mit den negativen und positiven Kontrollschnitten. KSP-Virusantigen-positive Zellen zeigen zytoplasmatische, weitgehend homogene, leuchtende hellgrüne Fluoreszenz. Die Zellkerne bleiben dunkel ausgespart. Virusantigen kann in verschiedenen Zellarten vorliegen, insbesondere in Zellen der lymphatischen Gewebe (lymphatische Keimzentren, diffuses lymphatisches Gewebe, außerdem im Kryptenepithel der Tonsillen, weiße und rote Milzpulpa), in Epithelzellen, in Zellen des roten Knochenmarkes. Je nach Intensität des Befalls und dem Stadium der Infektion findet man entweder nur einzelne, im Gewebsverband eingestreute oder zahlreiche bis sehr viele Zellen mit spezifischer Fluoreszenz. Im positiven Fall können alle untersuchten Organproben oder nur einzelne Proben befallen sein.
Die Kontrastfärbung mit Evans blue führt zu einer allgemeinen rötlich-bräunlichen Färbung und überdeckt geringe unspezifische Fluoreszenzerscheinungen. Nicht-zytoplasmatische Fluoreszenzen oder gelbgrün- und gelb-granuläre, zellgebundene Fluoreszenzerscheinungen sind als unspezifisch zu betrachten. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer zeigen oft hellgrüne bis gelbgrüne unspezifische Fluoreszenz.

## Anhang III

**Neutralisationstest**

Der Neutralisationstest (NT) wird zum qualitativen und quantitativen Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen Pestiviren (KSPV, BVDV, BDV) durchgeführt.

***Probenaufarbeitung***

Der Neutralisationstest wird routinemäßig mit Serum durchgeführt. In Ausnahmefällen, wenn kein Serum zur Verfügung steht oder wenn spezielle Fragestellungen zu beantworten sind, kann der Test auch mit Plasma, Fleischsaft oder Körperhöhlenexudaten durchgeführt werden.

Serum wird aus Blutproben ohne gerinnungshemmenden Zusatz gewonnen. Dafür werden die Blutröhrchen für 15 Minuten bei 1300 g zentrifugiert. Das Serum, das sich oberhalb des Blutkuchens absetzt, wird abpipettiert und portioniert (1- bis 2-ml-Portionen). Wenn die zu untersuchende Serumprobe nicht sofort verarbeitet werden kann, wird sie kurzfristig (< 1 Woche) bei 4 °C und längerfristig (> 1 Woche) bei -20 °C gelagert.

Plasma wird auf gleiche Weise aus Blutproben mit gerinnungshemmenden Zusätzen gewonnen und bearbeitet. Plasma ist jedoch deutlich schlechter für den NT geeignet, reagiert häufiger toxisch und kann zu einem Gelieren des Zellkulturmediums führen. Letzteres Phänomen kann durch Zugabe von Heparin verhindert werden.

***Neutralisationsschritt***

Verdünnungsreihen

Der Test wird in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte unter Verwendung von Zellkulturmedium mit Antibiotikazusatz durchgeführt. Es wird eine Serumverdünnungsreihe in 2er-Stufen (z. B. von 1 : 5 bis 1 : 640) mit je einem Volumen von 50 µl pro Kavität hergestellt. Pro Serumverdünnungsstufe werden zwei Kavitäten (Doppelansatz) nebeneinander beschickt. Die Verdünnung von 1 : 5 erhält man, indem man 80 µl Kulturmedium mit 20 µl Serumprobe in der ersten Vertiefungsreihe mischt. In alle anderen Kavitäten werden 50 µl Kulturmedium vorgelegt. 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 bis 12 Verdünnungsstufen). Die letzten 50 µl werden verworfen. Jede Kavität enthält jetzt 50 µl einer Serum-Medium-Verdünnung.

Mindestens zwei positive Referenzseren (Seren mit bekanntem Titer) werden in gleicher Weise als Kontrollen mitgeführt (positive Serumkontrollen). Die Neutralisationstiter der Kontrollseren sollten bei einem Serum unter 100 $ND_{50}$ und bei dem anderen über 100 $ND_{50}$ liegen

## Klassische Schweinepest

Testvirus

In jede Kavität werden danach 50 µl mit 100 $KID_{50}$ der Testvirussuspension gegeben. Die Testvirussuspension muss unmittelbar vor Gebrauch mit Kulturmedium auf 100 $KID_{50}$/50 µl (2000 $KID_{50}$/ml) eingestellt werden. Die benötigte Menge an Testvirus (ca. 5 ml pro Mikrotiterplatte) ist in einem Ansatz herzustellen. Der Verdünnungsfaktor um die Testvirussuspension auf 100 $KID_{50}$/50 µl einzustellen wird rechnerisch ermittelt. Ein Rechenbeispiel ist im Anhang IV zu finden.

Neben den schon erwähnten positiven Serumkontrollen werden eine Zellkontrolle, eine Viruskontrolle und eine Rücktitration des Testvirus mitgeführt. Als Zellkontrolle werden mindestens 6 Kavitäten mit 100 µl Kulturmedium beschickt. Sie enthalten kein Serum und kein Virus. Im weiteren Verlauf werden sie mit Zellen beschickt. In jedem Test wird außerdem eine Rücktitration des Testvirus zur Bestimmung der eingesetzten KID50 durchgeführt. Mit der Rücktitration kontrolliert man den tatsächlichen Virusgehalt im Test. Hierbei wird die im Test eingesetzte Virusverdünnung in Log-2-Schritten beginnend bei 1 : 10 bis 1 : 1280 ausverdünnt. Die Verfahrensweise ist wie bei der Serumverdünnung. 180 µl Kulturmedium werden vorgelegt, 20 µl Testvirus-suspension dazugegeben (1 : 10) und anschließend ausverdünnt. Pro Verdünnungsstufe werden vier Kavitäten nebeneinander mit 100 µl Virusverdünnung beschickt.

Neutralisation

Die Mikrotiterplatte inkubiert daraufhin für mindestens 1 bis maximal 2 Stunden bei 37 °C in einer feuchten Umgebung in einem $CO_2$-Schrank (5 % $CO_2$). Während dieser Zeit findet der Neutralisationsprozess statt. Nach der Inkubationszeit werden in jede Kavität 100 µl der entsprechenden Zellsuspension hinzugefügt. Die Zelldichte muss so eingestellt sein, dass nach 24 Stunden ein konfluenter Zellrasen entsteht. Die Mikrotiterplatte verbleibt für 72 bis 96 Stunden zur Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Umgebung im $CO_2$-Schrank (5 % $CO_2$).

Die weiteren Schritte der Immunreaktion (Fixation, Immunfärbung, Farbreaktion) erfolgen wie bei der zellkulturellen Virusisolierung beschrieben.

***Auswertung***

Das Zytoplasma antigenhaltiger Zellen färbt sich braunrot an. Jede einzelne Kavität der Mikrotiterplatte wird mittels Umkehrmikroskop ausgewertet. Dabei gilt eine Kavität bereits als infiziert, wenn das Zytoplasma nur einer Zelle spezifisch gefärbt ist.

Falls in allen Verdünnungsstufen das Virus neutralisiert wurde und so der Neutralisationstiter nicht errechnet werden kann, wird von dem Ausgangsserum eine 1 : 100-Verdünnung hergestellt und der Neutralisationstest in 2er-Verdünnungstufen von 1 : 100 bis 1 : 12800 wiederholt.

Der Rücktitrationstiter des Testvirus sollte idealerweise 100 $KID_{50}$ betragen, mit einer Schwankungsbreite zwischen 40 und 660 $KID_{50}$. Der Titer der mitgeführten Kontrollseren sollte nicht mehr als eine Verdünnungsstufe ober- oder unterhalb des Erwartungswertes liegen. Die Zellkontrolle muss negativ sein.

Der Neutralisationstiter wird als der Kehrwert der Serumverdünnung bestimmt, bei der in einer von zwei Vertiefungen (50 %) das Virus neutralisiert wurde. Der Titer wird als neutralisierende Dosis 50 ($ND_{50}$) angegeben. Ein Titer, der zwischen zwei Verdünnungsstufen liegt, wird als der Durchschnittswert zwischen diesen zwei Stufen angegeben.

## Anhang IV

**Geräte und Materialien**

Makrotiterplatten (24- oder 48-Loch-Platten)
Mikrotiterplatten (96-Loch-Platten)
Kulturröhrchen oder Kulturflaschen
Mehrkanalpipetten, Pipetten, sterile Plastikspitzen
Empfängliche Zelllinien vom Schwein für die zellkulturelle Virusisolierung (z. B. PK15 Zellen, Bezugsquelle Zellbank des FLI)
Zellkulturen für den Neutralisationstest, z. B.: PK15 Zellen für den KSP-NT; MDBK Zellen für den BVD-NT; SFT Zellen für den BD-NT (Bezugsquelle: Zellbank des FLI)
Zellkulturmedien (Bezugsquelle: kommerzielle Hersteller)
Testviren für den Neutralisationstest (Bezugsquelle: Referenzlabor)
Spezifische monoklonale Antikörper gegen Pestiviren (Bezugsquelle: kommerzielle Hersteller)
Peroxidasemarkierte Anti-Maus-Antikörper (Bezugsquelle: kommerzielle Hersteller)
Positive Kontrollseren (Bezugsquelle: Referenzlabor)
Standardmäßige Laborausstattung für ein Viruslabor (Sterilwerkbank, Um-kehrmikroskop, CO2-Schrank (37 °C), Zentrifuge, Inkubator (80 °C),
Kühlschrank, Kühltruhe (-20 °C, -70 °C).

**Reagenzien**

***Antibiotikalösung***

1,25 g Penicillin
2g Streptomycin

In 20 ml sterilem Aqua bidest lösen, portionieren und bei –20 °C einfrieren
1 ml Konzentrat reicht für 1 L Medium
Zehnfache Menge Konzentrat für Organanreibungen

Waschlösung: PBS-minus/Tween (Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium- und Magnesium-Ionen mit Tween)

pH 7,0-7,2 nach Dulbecco u. Vogt (1954):

80,00 g NaCl
2,00 g KCl
14,24 g Na2HPO4 x 2 H2O

2,00 g KH2PO4
ad 10,0 L Aqua bidest.

0,1 ml Tween-20 pro 1000 ml PBS-minus

1/3PBS-minus

1 Teil PBS-minus Gebrauchslösung, 2 Teile Aqua bidest

***Dextransulfatlösung***
7,5 g NaCl
15 g EDTA
300 mg Streptomycin
200 mg Penicillin
ad 1000 ml Aqua bidest.

In 100 ml dieser Lösung werden 5 g Dextransulfat (Mol.-Gew. 500.000) gelöst.

***Chromogen/Substratlösung***

Angaben für 2 Mikrotiterplatten Angaben für 2 Mikrotiterplatten:

9,00 ml 0,05 mol/l Natriumazetatpuffer, pH 5,0
1 ml AEC-Lösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol)
0,10 ml $H_2O_2$ 3%ig

<u>Herstellung der AEC-Lösung</u>
6 mg AEC in 1,5 ml DMF (Dimethylformamid) langsam lösen, nicht schütteln (Menge reicht für 3 Mikrotiterplatten). Die AEC-Lösung kann in dunklen Flaschen bei Kühlschranktemperatur mehrere Monate gelagert werden.

**Achtung, AEC ist kanzerogen! (Laborhandschuhe tragen, nicht mit Metallspatel abwiegen!)**

***Rechenbeispiel zur Berechnung des Verdünnungsfaktors für das Testvirus:***
Die im Neutralisationstest zum Einsatz kommende Virussuspension (Testvirus) soll einen Titer von 100 $KID_{50}$/50 µl haben. Folglich muss das hochtitrigere Ausgangsvirus entsprechend verdünnt werden. Die Berechnung des Verdünnungsfaktors erfolgt nach der Formel:

Titer log10 KID50/0,1ml Ausgangsvirus minus 102.3* = log10 Virusverdünnung; entlogarithmieren!

Reziproker Wert = Virusverdünnung.

Beispiel:
Der Titer des Ausgangsvirus beträgt 106,3 $KID_{50}$/ ml. Das sind 105,3 $KID_{50}$/0,1ml.

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

Entlogarithmierung 3,0 log10 = 1000

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

(* $10^{2,3}$ = 200 $KID_{50}$ pro 0,1 ml)

**Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit**
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.de