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

Amtliche Methode und Falldefinition

Bovine Virus Diarrhoe (BVD)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode **3**

1. Charakterisierung der Infektion **3**

1.1 Erreger 3

1.2 Klinische Symptomatik 3

1.3 Pathologie 4

1.4 Differentialdiagnostik 4

1.5 Diagnostische Indikation 4

1.6 Zuständige Untersuchungseinrichtung 4

1.7 Rechtsgrundlagen 4

2. Untersuchungsmaterialien und Probenschemata **5**

2.1 Anerkannte Untersuchungen zum BVDV-Nachweis 5

2.2 Bestätigungsuntersuchung 6

2.3 Anerkannte Untersuchungen auf BVDV-Antikörper 6

3. Untersuchungsgang **7**

3.1 Erregernachweis 7

3.2 Indirekter Erregernachweis 13

Falldefinition - Bovine Virus Diarrhoe / Mucosal Disease; Virus der Bovinen Virus-Diarrhoe (BVDV 1 und 2) **17**

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Der Erreger bildet gemeinsam mit dem Virus der Klassischen Schweinepest und dem Border Disease Virus das Genus Pestivirus in der Familie der *Flaviviridae*. Atypische Pestiviren (u. a. „Giraffe“, „Pronghorn“, „HoBi“, „Bungowannah“) sind beschrieben, für die aktuelle BVD-Epidemiologie aber von marginaler Bedeutung. Es werden zwei Genotypen des BVDV als selbständige Spezies unterschieden, bei denen jeweils zytopathogene (cp) und nicht-zytopathogene (ncp) Biotypen vorkommen. Subtypisierungen auf genomischer Ebene sind möglich. Es handelt sich um ein 40 bis 60 nm großes, behülltes Virus, das Genom besteht aus einer einsträngigen RNA positiver Polarität von einer Länge von ca. 12 kB.

1.2 Klinische Symptomatik

Akute Infektionen verlaufen in der Regel symptomlos. Vor allem bei Kälbern können Fieber, Inappetenz, seröser Nasenausfluss, milde Atemwegserkrankung oder Durchfall auftreten. Bei Kühen kann es zum Rückgang der Milchleistung kommen. Eine Immunsuppression begünstigt andere Infektionen. Darüber hinaus kann BVDV, insbesondere vom Genotyp 2, verlustreiche Erkrankungen unter dem Bild eines hämorrhagischen Syndroms mit schwerer pulmonaler Symptomatik, blutiger Diarrhoe und Erosionen im Verdauungstrakt verursachen.

Eine ***Infektion trächtiger Tiere*** resultiert in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion in Fruchtbarkeitsstörungen (Umrindern infolge Fruchtretention), Aborten, Totgeburten, Missbildungen und Geburt von lebensschwachen Kälbern. Bei Infektionen zwischen dem 30. und dem 90. Graviditätstag mit BVDV vom ncp-Biotyp werden persistent virämische Kälber geboren, die entweder kümmern, aber sich auch normal entwickeln können. Innerhalb der ersten zwölf Lebensmonate kommt es bei etwa der Hälfte der PI-Tiere zur Ausbildung von Mucosal Disease.

Mucosal Disease (MD) entsteht, wenn persistent virämische Tiere mit einem cp BVDV infiziert werden, bzw. (häufiger) wenn der ncp-Biotyp im Tier zum cp-Virus mutiert. Chronische Abmagerung, Fieber, Anorexie, blutige, therapieresistente Durchfälle, Speichelfluss, Erosionen im Bereich des harten Gaumens, am Flotzmaul und Naseneingang, weniger häufig im Zwischenklauenspalt sowie an Kronsaum und Euter treten auf. Die Erkrankung verläuft tödlich. Auf pathogenetisch von der MD abzugrenzende erosive Veränderungen nach akuter Infektion mit besonders virulenten Virusstämmen wird hingewiesen (MD-like).

1.3 Pathologie

Zur pathologisch-anatomischen Untersuchung gelangen in erster Linie an MD verendete Tiere. Neben der bereits klinisch sichtbaren erosiven und ulzerativen Stomatitis (besonders harter Gaumen, Gingiva, Papillen der Backenschleimhaut), finden sich längliche Erosionen im gesamten Oesophagus, an Pansenpfeilern und an den Rändern der Blättermagenschleimhaut, im Labmagen und im gesamten Darm. Auch bei ausgeprägten pathomorphologischen Befunden ist mitunter kein Virus nachweisbar. Hochvirulente ncp-BVDV-Stämme führen zu hochgradiger Thrombozytopenie mit nachfolgendem hämorrhagischem Syndrom.

Intrauterine Infektionen bis zum 100. Graviditätstag führen zum Tod des Fetus, zu Aborten, mumifizierten Früchten bzw. Entstehung von PI-Tieren. Zu den nach Infektionen nach dem 100. Graviditätstag auftretenden Missbildungen zählen Mikroenzephalie, zerebellare Hypoplasia, Hydranenzephalie, Hydrozephalus, Mikrophthalmie („okulozerebellares Syndrom“), Thymusaplasie, Hypotrichosis congenita, Brachygnathie, Wachstumsverzögerung und Hypoplasie der Lungen.

1.4 Differentialdiagnostik

Bösartiges Katarrhalfieber, Rinderpest, Maul und Klauenseuche und andere vesikuläre Erkrankungen, Stomatitis papulosa, Verätzungen, Intoxikationen.

1.5 Diagnostische Indikation

- Antigen-, Genom- und Antikörperuntersuchungen nach BVD-Verordnung.
- Klinischer und/oder pathologischer Verdacht auf MD bzw. Vorliegen eines hämorrhagischen Syndroms.

1.6 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungseinrichtungen in den Ländern
- Nationales Referenzlabor für BVD/MD am Friedrich-Loeffler-Institut, 17493 Greifswald-Insel Riems (Telefon: 038351-7-1212) – Abklärungsuntersuchungen

1.7 Rechtsgrundlagen

- Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus – BVDV-Verordnung in der jeweils gültigen Fassung.
- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestric Animals, Chapter 2.04.08, Bovine Viral Diarrhea, Mai 2015

2. Untersuchungsmaterialien und Probenschemata

Der diagnostische Nachweis von persistent BVDV-infizierten Rindern kann durch die Aufnahme von BVDV-antikörperhaltigem Kolostrum beeinträchtigt sein (diagnostische Lücke). Die Einschränkungen hängen von den aufgenommenen Antikörpermengen, der angewendeten Methode sowie vom Zeitpunkt der Probenahme ab. Im Folgenden werden zulässige diagnostische Verfahren zur Zertifizierung der BVD-Unverdächtigkeit eines Rindes bzw. Rinderbestandes und zur Bestätigung der Antikörperfreiheit unter Berücksichtigung der diagnostischen Lücke aufgeführt. Detaillierte Protokolle sind im Abschnitt Untersuchungsgang beschrieben.

2.1 Anerkannte Untersuchungen zum BVDV-Nachweis

2.1.1 Amtlich zugelassene E^{RNS}-Antigenfänger-ELISA

Probenmaterial: Serum, Plasma, EDTA-Vollblut, Blutleukozyten, Organproben und Hautbioptate eines Tieres.

Probenahme: Vor Aufnahme von Kolostrum sowie im Alter von mehr als 30 Tagen für Blutproben. Vor diesem Zeitpunkt mit negativem Ergebnis untersuchte Proben sind verwertbar, wenn gleichzeitig eine Untersuchung auf Antikörper mittels ELISA oder SNT mit ebenfalls negativem Ergebnis durchgeführt wird. Vor diesem Zeitpunkt mit positivem Ergebnis untersuchte Blutproben sind ebenfalls verwertbar.
Für Hautbioptate und andere Organproben gibt es keine Einschränkung.

2.1.2 Amtlich zugelassene p80-Antigenfänger-ELISA

Probenmaterial: Blutleukozyten, Hautbioptate, soweit vom Hersteller vorgesehen.

Probenahme: Vor Aufnahme von Kolostrum oder im Alter von mehr als 90 Tagen.

2.1.3 RT-PCR mit amtlich zugelassenen Testkits

Probenmaterial: Serum, Plasma, Vollblut, gereinigte und gewaschene Leukozyten, Milch, Organ- oder Gewebeproben.
Poolproben von bis zu 25 (Ohrstanzen) bzw. 50 Tieren (Serum, Plasma, Vollblut, Leukozyten, Milch) und entsprechend der Herstellerangaben.

Probenahme: Für Einzelblutproben keine Einschränkung; für gepoolte Blutproben Tag 0 bis 7 *post partum* oder ab einem Alter von mehr als 40 Tagen. Vor diesem Zeitpunkt mit negativem Ergebnis untersuchte Proben sind verwertbar, wenn gleichzeitig eine Untersuchung auf Antikörper mittels ELISA oder SNT mit ebenfalls negativem Ergebnis durchgeführt wird. Vor diesem Zeitpunkt mit positivem Ergebnis untersuchte Blutproben sind ebenfalls verwertbar. Für Gewebeproben als Einzel- oder Poolproben gibt es keine Einschränkung.

Anmerkung: Die analytische Sensitivität der zugelassenen Testkits erlaubt rechnerisch die Untersuchung größerer Pools. Ein den Anforderungen an ein akzeptables Qualitätsmanagement genügendes System der automatisierten Probenvorbereitung ist bei Pools > 50 bei Blutproben und > 25 bei Ohrstanzproben aber nicht mehr gegeben. Bei Sicherung einer ausschließlichen Bearbeitung von Blutproben aus anerkannt BVD-unverdächtigen Beständen und einer zusätzlichen internen Validierung des technischen bzw. automatisierten Ablaufes der Poolung und Gewährleistung von mindestens 5 µl Einzelprobe im Pool ist eine Erhöhung auf maximal 100 Proben möglich.

2.1.4 Virusisolierung auf permissiven bovinen Zellkulturen, z. B. KOP-R-Zellen oder primäre bovine Zellkulturen

Probenmaterial: Mindestens 1 x 10^6 aufgereinigte und gewaschene Leukozyten (vorzugsweise) bzw. Serum, Organproben (Milz, Lymphknoten, Thymus).

Probenahme: Vor Aufnahme von Kolostrum oder im Alter von mehr als 40 Tagen.
Keine Einschränkung für Organproben.

2.1.5 Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz

Probenmaterial: 6 bis 8 mm große Organ- und Gewebeproben (Hautstanzen).

Probenahme: Postmortal oder am lebenden Tier (Hautstanzen), keine zeitliche Einschränkung.

2.1.6 Durchflusszytometrische Analyse nach Immunfluoreszenzfärbung mit p80-spezifischen Antikörpern

Probenmaterial: Aufgereinigte Leukozyten aus mindestens 50 µl Vollblut.

Probenahme: Vor Aufnahme von Kolostrum oder im Alter von mehr als 90 Tagen.

2.2 Bestätigungsuntersuchung

Die zuständige Behörde kann genehmigen, dass ein betroffenes Rind abzusondern und längstens 40 Tage nach der ersten Untersuchung erneut auf BVDV zu untersuchen ist, soweit Belange der Tierseuchenbekämpfung dem nicht entgegenstehen. Bestätigungsuntersuchungen sollten nur erfolgen, wenn es eindeutige Anhaltspunkte dafür gibt, dass das positive Laborergebnis in Zweifel gezogen werden muss, und/oder kein epidemiologischer Hinweis auf einen BVDV-Eintrag in den entsprechenden Bestand vorliegt.
Bei der Bestätigung von vermutlich persistent infizierten Tieren durch eine zweite Untersuchung muss die unterschiedliche Sensitivität der beschriebenen Methoden berücksichtigt werden.

2.3 Anerkannte Untersuchungen auf BVDV-Antikörper

Für den Nachweis von BVDV-Antikörpern werden amtlich zugelassene Testkits nach Herstellerangaben oder Serumneutralisationstests eingesetzt. Die verwendeten Neutralisationstests müssen die BVDV-Referenzseren

Ref1-BVDV1 und Ref2-BVDV2 sicher erkennen lassen (Bezug: BVDV-NRL, Insel Riems, Bestätigung über Teilnahme an Ringtesten).

2.3.1 Testsysteme für die Bestätigung der Antikörperfreiheit

- Neutralisationstest gegen BVDV-Typ 1 und BVDV-Typ 2 mit 100 KID_{50} Testvirus (Goldstandard).
- Zugelassene BVDV-p80-oder E^{rns}(E0)-blocking-ELISAs.
- Zugelassene indirekte BVDV-Antikörper-ELISAs.

2.3.2 Testsysteme für die diagnostische Stichprobe (z. B. „Jungtierfenster“)

- Zugelassene indirekte BVDV-Antikörper-ELISA (ab einem Alter von 6 Monaten).
- Neutralisationstest gegen BVDV-Typ 1 und BVDV-Typ 2 (BVDV-1/2-NT) mit 100 KID_{50} Testvirus (ab einem Alter von 9 Monaten).
- Zugelassene BVDV-p80- oder E^{rns}(E0)-blocking-ELISA (ab einem Alter von 9 Monaten).

Die unterschiedliche zeitliche Einschränkung erfolgt aufgrund der unterschiedlich hohen Sensitivität der Testsysteme für kolostrale Antikörper.
Ein negativer Befund dieser Teste ist auch im jüngeren Alter für die Stichprobenbeurteilung geeignet.

2.3.3 Testsysteme für die Untersuchung von Einzel- und Tankmilchproben

Alle für die Untersuchung von Milch zugelassenen Testsysteme. Es ist ausschließlich eine Differenzierung in „Milch-positive“ und „Milch-negative“ Bestände vorzunehmen.

3. Untersuchungsgang

3.1 Erregernachweis

3.1.1 Virusisolierung

Leukozyten
Hämolyse und Waschen der Leukozyten, z. B. 1,5 ml EDTA-Blut + 4,5 ml Lysispuffer (8,29 g/l NH_4CL, 1,0 g/l $KHCO_3$, 1 mM EDTA), 10 min Eis, Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min bei 4 °C, zweimal Waschen mit Zellkulturmedium + Antibiotika (z. B. Gentamycin, 50 ng/ml; Baytril, 20 µg/ml; oder Penicillin/Streptomycin), Resuspendierung. In der Aufarbeitung sollten > 10^6 Leukozyten sein.

Alternativ: 5 bis 10 ml EDTA-Blut mit 1 ml Dextransulfatlösung versetzen und nach vorsichtigem Schwenken etwa 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur (alternativ 30 min bei 37 °C) stehen lassen. In dieser Zeit setzen sich die Erythrozyten ab. Den leukozytenhaltigen milchig-trüben Überstand absaugen und für 10 min bei 2000 g zentrifugieren. Das Sediment wird nach zweimaligem Waschen in je 5 ml Ca-Mg-freier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-minus) in 2 ml Kulturmedium aufgenommen.
Die konzentrierte Leukozytensuspension dient als Inokulum für die weiteren Arbeitsschritte. Für den späteren Gebrauch kann das Material bei –70 °C gelagert werden.

Bovine Virus Diarrhoe (BVD)

Organmaterial

Ca. 1 g Organmaterial wird mit der Schere fein zerkleinert und in 10 Vol serumfreiem Zellkulturmedium bzw. isotonischem Puffer mit Antibiotika in einem Mörser, bei Notwendigkeit mit sterilem Seesand, homogenisiert. Andere Methoden der Homogenisierung (Homogenisatoren, tissue lyser) sind möglich. Nach mindestens einstündiger Aufbewahrung bei 4 bis 8 °C wird die Organsuspension für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand dient als Inokulum für die weiteren Arbeitsschritte. Für den späteren Gebrauch kann das Material bei –70 °C gelagert werden.

Inokulation der Zellkulturen

Wie o. a. aufbereitetes Untersuchungsmaterial wird im Doppelansatz in einem Volumen, das 1/10 des Zellkulturmediums entspricht (z. B. 0,1 ml für 24 well, 0,3 ml für 6 well, 0,5 ml für TC12,5 usw.) auf 1 bis 2 Tage gewachsene Zellkulturen, von denen das Anzuchtmedium vorher entfernt wurde, inokuliert. Nach einer Adsorptionszeit von 30 bis 60 min bei 37 °C wird das Inokulum entfernt (nicht bei frischem Leukozytenpellet) und nach ein- bis zweimaligem Waschen serumfreies Erhaltungsmedium zugegeben. Positiv- und Negativkontrollen sind mitzuführen. Die Zellkulturen werden 3, besser 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellkulturen auf das Auftreten zytopathischer oder zelltoxischer Effekte mikroskopisch kontrolliert. Die Zellkulturplatten können anschließend einer Immunfärbung unterzogen werden, die Kulturflaschen werden nach Gefrier-Tau-Zyklus weiter passagiert bzw. auf Zellkulturplatten mit dem Ziel einer Immunfärbung weiterverimpft. Es werden in der Regel bis zu drei Passagen durchgeführt.

Immunfärbung

Fixation

Das Kulturmedium wird abgesaugt, der Zellrasen einmal mit Waschpuffer (PBS, IP, TBST) gewaschen und luftgetrocknet (Fön oder über Nacht bei Raumtemperatur (RT)). Die Fixierung erfolgt im Wärmeschrank für 2 Stunden bei 80 °C. Alternative laborübliche Fixationsmethoden (z. B. 80 % Azeton, 4 % Paraformaldehyd) können angewendet werden, wenn ihre Eignung gezeigt wurde.

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

Immunfärbung

Die Immunfärbung kann direkt mit einem geprüften BVDV- bzw. pan-pesti-Konjugat durchgeführt werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, indirekt mit einem geeigneten monoklonalen Antikörper und einem FITC- bzw. POD-markierten Anti-Maus-Konjugat zu färben.

Durchführung der Fluoreszenzfärbung

Direkte Methode

- Zugabe von 50 bis 100 µl eines Fluorochrom- (z. B. FITC-) markierten Antikörpers in Verdünnungspuffer (PBS, IP, TBST), bei Bedarf 0,001 % Evans blue.

- Inkubation bei RT für 60 min, dreimal Waschen (zweimal kurz, einmal 10 min) in Waschpuffer (PBS, IP, TBST), Puffer absaugen, einmal Waschen mit Aqua dest, Überschichten mit A. dest. oder Fluoreszenzerhaltungspuffer (1 : 1 mit A. dest).
- Auswertung im inversen Fluoreszenzmikroskop.

Indirekte Methode

- Zugabe von 50 bis 100 µl eines antigenspezifischen monoklonalen Antikörpers (z. B. WB103/105, INDICAL BIOSCIENCE GmbH) in Gebrauchsverdünnung in Verdünnungspuffer.
- Inkubation bei RT für 60 min, Absaugen des Antikörpers, einmal waschen mit Waschpuffer.
- Zugabe von 50 bis 100 µl FITC-Anti-Maus-IgG (z. B. Firma DAKO Best.-Nr. F0479) in Gebrauchsverdünnung (bei Zugabe von Evans blue – 0,001 % Endkonzentration).
- Inkubation bei RT für 60 min, absaugen des Konjugates.
- Dreimal waschen mit Waschpuffer (zweimal kurz, einmal 10 min).
- Absaugen des Puffers, einmal waschen mit A. dest.
- Überschichten der Zellen mit A. dest. oder Fluoreszenzerhaltungspuffer (1 : 1 mit A. dest).

Durchführung der Peroxydasefärbung (indirekt)

- Zugabe von 50 bis 100 µl eines antigenspezifischen monoklonalen Antikörpers (z. B. WB103/105) in Gebrauchsverdünnung in Verdünnungspuffer (TBST). Inkubation bei RT für 60 min, absaugen des Antikörpers, einmal waschen in Waschpuffer (TBST).
- Zugabe von 50 bis 100 µl POD-Anti-Maus-IgG (z. B. Sigma, A-9044) in Gebrauchsverdünnung.
- Inkubation bei RT für 60 min, absaugen des Konjugates.
- Waschen der Zellen in Waschpuffer (TBST) (zweimal kurz, einmal 10 min).
- Absaugen des Puffers.
- Substratreaktion:
    - Dazu wird 1 Tablette AEC (3-amino-9-Ethylcarbazol) in 2,5 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst (Stammlösung). Zur Anwendung werden für eine Platte 0,25 ml Stammlösung in 5 ml 0,05 M Natriumazetatpuffer, pH 5,0 verdünnt, mit 15 µl 3 % H_2O_2 versetzt und je 50 µl/well pipettiert. Nach 15 min wird die Färbelösung abgesaugt und mit A. dest. aufgefüllt.
    - Die AEC-Stammlösung wird portioniert bei –20 °C gelagert.

Achtung, AEC ist kanzerogen! (Laborhandschuhe tragen)

Bovine Virus Diarrhoe (BVD)

Phänotypische Differenzierung zwischen BVDV-1 und BVDV-2

Die parallele Anwendung der monoklonalen Antikörper WB103/105 (INDICAL BIOSCIENCE GmbH) und WB 160 (INDICAL BIOSCIENCE GmbH) ermöglichen eine Unterscheidung zwischen den BVDV-Genotypen. BVDV-1 reagiert mit beiden Antikörpern, während Typ 2 BVD-Viren nur mit WB103/105 eine positive Reaktion zeigen.

Geräte und Reagenzien

- Zellkulturflaschen (z. B. TC12,5, TC25)
- Pipetten
- Zellkulturplatten (6-, 24-, 48-, 96-well)
- Sterile Plastikspitzen
- Empfängliche Ziellinien, vorzugsweise KOP-R, MDBK, Klu (Bio-Bank des FLI) oder primäre bovine Zellkulturen
- Spezifische monoklonale Antikörper gegen BVDV bzw. Pestiviren (z. B. INDICAL BIOSCIENCE GmbH)
- FITC-markiertes anti-BVD-Konjugat (z. B. BioX, INDICAL BIOSCIENCE GmbH)
- Peroxidasemarkierte (POD) bzw. fluoresceinisothiocyanatmarkierte (FITC) Anti-Maus-Antikörper (z. B. Sigma, DAKO)
- Waschpuffer, Substrat/Chromogenlösung (Rezeptur siehe Anhang)
- Standardmäßige Laborausstattung für ein Viruslabor (Sterilwerkbank, Umkehrmikroskop, CO_2-Schrank (37 °C), Zentrifuge, Inkubator (80 °C), Kühlschrank, Kühltruhe (-20 °C, -70 °C).

Puffer

PBS⁻:	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,15 g	Na_2HPO_4 x $2H_2O$
	0,2 g	KH_2PO_4
		ad 1000 ml Aqua dest.
IP pH 7,2⁻:	8,28 g	NaCl
	1,186 g	Na_2HPO_4 x $2H_2O$
	0,2 g	KH_2PO_4
		ad 1000 ml Aqua dest.
TBST:	0,05 M	Tris
	0,138M	NaCl
	0,0027M	KCL, pH 8,0
	0,05 %	Tween20
		(SIGMA, T-9039, Tris buffered saline with Tween20, pH 8,0)

Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO):
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

für rote Kernfärbung: zu 100 ml Fluoreszenzpuffer 100 µl Propidiumiodid-Stammlösung (2 mg/ml) zugeben.

3.1.2 Antigennachweis mittels ELISA

Für den Antigennachweis werden amtlich zugelassene ELISA-Testkits nach Herstellerangaben unter Berücksichtigung der diagnostischen Lücke eingesetzt. Der jeweils aktuelle Stand zugelassener Mittel ist der Homepage des FLI zu entnehmen.
https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf

3.1.3 Antigennachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz

Hautstanzen (vorzugsweise mind. 6 mm Ø) werden in flüssigem Stickstoff oder in auf ca. -70 °C herabgekühltem n-Heptan schockgefrostet und bei -70 °C gelagert.
Etwa 5 µm dicke Kryostatschnitte werden luftgetrocknet (ca. 30 min). Die Fixierung erfolgt in auf ca. -20 °C vorgekühltem Azeton für 15 bis 20 min bei ca. -20 °C.
Fixierte Kryostatschnitte können mehrere Monate bei ca. -20 °C gelagert werden.

In einem *Prüfansatz* werden bearbeitet:

1. Schnitte von verdächtigen Organproben,
2. Schnitte von Organproben eines BVDV-freien Rindes (= negative Kontrollen),
3. Schnitte eines BVDV-positiven Rindes (= positive Kontrollen).

In jedem Prüfansatz kommen zur Anwendung:

1. Anti-Pestivirus-mAk (z. B. WB 103/105, INDICAL BIOSCIENCE GmbH)
2. Irrelevanter mAk

Protokoll
Alle folgenden Schritte erfolgen bei RT.

- Waschen der fixierten Kryostatschnitte in PBS für 5 min
- Blockierung mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS für 30 min
- Kurz waschen in PBS
- Inkubation mit mAk in vom Hersteller empfohlener Arbeitsverdünnung in PBS für 60 min
- Waschen in PBS: dreimal 5 min
- Inkubation (mit FITC-Anti-Maus-Konjugat) in empfohlener Arbeitsverdünnung für 60 min:

Verdünnung in PBS und Zusatz des Kontrastfarbstoffes Evans blue (3 Teile Konjugat-Arbeitsverdünnung + 1 Teil 0,005 % Evans blue in PBS)

- Waschen in PBS: dreimal 5 min
- Waschen in A. dest. für mindestens 5 min
- Lufttrocknung
- 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 Beurteilung der Schnitte erfolgt im Vergleich mit den negativen und positiven Kontrollschnitten. Pestivirusantigen-positive Zellen zeigen zytoplasmatische, weitgehend homogene, leuchtende hellgrüne Fluoreszenz. Die Zellkerne bleiben dunkel ausgespart. Virusantigen findet sich in Keratinozyten der Epidermis, im Haarfollikelepithel, in Haarmatrixzellen der Haarzwiebel sowie in der dermalen Haarpapille.

3.1.4 Antigennachweis mittels Durchflusszytometrie

Der Virusnachweis mittels Durchflusszytometrie wird nur noch in wenigen Laboren angewandt. Es sind laborintern validierte Protokolle zu verwenden.

3.1.5 Virusgenomnachweis mittels RT-PCR

Für den Nachweis von BVD-Virusgenom werden amtlich zugelassene Testkits nach Herstellerangaben und Vorgaben der amtlichen Methodensammlung eingesetzt. Der aktuelle Stand zugelassener Mittel ist der Homepage des FLI zu entnehmen.
https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf

Die Nukleinsäureextraktion ist in der Regel nicht Gegenstand der Zulassung, es sei denn, sie ist integrierter Bestandteil des Testkits. Gleiches trifft auf die Schnelllyse von Ohrstanzproben zu.

Für eine Ermittlung der absoluten Genomlast in der Probe stellt das FLI einen Standard (DIsyn) zur Verfügung. Auf der Grundlage der Bestimmung der Kopienzahl ist eine Abschätzung des Status (PI, Nicht-PI) des positiv getesteten Tieres weitestgehend möglich. Bei Kopienzahlen von ≥ 10^4/well in Serum und Ohrstanzproben nach RNA-Extraktion bzw. ≥ 10^3,5/well nach Schnelllyse von Ohrstanzproben besteht eine hinreichende Sicherheit für das Vorliegen eines PI-Status.

Die Verwendung validierter in-house Protokolle ist möglich, wenn sie den Bedingungen für eine Ausnahmegenehmigung nach § 17 c des Tierseuchengesetzes entsprechen und eine entsprechende Genehmigung durch die beauftragte Behörde erteilt wurde. Gegenwärtig trifft das für konventionelle PCR-Protokolle, z. B. mit dem Ziel der nachfolgenden Sequenzierung und für genotypdifferenzierende Protokolle zu.

Genotypisierung

Eine von der DVG-Fachgruppe AVID zur Anwendung empfohlene genotypdifferenzierende real time RT-PCR ist der folgenden Referenz zu entnehmen: Gaede, W., Reiting, R., Schirrmeier, H., Depner, K.R., Beer, M., (2005): Nachweis und Spezies-spezifische Differenzierung von Pestiviren mit der real-time RT-PCR. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 118, 113-120 bzw. AVID Methodensammlung.

Subtypisierung

Die Bestimmung des BVDV-Subtypes und die epidemiologische Einordnung (= molekulare Epidemiologie) BVDV-positiver Proben erfolgt am BVD-NRL, Insel Riems. Dazu bittet das NRL um Übersendung BVDV-positiver Proben. Zur Subtypisierung können native Proben, RNA-Extrakte und Organmaterial/Ohrstanzproben in PCR-Schnelllysepuffer oder in Antigen-ELISA-Puffer eingesandt werden.

3.2 Indirekter Erregernachweis

3.2.1 Neutralisationstest

Prinzip

Der 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 Visualisierung der Testergebnisse erfolgt mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunperoxydasetest.

Testdurchführung

Probenaufarbeitung

Der Neutralisationstest wird mit Serum durchgeführt. Nur in Ausnahmefällen, wenn kein Serum zur Verfügung steht oder wenn spezielle Fragestellungen zu beantworten sind, kann der Test auch mit Plasma durchgeführt werden. Dann ist aber ein höherer Grenztiter (~ 1 : 20) anzusetzen.

Serum wird aus Blutproben ohne gerinnungshemmenden Zusatz gewonnen. Für die Verwendung im Neutralisationstest werden die Seren für 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Plasma wird aus Blutproben mit gerinnungshemmenden Zusätzen gewonnen.

Verdünnungsreihen

Der Test wird in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte unter Verwendung von Zellkulturmedium mit Antibiotikazusatz (siehe Anhang) 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 oder vier Kavitäten (Doppelansatz, bzw. Vierfachansatz) nebeneinander beschickt. Ein Beispiel für eine Plattenbelegung ist w. u. gezeigt.

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 bzw. 12 Verdünnungsstufen). Die letzten 50 µl werden verworfen. Jede Kavität enthält jetzt 50 µl einer Serum-Medium-Verdünnung. Mindestens zwei positive Referenzseren (BVD-Ref1 für BVDV-1-AK; BVD-Ref2 für BVDV-2-AK; Herkunft: BVDV-NRL, FLI Insel Riems) werden in gleicher Weise als Kontrollen mitgeführt (positive Serumkontrollen).

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}/50µl (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 w. u. zu finden.

Kontrollen

Neben den positiven Serumkontrollen werden eine Zellkontrolle (100 µl Kulturmedium ohne Serum und Virus), je zu testendes Serum eine virusfreie Serumkontrolle (Grundverdünnung), eine Viruskontrolle und eine Rücktitration des Testvirus zur Bestimmung der eingesetzten KID_{50} mitgeführt. 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. 180 µl Kulturmedium werden vorgelegt, 20 µl Testvirussuspension dazugegeben (= 1 : 10) und anschließend ausverdünnt. Pro Verdünnungsstufe werden zwei oder vier Kavitäten nebeneinander mit 100 µl Virusverdünnung beschickt.

Neutralisation

Die Mikrotiterplatte inkubiert daraufhin für 2 Stunden bei 37 °C in einer feuchten Umgebung in einem CO_2-Schrank (2,5 bzw. 5 % CO_2). 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 konfluenter Zellrasen entsteht (ca. 300.000 Zellen/ml). Die Mikrotiterplatte verbleibt für 72 Stunden zur Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Umgebung im CO_2-Schrank (2,5 % bzw. 5 % CO_2).

Immunreaktion

Grundsätzlich, d. h. auch bei Verwendung eines zytopathogenen NT-Virus sollte die Auswertung des Testes nach Detektion des Virus mittels Immunfluoreszenz- bzw. Immunperoxydasetest nach 3 Tagen erfolgen.

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

Neutralisationstiter = V-d(S-0,5)

V: lg der ersten 100 % pos. Serumverdünnung

d: lg des Verdünnungsfaktors (0,3)

S: Summe der pos. Reagenten von 0 bis 100 % Reagentenzahl je Verdünnung

Geräte und Reagenzien

- Mikrotiterplatten (96-well)
- Mehrkanalpipetten, Pipetten, sterile Plastikspitzen
- Empfängliche Zellkulturen, z. B.: MDBK, KOP-R (Bio-Bank des FLI)
- Zellkulturmedien
- Referenzviren, BVD 1: NADL; BVD 2: CS8644 (Bio-Bank des FLI)
- monoklonale Antikörper gegen Pestiviren (z. B. INDICAL BIOSCIENCE GmbH)
- Peroxidasemarkierte Anti-Maus-Antikörper (z. B. Sigma)
- Positiv- und Negativreferenzen
- Standardmäßige Laborausstattung für ein Viruslabor (Sterilwerkbank, Umkehrmikroskop, CO_2-Schrank (37 °C), Zentrifuge, Wärmeschrank (80 °C), Kühlschrank, Kühltruhe (-20 °C, -70 °C).
- Referenzseren: BVDV-NRL, FLI Insel Riems
- Antibiotikalösung 1,25 g Penicillin
  2 g Streptomycin
  In 20 ml sterilem Aqua bidest, lösen, portionieren
  und bei –20 °C einfrieren

  oder

  Gentamycin, 1 µl/ml Kulturmedium (50 ng/ml)
  Amphotericin, 10 µl/ml

<u>Rechenbeispiel zur Berechnung des Verdünnungsfaktors für das Testvirus:</u>

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

Titer $\log_{10}$ KID_{50}/0,1 ml Ausgangsvirus minus $10^{2,3}$* = $\log_{10}$ Virusverdünnung;
entlogarithmieren

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

<u>Beispiel:</u>

Der Titer des Ausgangsvirus beträgt $10^{6,3}$ KID_{50}/ml. Das sind $10^{5,3}$ KID_{50}/0,1ml.

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

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

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

Plattenbelegungsschema:

	Serum 1		Serum 2		Serum 3		Serum 4		Serum 5		Serum 6	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
ND50												

	Serum 7		Serum 8		Serum 9		Serum 10		Rücktitration		Serum-/ Zellkontrollen	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											S1	S2
B											S3	S4
C											S5	S6
D											S7	S8
E											S9	S10
F											ZK	ZK
G												
H											VK	VK
ND50												

3.2.2 Antikörper-ELISA

Für den Nachweis von BVD-Antikörper werden amtlich zugelassene Testkits nach Herstellerangaben und Vorgaben der amtlichen Methodensammlung eingesetzt. Der aktuelle Stand zugelassener Mittel ist der Homepage des FLI zu entnehmen.

https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf

Falldefinition – Bovine Virus Diarrhoe / Mucosal Disease; Virus der Bovinen Virus-Diarrhoe (BVDV 1 und 2)

Klinisches Bild

Erreger: Zwei verschiedene Genotypen (BVDV 1 und 2) sowie zahlreiche Subtypen (1a bis ~~l~~u, 2a bis ~~c~~d), jedoch keine Serotypen. Zwei verschiedene Biotypen: nicht-zytopathogen (nzp) und zytopathogen (zp).
Infektion nicht-gravider Tiere: Zumeist subklinischer Verlauf, selten Symptome wie Fieber, respiratorische Störungen oder schwere akute Erkrankungen (z. B. „hämorrhagisches Syndrom“).
Infektion im ersten Trimenon der Gravidität: Fruchtresorption, Abort, Geburt persistent infizierter Nachkommen (PI-Tiere, nur nzp BVDV).
Infektion im zweiten und dritten Trimenon der Gravidität: Abort, Mumifikation, Geburt veränderter und geschwächter Kälber.
Mucosal Disease: Besondere Form, die nur bei PI-Tieren vorkommt und mit schweren, blutigen Durchfällen, Erosionen sowie hämorrhagischen Veränderungen der Schleimhäute einhergeht. Ursache ist das Auftreten eines zum Persistenzstamm immunologisch identischen oder sehr ähnlichen zp BVDV.

Inkubationszeit variabel, meist zwei bis 14 Tage

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:
Erregernachweis (Virusanzucht und -identifizierung)

- Antigennachweis (zugelassene Antigen-capture ELISAs [ERNS- oder NS3-spezifisch], indirekte Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie)
- Genomnachweis (RT-PCR)

Indirekter Nachweis:

- Antikörpernachweis (Neutralisationstest, zugelassene ELISAs [NS3-*blocking*-ELISA, E^{rns}(E0)-blocking-ELISA, indirekter ELISA])

Zusatzinformation

„Diagnostische Lücke“: Nach der Aufnahme kolostraler Antikörper ist eine sichere Diagnose, in Abhängigkeit von der Methode, in den ersten acht bis zwölf Lebenswochen nicht möglich.
Diagnostische Stichprobe: BVDV-Antikörpernachweis bei ausgewählten Tieren einer epidemiologischen Einheit (z. B. „Jungtierfenster“). Hohe Seroprävalenz spricht für Kontakt zu PI-Tier. Virusnachweise mittels RT-PCR können auch bei transienten BVDV-Infektionen in seltenen Fällen mehr als 28 Tage positiv reagieren.

Bovine Virus Diarrhoe (BVD)

Epidemiologischer Zusammenhang

Größte epidemiologische Bedeutung hat das PI-Tier. Ziel ist die Detektion, Elimination und Verhinderung von PI-Tieren.

Voraussetzung für den Verdacht

Erregernachweis beim Rind

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzung für die Feststellung eines Falles:

- zwei positive Erregernachweise im Abstand von maximal 40 Tagen (persistent infiziertes Rind) oder
- Erregernachweis, ohne dass eine Wiederholungsuntersuchung stattgefunden hat oder
- ein an Mucosal Disease erkranktes Rind sowie
- die Nachkommen eines persistent BVD infizierten Rindes

Rechtsvorschriften

- Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV-Verordnung) in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung

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