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

Amtliche Methode und Falldefinition

Bovine Virus Diarrhoe (BVD)

Inhaltsverzeichnis

Vorwort 3

Amtliche Methode/Official method 3

1. Charakterisierung der Infektion/Characterization of the infection 3

1.1 Erreger/Pathogen 3

1.2 Klinische Symptomatik/Clinical picture 3

1.3 Pathologie/Pathology 5

1.4 Differentialdiagnostik/Differential diagnosis 5

1.5 Diagnostische Indikation/Diagnostic indication 5

1.6 Zuständige Untersuchungseinrichtung/Responsible investigation facility 6

1.7 Rechtsgrundlagen/Legal bases 6

2. Untersuchungsmaterialien und Probenschemata/Sample material and test scheme 7

2.1 Anerkannte Untersuchungen zum BVDV-Nachweis/Accepted methods for BVDV-detection 8

2.2 Bestätigungsuntersuchung/Confirmatory testing 11

2.3 Anerkannte Untersuchungen auf BVDV-Antikörper/Accepted methods for antibody detection ... 11

3. Untersuchungsgang/Examination 13

3.1 Erregernachweis/Pathogen detection 13

3.2 Indirekter Erregernachweis/Indirect pathogen detection 18

Falldefinition – Bovine Virus Diarrhoe / Mucosal Disease; Virus der Bovinen Virus-Diarrhoe (BVDV 1 und 2) Case definition – Bovine viral diarrhea/mucosal disease; bovine viral diarrhea virus (BVDV-1 and BVDV-2) 23

Vorwort

Bei diesem Dokument handelt es sich um die offizielle Version des BVD-Kapitels, die gemeinsam mit den Anträgen der Bundesländer auf Genehmigung eines BVD-Tilgungsprogrammes bzw. auf Gewährung des Status „frei von BVD“ an die EU-Kommission übermittelt wurde. Daher erscheinen einige Abschnitte zweisprachig (deutsch/englisch).

Amtliche Methode/Official method

1. Charakterisierung der Infektion/Characterization of the infection

1.1 Erreger/Pathogen

Der Erreger ist unter anderem gemeinsam mit dem Virus der Klassischen Schweinepest und dem Border Disease Virus in das Genus Pestivirus in der Familie der *Flaviviridae* eingruppiert. Weitere, atypische Pestiviren (u. a. „Giraffe“, „Pronghorn“, „HoBi“, „Bungowannah“, „APPV“ oder das phocine Pestivirus) sind beschrieben. Es werden zwei Genotypen des Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV) als selbständige Spezies unterschieden (BVDV-1 bzw. *Pestivirus A* und BVDV-2 bzw. *Pestivirus B*), 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 einzelsträngigen RNA positiver Polarität von einer Länge von ca. 12 kB.

The pathogen is grouped into the genus Pestivirus within the family *Flaviviridae*, along with the other classical pestiviruses classical swine fever virus and border disease virus. Several atypical pestiviruses (including e.g. "Giraffe", "Pronghorn", "HoBi", "Bungowannah", "APPV", phocine pestivirus) are described. The genus Pestivirus exists in the two distinct species *Pestivirus A* (BVDV-1) and *Pestivirus B* (BVDV-2). Genomic subtyping is possible. According to their growth in cell culture, BVDV isolates of both species are classified into the two distinct biotypes cytopathic (cp) and non-cytopathic (ncp). BVDV is an enveloped virus, about 40 to 60 nm in size and the genome consists of a single-stranded RNA of positive polarity with a length of about 12 kB.

1.2 Klinische Symptomatik/Clinical picture

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.

Acute infections are usually asymptomatic, but some animals, especially young calves, may experience fever, loss of appetite, serous nasal discharge, mild respiratory disease or diarrhea. In milking cows, an infection could lead to a decrease in milk yield. The induced immunosuppression favors other infections. In addition, an acute infection with BVDV, particularly with BVDV-2 strains, may occasionally cause hemorrhagic syndromes with severe pulmonary symptoms, bloody diarrhea and erosions in the digestive tract.

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 infizierte (PI) 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*.

Infections of naïve pregnant animals result, depending on the time of gestation, in fertility disorders, abortions, stillbirths, malformations or the birth of weak calves. When the infection occurs between the 30th and about the 90th day of pregnancy with BVDV of the ncp biotype, persistently infected (PI) calves are born. These PI calves shed high amounts of BVDV throughout their lives as they are unable to develop specific antibodies against the particular virus strain they are infected with. Within the first twelve months of life, about half of the PI animals develop the so-called mucosal disease (MD).

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).

Mucosal Disease (MD) occurs when persistently viremic animals are infected with a closely related cp BVDV, or (more often) when the ncp biotype mutates in the animal into the cp virus. Clinical signs include chronic emaciation, fever, anorexia, bloody, therapy-resistant diarrhea, salivation, erosions in the area of the hard palate, on the muzzle and nose and, less frequently, in the interdigital space, the coronary band and udder. The disease is inevitably fatal. Please note that erosive changes may also occur after acute infections with highly virulent virus strains, but the pathogenesis differs from cases of MD.

1.3 Pathologie/Pathology

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.

For pathological examination, predominantly animals that have died from MD are submitted. In addition to the clinically visible erosive and ulcerative stomatitis (particularly hard palate, gingiva, papillae of the cheek mucosa), erosions can be found throughout the esophagus, on rumen pillars and on the edges of the gastric mucosa, in the abomasum and in the entire intestine. In rare cases, the virus is not detectable, even when pronounced pathomorphological alterations are visible. Highly virulent ncp BVDV strains may lead to high-grade thrombocytopenia with subsequent hemorrhagic syndromes.

Intrauterine infections up to the 100th day of pregnancy lead to the death of the fetus, to abortions, mummified fetuses or the development of PI animals. Malformations that might be induced when infections occur after the 100th day of pregnancy include microencephaly, cerebellar hypoplasia, hydranencephaly, hydrocephalus, microphthalmia ("oculocerebellar syndrome"), thymus aplasia, hypotrichosis congenita, brachygnathy, growth retardation of hypoplasia and hypoplasia.

1.4 Differenzialdiagnostik/Differential diagnosis

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

Malignant catarrhal fever, rinderpest, foot and mouth disease and other vesicular diseases, papular stomatitis, chemical burns, intoxications.

1.5 Diagnostische Indikation/Diagnostic indication

- Antigen-, Genom- und Antikörperuntersuchungen nach Delegierter Verordnung (EU) 2020/689.
- Klinischer und/oder pathologischer Verdacht auf MD bzw. Vorliegen eines hämorrhagischen Syndroms.

- Antigen, genome and antibody detection according to Commission Delegated Regulation (EU) 2020/689
- Clinical and/or pathological suspicion of MD or the presence of a hemorrhagic syndrome

1.6 Zuständige Untersuchungseinrichtung/Responsible investigation facility

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

- Veterinary laboratories in the German federal states
- National reference laboratory for BVD/MD at the Friedrich-Loeffler-Institut, 17493 Greifswald-Insel Riems

1.7 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)/Legal bases (as amended)

- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen (DelVO 689)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 der Kommission zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/686 der Kommission zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates betreffend die Zulassung von Zuchtmaterialbetrieben sowie die Anforderungen an die Rückverfolgbarkeit und die Tiergesundheit in Bezug auf Verbringungen innerhalb der Union von Zuchtmaterial von bestimmten gehaltenen Landtieren
- Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus – BVDV-Verordnung in der jeweils gültigen Fassung.
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung

- Commission Delegated Regulation (EU) 2020/689
- Commission Delegated Regulation (EU) 2020/688
- Commission Delegated Regulation (EU) 2020/686
- German BVD regulation as amended
- Regulation on notifiable animal diseases as amended

2. Untersuchungsmaterialien und Probenschemata/Sample material and test scheme

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 (Tabelle 1). Im Folgenden werden zulässige diagnostische Verfahren zur Zertifizierung der BVD-Freiheit eines Rindes bzw. Rinderbestandes und zur Bestätigung der Antikörperfreiheit unter Berücksichtigung der diagnostischen Lücke aufgeführt. Detaillierte Protokolle sind im Abschnitt "Untersuchungsgang" beschrieben.

The detection of persistently BVDV-infected cattle could be impaired by the ingestion of colostrum that contains antibodies against BVDV (= diagnostic gap). The restrictions depend on the amount of antibody absorbed, the method used and the time of sampling (Table 1). In the following, permitted diagnostic procedures for certification of BVD-free cattle or cattle herds and for the confirmation of the absence of antibodies are listed, taking into account the diagnostic gap. Detailed protocols are described in the section "Examination".

Tabelle 1: Diagnostische Lücke in Abhängigkeit von verwendeter Testmethode und Probenmaterial

Methode	Untersuchungsmaterial	Diagnostische Lücke
E^{RNS}-Antigen-ELISA	Serum, Plasma, EDTA-Blut, Organe	< 30. Tag
	~~Organe,~~ Hautbioptate	Keine diagnostische Lücke
NS3-Antigen-ELISA	Blutleukozyten	3. - 90. Tag
Durchflusszytometrie	Blutleukozyten	3. - 90. Tag
Virusisolierung	Blutleukozyten	7. - 40. Tag
RT-PCR	Serum, Plasma, EDTA-Blut, Leukozyten, Organe	Poolproben: 7. - 40. Tag Einzelproben: keine diagnostische Lücke
	~~Organe, Milch,~~ Einzelmilch, Hautbioptate	Keine diagnostische Lücke

Table 1: Diagnostic gap, depending on the test method and sample material

Method	Sample material	Diagnostic gap
E^{RNS} antigen-ELISA	Serum, plasma, EDTA blood, organs	< 30th day of life
	~~Organs~~ Skin biopsy (ear notch)	No diagnostic gap
NS3 antigen-ELISA	blood leukocytes	Day 3 - 90
flow cytometry	blood leukocytes	Day 3 - 90
Virus isolation	blood leukocytes	Day 7 - 40
RT-PCR	Serum, Plasma, EDTA blood, leukocytes, organs	Pooled samples: day 7 - 40 Individual samples: no diagnostic gap
	~~Organs, milk,~~ individual milk, skin biopsy (ear notch)	No diagnostic gap

2.1 Anerkannte Untersuchungen zum BVDV-Nachweis/Accepted methods for BVDV-detection

2.1.1 Amtlich zugelassene E^{RNS}-Antigenfänger-ELISA/licensed E^{RNS}-based antigen ELISAs

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.

Sample material: Serum, plasma, EDTA blood, blood leucocytes, organs and skin biopsy (ear notch)

Sampling: For blood samples: before colostrum intake or after the age of 30 days

Samples examined before the 30th day of life that tested negative may be used for status definition, if an antibody test (antibody-ELISA, neutralization test) is carried out in parallel with a negative result. Blood samples examined before this time point with positive results can be used as well.
For skin biopsies, there are no restriction.

2.1.2 Amtlich zugelassene p80-Antigenfänger-ELISA/licensed p80-based antigen ELISAs

Probenmaterial: Blutleukozyten, Hautbioptate, soweit vom Hersteller vorgesehen.
Probenahme: Vor Aufnahme von Kolostrum oder im Alter von mehr als 90 Tagen.

Sample material: Blood leucocytes, skin biopsies, as indicated by the manufacturers
Sampling: Before colostrum intake or after the age of 90 days

2.1.3 RT-PCR mit amtlich zugelassenen Testkits/RT-PCR using licensed test kits

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.
In begründeten Einzelfällen sind in Mastbeständen alternative Verfahren wie die Untersuchung von Maultupfern denkbar, aber nur, wenn sie die diagnostische Sicherheit der PI-Erkennung nicht reduzieren. Die Beprobung von Tieren bis zu einem Alter von 3 Monaten unterliegt aufgrund der diagnostischen Lücke jedoch weiterhin klaren Einschränkungen.

Sample material: Serum, plasma, whole-blood samples, leucocytes, milk, organs/tissues, skin biopsy (ear notch)
Sample pools of up to 25 (ear notch samples) or 50 animals (serum, plasma, blood, leucocytes, milk) and according to the instructions of the respective kit manufacturer

Sampling: No restriction when blood samples are tested individually; investigation of pooled blood samples is only allowed when the samples are taken on days 0 to 7 post partum or from an age of more than 40 days. Samples examined before the 40th day of life that tested negative may be used for status definition, if an antibody test (antibody-ELISA, neutralization test) is carried out in parallel with a negative result. Blood samples examined before this time point with positive results can be used as well.
There are no restrictions for tissue samples, neither for individual nor pooled investigation.

Remark: By way of calculation, the analytical sensitivity of the licensed test kits would allow the investigation of larger pools. However, when using automated sample preparation systems the requirements for acceptable quality management are not met for pools of more than 50 blood or 25 ear notch samples. An increase of the sample number to a maximum of 100 might be possible, when only blood samples obtained from BVDV-free holdings are investigated and when an additional internal validation of the pooling process is implemented and it is ensured that at least 5 µl per individual sample is present in the pool.

2.1.4 Virusisolierung auf permissiven bovinen Zellkulturen, z. B. KOP-R-Zellen oder primäre bovine Zellkulturen/Virus isolation using bovine cell culture, e.g. KOP-R cells or primary bovine cells

Probenmaterial: Mindestens 1 x 10^6 aufgereinigte und gewaschene Leukozyten (vorzugsweise) bzw. Serum, Organ- (Milz, Lymphknoten, Thymus) oder Gewebeproben (Ohrstanzproben).

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

Sample material: At least 1 x 10^6 purified leucocytes (preferably) or serum, organ material (spleen, lymph node, thymus) or tissue samples (ear notch)

Sampling: Before colostrum intake or after the age of 40 days

2.1.5 Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz/Antigen detection using immunofluorescence

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

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

Sample material: organs or skin biopsies 6 to 8 mm in size

Sampling: postmortem or from living animals (ear notch samples), no restrictions regarding the time point

2.1.6 Durchflusszytometrische Analyse nach Immunfluoreszenzfärbung mit p80-spezifischen Antikörpern/Flow cytometric analysis subsequent to immunofluorescence staining with p80-specific antibodies

Probenmaterial: Aufgereinigte Leukozyten aus mindestens 50 µl Vollblut.
Probenahme: Vor Aufnahme von Kolostrum oder im Alter von mehr als 90 Tagen.
Sample material: purified leucocytes from at leat 50 µl blood
Sampling: Before colostrum intake or after the age of 90 days

2.2 Bestätigungsuntersuchung/Confirmatory testing

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.

The competent authority may authorize that affected cattle are separated and examined again for BVDV after a period of maximal 40 days after the first examination, provided that this does not conflict with animal disease control measures. Confirmatory examinations should only be carried out, if there are clear indications that the positive laboratory result is to be questioned and/or if there is no epidemiological indication of a BVDV entry in the relevant herd. For the follow-up testing, the different sensitivities of the methods have to be taken into account (diagnostic gap).

2.3 Anerkannte Untersuchungen auf BVDV-Antikörper/Accepted methods for antibody detection

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).

For the detection of antibodies against BVDV, licensed commercial test kits are used according to the manufacturer’s instructions. Alternatively, serum neutralization tests can be used. The reference sera Ref1-BVDV1 and Ref2-BVDV2 have to be reliably detected by the applied neutralization tests.

2.3.1 Testsysteme für die Bestätigung der Antikörperfreiheit/Test systems to confirm freedom from anti-BVDV antibodies

- 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.

- Neutralization tests against BVDV-1 and BVDV-2 using 100 TCID50 of the test virus (gold standard)
- Licensed BVDV-p80 or E^{rns}(E0) blocking ELISAs
- Licensed indirect ELISAs

2.3.2 Testsysteme für die diagnostische Stichprobe (z. B. „Jungtierfenster“)/Test systems for spot testing of young stock (calves > 6 months of age to avoid the influence of maternal antibodies)

- 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.

- Licensed indirect antibody-ELISAs (from the age of 6 months)
- Neutralization tests against BVDV-1 and BVDV-2 using 100 TCID50 of the test virus (from the age of 9 months)
- Licensed BVDV-p80 or E^{rns}(E0) blocking ELISAs (from the age of 9 months)

The different time restrictions are based on the differing sensitivities of the test systems for colostral antibodies. When younger animals are tested, only a negative result is valid and suitable for status definition.

2.3.3 Testsysteme für die Untersuchung von Einzel- und Tankmilchproben/Test systems for the investigation of individual or bulk milk samples

Alle für die Untersuchung von Milch zugelassenen Testsysteme. Es ist ausschließlich eine Differenzierung in „Milch-positive“ und „Milch-negative“ Bestände vorzunehmen. Für die Untersuchung von Tankmilchproben sind zugelassene Testsysteme empfohlen, die bei einer Zielprävalenz von maximal 50% ein positives Ergebnis erwarten lassen (z.B.: ID Screen® BVD p80 Antibody Competition (Innovative Diagnostics), SVANOVIR® BVDV-Ab (Svanova)).

All test systems validated and licensed for the examination of milk. A differentiation into “milk-positive” and “milk-negative” holdings is to be made. For the analysis of bulk milk samples, licensed ELISAs are recommended that allow to expect a positive result at a target prevalence rate of 50 %.

3. Untersuchungsgang/Examination

3.1 Erregernachweis/Pathogen detection

3.1.1 Virusisolierung/Virus isolation

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.

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 Fluorezenzerhaltungspuffer (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)

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, CO2-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	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
	0,2 g	KH_2PO_4
		ad 1000 ml Aqua dest.
IP pH 7,2⁻:	8,28 g	NaCl
	1,186 g	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
	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/Antigen detection using 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

For antigen detection, licensed ELISA tests are used according the manufacturer's instruction, taking the diagnostic gap into consideration. The latest version of a list of licensed kits is available from the homepage of the FLI.

3.1.3 Antigennachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz/Antigen detection using indirect immunofluorescence

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/Antigen detection using flow cytometry

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/Virus genome detection using 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 §11 Abs. 5 des Tiergesundheitsgesetzes 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/Indirect pathogen detection

3.2.1 Neutralisationstest/Neutralization test

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

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 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)

Beispiel:

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/ELISA for antibody detection

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

For antibody detection by ELISA, licensed tests are used according the manufacturer's instruction and in accordance with the specifications of the official collection of methods. The latest version of a list of licensed kits is available from the homepage of the FLI.

Falldefinition – Bovine Virus Diarrhoe / Mucosal Disease; Virus der Bovinen Virus-Diarrhoe (BVDV 1 und 2) Case definition – Bovine viral diarrhea/mucosal disease; bovine viral diarrhea virus (BVDV-1 and BVDV-2)

Klinisches Bild/Clinical picture

Erreger: Zwei verschiedene Genotypen (BVDV 1 bzw. *Pestivirus A* und BVDV 2 bzw. *Pestivirus B*) sowie zahlreiche Subtypen (1a bis u, 2a bis 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

Pathogen: two distinct genotypes (BVDV-1 resp. *Pestivirus A* and BVDV-2 resp. *Pestivirus B*), numerous subtypes, but no serotypes; two distinct biotypes (ncp and cp)
Acute infection of non-pregnant animals: predominantly subclinical course of the disease, occasionally clinical symptoms including fever, respiratory distress, or severe diseases (e.g. hemorrhagic syndromes)
Infections during the first trimester of gestation: fertility disorders, abortion, birth of persistently infected calves (PI animals, only ncp BVDV)
Infection in the second and third trimesters of gestation: abortion, mummification, birth of malformed or weak calves.
Mucosal disease: Special form that occurs only in PI animals and that is associated with severe, bloody diarrhea, erosions and hemorrhagic changes in the mucous membranes. Induced by the occurrence of a cp BVDV, which is immunologically identical or very similar to the persisting BVDV strain.

Incubation period: variable, usually two to 14 days

Labordiagnostischer Nachweis/Laboratory diagnostics

Erregernachweis (Virusanzucht und -identifizierung)

- Antigennachweis (zugelassene Antigen-capture ELISAs [E^{RNS}- oder NS3-spezifisch], indirekte Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie)
- Genomnachweis (RT-PCR)
- Virusisolierung

Indirekter Nachweis:

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

Direct virus detection (virus isolation and identification)

- Antigen detection (licensed antigen ELISAs, indirect immunofluorescence, flow cytometry)
- Genom detection (RT-PCR)
- Virus isolation

Indirect detection

- Antibody detection by neutralisation test or licensed ELISAs

Zusatzinformation/Additional information

„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.

„Diagnostic gap“: After the intake of antibody-positive colostrum, reliable diagnostics is only possible from an age of 8 to 12 weeks of life (dependent on the test method).
Spot testing: BVDV antibody detection in randomly selected animals of an epidemiological unit (e.g. testing of young stock (calves > 6 months of age to avoid the influence of maternal antibodies)). High seroprevalence suggests contact to a PI animal.
In cases of transient infections, virus detection by RT-PCR may be rarely positive for more than 28 days.

Epidemiologischer Zusammenhang/Epidemiological link

Größte epidemiologische Bedeutung hat das PI-Tier. Ziel ist die Detektion, Elimination und Verhinderung von PI-Tieren.
Ein epidemiologischer Zusammenhang kann gegeben sein, wenn im gleichen Landkreis oder innerhalb einer größeren administrativen Einheit (Regierungsbezirk/Bundesland) während der letzten 9 Monate spezifische BVDV-Antigene oder -Nukleinsäuren, die nicht infolge einer Impfung aufgetreten sind, in einer Probe von einem Tier nachgewiesen wurden.

PI animals are the major source for the spread and perpetuation of BVDV in cattle populations. Therefore, the aim is the detection, elimination and prevention of PI animals.
There could be an epidemiological link, if BVDV antigen or specific nucleic acids (not related to vaccination) have been detected in a sample from an animal in the same district or within a larger administrative area (governorate/federal state) within the last 9 months.

Voraussetzung für den Verdacht gemäß DelVO689

Verdachtsfall, wenn

a) klinische Untersuchungen, Nekropsieuntersuchungen oder Laboruntersuchungen ergeben haben, da klinische Anzeichen, *Post-mortem*-Läsionen oder histologische Befunde für das Vorliegen einer BVD-Infektion sprechen,
b) die Ergebnisse einer Diagnosemethode an einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren auf die wahrscheinliche Präsenz von BVD-Virus hindeuten oder
c) ein epidemiologischer Zusammenhang mit einem bestätigten Fall festgestellt wurde.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzung für die Feststellung eines Falles gemäß DelVO689:

Bestätigter Fall, wenn

a) BVD-Virus, mit Ausnahme von Impfstämmen, bei einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren isoliert wurde,
b) spezifische Antigene oder Nukleinsäuren des BVD-Virus, die nicht infolge einer Impfung aufgetreten sind, in einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren nachgewiesen wurden, die klinische Anzeichen für die Seuche oder einen epidemiologischen Zusammenhang mit einem Verdachtsfall oder bestätigten Fall aufweisen, oder
c) eine indirekte Diagnosemethode an einer Probe von einem Tier oder einer Gruppe von Tieren, die klinische Anzeichen für eine BVD-Infektion oder einen epidemiologischen Zusammenhang mit einem Verdachtsfall oder bestätigten Fall aufweisen, zu einem positiven Ergebnis geführt hat, das nicht die Folge einer Impfung ist.

Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für die Prävention und Bekämpfung bestimmter gelisteter Seuchen hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ für bestimmte gelistete und neu auftretende Seuchen (DelVO 689)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 der Kommission zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der Union
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/686 der Kommission zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates betreffend die Zulassung von Zuchtmaterialbetrieben sowie die Anforderungen an die Rückverfolgbarkeit und die Tiergesundheit in Bezug auf Verbringungen innerhalb der Union von Zuchtmaterial von bestimmten gehaltenen Landtieren
- 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