

Bundesanstalt für Finanzdienstleistungsaufsicht

Bekanntmachung über einen Entschädigungsfall

Vom 28. Oktober 2008

Die Bundesanstalt für Finanzdienstleistungsaufsicht gibt nach § 5 Abs. 1 Satz 3 des Einlagensicherungs- und Anlegerentschädigungsgesetzes bekannt, dass sie für das Institut

Lehman Brothers Bankhaus AG,
Rathenauplatz 1,
60313 Frankfurt am Main,

den Entschädigungsfall gemäß § 5 Abs. 1 Satz 2 des Einlagensicherungs- und Anlegerentschädigungsgesetzes festgestellt hat. Das Institut gehört folgender Entschädigungseinrichtung an:

Entschädigungseinrichtung deutscher Banken GmbH (EdB),
Burgstraße 28,
10178 Berlin.

Bonn, den 28. Oktober 2008

BA 16 - K 5003 - 100140 - 2008/0001

Bundesanstalt
für Finanzdienstleistungsaufsicht

Im Auftrag
Peter Abrahams

Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Bekanntmachung der amtlichen Methodensammlung für die Untersuchung der Bovinen Virusdiarrhoe

Vom 30. Oktober 2008

Nach § 4 Abs. 3 des Tierseuchengesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004 (BGBl. I S. 1260, 3588) macht das Friedrich-Loeffler-Institut nachstehend die amtliche Sammlung von Verfahren zur Probennahme und Untersuchung von Untersuchungsmaterial tierischen Ursprungs für die Bovine Virusdiarrhoe bekannt (Anlage).

Greifswald Insel Riems, den 30. Oktober 2008

Der Präsident des
Friedrich-Loeffler-Instituts
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter

Anlage

12 BVD/MD – Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease

12.1 Charakterisierung der Infektion

12.1.1 Erreger

Der Erreger bildet gemeinsam mit dem Virus der Klassischen Schweinepest und dem Border Disease Virus das Genus Pestivirus in der Familie der Flaviviridae. Es werden 2 Genotypen als selbstständige Spezies unterschieden, bei denen jeweils zytopathogene (cp) und nicht-zytopathogene (ncp) Biotypen vorkommen. Weitere Subtypisierungen auf genomischer Grundlage sind möglich. Es handelt sich um ein 40–60 nm großes, behülltes Virus, das Genom besteht aus einer einsträngigen RNA positiver Polarität von einer Länge von ca. 12 kB.

12.1.2 Klinische Symptomatik

Akute Infektionen verlaufen i. d. R. symptomlos, vor allem bei Kälbern können Fieber, Inappetenz, seröser Nasenausfluss, milde Atemwegserkrankung oder Durchfall auftreten, bei Kühen kann es zum Rückgang der Milchleistung kommen. Selten (in Amerika häufiger beschrieben) tritt ein „hämorrhagisches Syndrom“ mit Blutungen an den Schleimhäuten und Parenchymen sowie hoher Mortalität auf.

Eine **Infektion trächtiger Tiere** resultiert in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion in Fruchtbarkeitsstörungen (Umrindern infolge Fruchtretenion), Aborten, Totgeburten, Missbildungen und Geburt von lebensschwachen Kälbern. Bei Infektionen zwi-

schon dem 40. und dem 120. Graviditätstag werden persistent virämische Kälber geboren, die entweder kümmern (ca. 50 %), aber sich auch normal entwickeln können.

Die **late onset** Form der BVD stellt die tödlich verlaufende Mucosal Disease dar, die entsteht, wenn persistent virämische Tiere BVD-Viren beider Biotypen (cp und ncp-BVDV) tragen. 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.

12.1.3 Pathologie

Zur pathologisch-anatomischen Untersuchung gelangen in erster Linie an Mucosal Disease 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 Pansenfeilern und an den Rändern der Blättermagenschleimhaut, im Labmagen und im gesamten Darm. Auch bei ausgeprägten pathomorphologischen Befunden ist mitunter kein Virus nachweisbar. Bestimmte hochvirulente ncp-BVDV-Stämme führen zu hochgradiger Thrombozytopenie mit nachfolgendem hämorrhagischem Syndrom.

Intrauterine Infektionen bis zum 100. Graviditätstag führen zum Tod des Fötus, Aborten oder mumifizierten Früchten. Zu den nach Infektionen nach dem 100. Graviditätstag auftretenden Missbildungen zählen Mikroenzephalie, zerebellare Hypoplasie, Hydrozephalie, Hydrozephalus, Mikrophthalmie („okulozerebellares Syndrom“), Thymusaplasie, Hypotrichosis congenita, Brachygnathie, Wachstumsverzögerung und Hypoplasie der Lungen.

12.1.4 Differentialdiagnostik

Bösartiges Katarrhalieber, Rinderpest, Maul- und Klauenseuche und andere vesikuläre Erkrankungen, Stomatitis papulosa, Verätzungen, Intoxikationen

12.1.5 Diagnostische Indikation

– Antigen-, Genom- und Antikörperuntersuchungen nach BVD-Verordnung

– Klinischer und/oder pathologischer Verdacht auf Mucosal Disease bzw. Vorliegen eines hämorrhagischen Syndroms

12.1.6 Zuständige Untersuchungseinrichtungen

– Veterinäruntersuchungseinrichtungen der Länder

– Nationales Referenzlabor für BVD/MD am Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems (Telefon: 03 83 51-7 02 12) – Abklärungsuntersuchungen

12.1.7 Rechtsgrundlagen

– Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus – BVDV-Verordnung –

– Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.10.6., Bovine Viral Diarrhea, 5th edition, 2004

12.2 Untersuchungsmaterialien und Probenschemata

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

12.2.1 Anerkannte Untersuchungen zum BVDV-Nachweis

12.2.1.1 Erregernachweis bei Tieren mit positivem oder unbekanntem BVDV-Antikörperbefund

12.2.1.1.1 Nach § 17c des Tierseuchengesetzes zugelassene E^{RNA}-Antigen-Fänger-ELISA-Tests

Probenmaterial: Serum, Plasma, EDTA-Vollblut, gereinigte und gewaschene Blutleukozyten, Organproben und Hautbiobate eines Tieres

Probenmenge: Nach Angaben des Herstellers

Probenaufbereitung: Einzelproben nach Angaben des Herstellers

Probennahme: Vor Aufnahme von Kolostrum sowie im Alter von mehr als 60 Tagen für Blutproben, keine Einschränkung für Hautbiopate und andere Organproben.

12.2.1.1.2 Nach § 17c des Tierseuchengesetzes zugelassene NS3-Antigen-Fänger-ELISA-Tests

Probenmaterial: Blutleukozyten eines Tieres, Hautbiopate, soweit vom Hersteller vorgesehen

Probenmenge: Nach Angaben des Herstellers

Probenaufbereitung: Einzelproben nach Angaben des Herstellers

Probennahme: Vor Aufnahme von Kolostrum oder im Alter von mehr als 90 Tagen; bei optimierter Leukozytenpräparation aus frischen, nicht hämolytischen EDTA-Blutproben mit intensivem Waschen von aufgereinigten Leukozytenpellets ist eine Erweiterung des Probenzeitraumes auf Tag 0 bis 3 post partum zulässig. Keine Einschränkung für Hautbiopate, allerdings ist bei Tieren < 90 Tagen ein negatives Ergebnis durch eine Antikörperuntersuchung am Ohrgewebelysat und ggf. weitere Tests abzuklären.

12.2.1.1.3 Durchflusszytometrische Analyse nach NS3-Immunfluoreszenzfärbung mit nach § 17c Tierseuchengesetz zugelassenen NS3-spezifischen Antikörpern

Probenmaterial: Aufgereinigte Leukozyten eines Tieres

Probenmenge: Leukozyten aus mindestens 50 µl Vollblut eines Tieres

Probenaufbereitung: Hämolyse, Waschen des Leukozytenpellets

Probennahme: Vor Aufnahme von Kolostrum oder im Alter von mehr als 90 Tagen; bei optimierter Leukozytenpräparation aus frischen, nicht hämolytischen EDTA-Blutproben mit intensivem Waschen von aufgereinigten Leukozytenpellets ist eine Erweiterung des Probenzeitraumes auf Tag 0 bis 3 post partum zulässig.

12.2.1.1.4 Virusisolierung auf permissiven bovinen Zellkulturen, z.B. KOP-R-Zellen oder primären bovinen Zellkulturen

Probenmaterial: Aufgereinigte und gewaschene Leukozyten (vorzugsweise) oder Serum eines Tieres, Organproben (Milz, Lymphknoten, Thymus)

Probenmenge: Mehr als 1×10^6 Leukozyten eines Tieres im Doppelansatz, aufgearbeitete Organproben

Probenaufbereitung: Hämolyse und effizientes Waschen des Leukozytenpellets; Organanreibungen.

Probennahme: Vor Aufnahme von Kolostrum oder im Alter von mehr als 40 Tagen; bei optimierter Leukozytenpräparation aus frischen, nicht hämolytischen EDTA-Blutproben mit intensivem Waschen von aufgereinigten Leukozytenpellets ist eine Erweiterung des Probenzeitraumes auf Tag 0 bis 7 post partum zulässig. Keine Einschränkung für Organproben.

12.2.1.1.5 RT-PCR mit nach § 17c des Tierseuchengesetzes zugelassenen Testkits

Probenmaterial: Serum, Plasma, Vollblut, gereinigte und gewaschene Leukozyten, Milch, Organ- oder Gewebeproben

Poolproben von bis zu 50 Tieren bzw. nach Herstellerangaben

Probenmenge: Nach den Angaben der Hersteller

Probenaufbereitung: Nach den Angaben der Hersteller

Probennahme: Für Einzelblutproben keine Einschränkung; für gepoolte Blutproben Tag 0 bis 7 post partum oder ab einem Alter von mehr als 40 Tagen, keine Einschränkung für Gewebeproben als Einzel- oder Poolproben.

12.2.1.1.6 Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz mit nach § 17c des Tierseuchengesetzes zugelassenen Antikörpern bzw. Konjugaten

Probenmaterial: Organ- und Gewebeproben (Hautstanzen),

Probenmenge: ca. 6–8 mm große Gewebestücke

Probenaufarbeitung: Kryoschnitte, einschließlich negativer Gewebe- und Antikörperkontrollen

Probennahme: postmortal oder am lebenden Tier (Hautstanzen), keine zeitliche Einschränkung.

12.2.1.2 Erregernachweis bei Tieren mit negativem BVDV-Antikörperbefund

Alle unter Nummer 12.2.1.1 genannten Methoden können bei nachweislich BVDV-Antikörper-negativen Tieren ohne Altersgrenze angewendet werden.

12.2.2 Bestätigungsuntersuchung

Bei der Bestätigung von vermutlich persistent infizierten Tieren durch eine zweite Untersuchung muss die unterschiedliche Sensitivität der beschriebenen Methoden berücksichtigt werden. Es sind folgende Untersuchungsabstände einzuhalten:

– Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR): mindestens 42 Tage

– Virusisolierung: mindestens 28 Tage

– Antigen-Fänger-Enzyme-Linked-Immunosorbant-Assays (ELISA): mindestens 21 Tage

– Durchflusszytometrie: mindestens 21 Tage

Ein negativer Befund kann bereits vor Ablauf dieser Fristen hoben werden.

12.2.3 Anerkannte Untersuchungen auf BVDV-Antikörper

Alle BVDV-Antikörper-Tests müssen die BVDV-Referenzseren Ref1_BVDV1 und Ref3_BVDV2 – bereitgestellt vom Friedrich-Loeffler-Institut – sicher erkennen.

12.2.3.1 Testsysteme für die Bestätigung der Antikörperfreiheit nach Nummer 1.2

– Neutralisationstest gegen BVDV-Typ 1 und BVDV-Typ 2 (BVDV-1/2-NT) mit 100 KID₅₀ Testvirus.

– Zugelassene BVDV-NS3-Antikörper-blocking-Tests.

– Zugelassene indirekte BVDV-Antikörper-ELISAs.

12.2.3.2 Testsysteme für die Diagnostische Stichprobe (z.B. „Jungtierfenster“)

12.2.3.2.1 Ab einem Alter der Tiere von sechs Monaten:

Zugelassene indirekte BVDV-Antikörper-ELISAs

12.2.3.2.2 Ab einem Alter der Tiere von zwölf Monaten:

– Neutralisationstest gegen BVDV Typ 1 und BVDV Typ 2 (BVDV-1/2-NT) mit 100 KID₅₀ Testvirus.

– Zugelassene BVDV-NS3-Antikörper-blocking-Tests

– Zugelassene indirekte BVDV-Antikörper-ELISAs

Die unterschiedliche, zeitliche Einschränkung erfolgt aufgrund der unterschiedlich hohen Sensitivität der Testsysteme für kolostrale Antikörper.

Ein negativer Befund dieser Tests ist auch im jüngeren Alter für die Stichprobenbeurteilung geeignet.

12.2.3.3 Testsysteme für die Untersuchung von Tankmilchproben

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

12.3 Untersuchungsgang

12.3.1 Erregernachweis

12.3.1.1 Virusisolierung

Leukozyten

Hämolyse und Waschen der Leukozyten, z.B. 1,5 ml EDTA-Blut + 4,5 ml Lysispuffer (8,29 g/l NH₄Cl, 1,0 g/l KHCO₃, 1 mM EDTA), 10 min Eis, Zentrifugation bei 1000 rpm, 2-mal Waschen mit Zellkulturmedium + Antibiotika (z.B. Gentamycin, 50 ng/ml; Baytril, 20 µg/ml; oder Penicillin/Streptomycin), Resuspendierung, in der Aufarbeitung sollten >10⁶ Leukozyten sein.

Alternativ: 5–10 ml EDTA-Blut mit 1 ml Dextranulfatlösung versetzen und nach vorsichtigem Schwenken etwa 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur (alternativ 30 Minuten bei 37 °C) stehen las-

sen. In dieser Zeit setzen sich die Erythrozyten ab. Den leukozytenhaltigen milchig-trüben Überstand absaugen und für 10 Minuten 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 (besser über Nacht) Aufbewahrung bei $4-8^{\circ}\text{C}$ wird die Organsuspension für 15 Minuten 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 1–2 Tage gewachsene Zellkulturen, von denen das Anzuchtmedium vorher entfernt wurde, inokuliert. Nach einer Adsorptionszeit von 30–60 min bei 37°C , wird das Inokulum entfernt (nicht bei frischem Leukozytenpellet) und nach ein- bis zweimaligem Waschen 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 96 well Zellkulturplatten mit dem Ziel einer Immunfärbung weiterverimpft. Es werden in der Regel bis zu drei Passagen durchgeführt.

Immunfärbung

Fixation

Das Kulturmedium wird abgesaugt und der Zellrasen einmal mit isotonischem Phosphatpuffer (z.B. PBS) gewaschen. Vor der Fixation für 2 h in einem Trockenschrank bei 80°C ist der Zellrasen gründlich zu trocknen (z.B. Fön). Nach dem Abkühlen der Platten erfolgt die Immunfärbung. Wenn die zu untersuchenden Platten nicht sofort weiter bearbeitet werden können, besteht die Möglichkeit sie kurzfristig (<1 Woche) bei 4°C und längerfristig (>1 Woche) bei -20°C zu lagern. Alternative laborübliche Fixationsmethoden (z.B. 80 % Azeton, 4 % Paraformaldehyd) können angewendet werden, wenn ihre Eignung gezeigt wurde.

Immunfärbung

Die Immunfärbung kann direkt mit einem geprüften BVDV- bzw. pan-pesti-Konjugat durchgeführt werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, in direkt mit einem monoklonalen Antikörper, der an das Testvirus bindet und einem FITC-, bzw. POD-markierten Anti-Maus-Antikörper zu färben.

Durchführung der Fluoreszenzfärbung

Direkte Methode:

- Zugabe von 50–100 μl eines Fluorochrom- (z.B. FITC-)markierten Antikörpers in Gebrauchsverdünnung in IP bzw. PBS⁻, (bei Bedarf 0,001 % Evans blue),
- Inkubation bei 37°C für 1 h, Waschen der Zellen 2 x mit PBS⁻ oder IP pH 7,2 und 1 x $10'$ mit PBS⁻ oder IP pH 7,2, Puffer absaugen, 1 x Waschen mit Aquadest, Eindecken der Zellen mit Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO-Puffer)

Indirekte Methode:

- Zugabe von 50–100 μl eines antigenspezifischen monoklonalen Antikörpers (z.B. C16, Bommeli; Wb103/105, c.c.pro) in Gebrauchsverdünnung in PBS⁻ oder IP pH 7,2,
- Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde, Absaugen des Antikörpers, einmal Waschen in IP bzw. PBS⁻
- Zugabe von 50–100 μl des 2. Antikörpers FITC-Anti-Maus-IgG (z.B. Firma DAKO Dänemark Best.-Nr. F0479) in Gebrauchsverdünnung (bei Zugabe von Evans blue – 0,001 % Endkonzentration)

- Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde, Absaugen des Konjugats,
- Waschen der Zellen 2 x mit PBS⁻ oder IP pH 7,2 und 1 x 10 min
- Absaugen des Puffers, 1 x Waschen mit Aquadest
- Eindecken der Zellen mit Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO-Puffer)

Durchführung der Peroxydasefärbung (indirekt)

- Zugabe des 50–100 μl eines antigenspezifischen monoklonalen Antikörpers (z.B. C16, Wb103/105) in Gebrauchsverdünnung in Verdünnungspuffer (PBS⁻ bzw. IP, 0,005 % Tween 20, 2 % Pferdeserum)
- Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde, Absaugen des Antikörpers, einmal Waschen in Waschpuffer (PBS⁻ bzw. IP, 0,005 % Tween 20)
- Zugabe des 2. Antikörpers POD-Anti-Maus-IgG (z.B. Sigma, A-9044) in Gebrauchsverdünnung
- Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde, Absaugen des Konjugats,
- Waschen der Zellen in Waschpuffer (2mal 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 PBS-Tween 20 aufgefüllt
 - Die AEC-Stammlösung wird portioniert bei -20°C gelagert

Achtung, AEC ist kanzerogen! (Laborhandschuhe tragen)

Geräte und Reagenzien

- Zellkulturflaschen (z.B. TC12,5, TC25)
- Pipetten
- Zellkulturplatten (6-, 24, 48, 96-well)
- Sterile Plastikspitzen
- Empfindliche Zelllinien, vorzugsweise KOP-R, MDBK, Klu, (Herkunft: Zellbank des FLI) oder primäre bovine Zellkulturen
- Spezifische monoklonale Antikörper gegen BVDV bzw. Pestiviren (z.B. c.c.pro)
- FITC-markiertes anti-BVD-Konjugat (z.B. BioX, c.c. pro)
- Peroxydasemarkierte (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	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
	0,2 g	KH_2PO_4
		ad 1000 ml Aqua dest
IP pH 7,2:	8,28 g	NaCl
	1,186 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
	0,2 g	KH_2PO_4
		ad 1000 ml Aqua dest

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 (wenige Tropfen)

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

12.3.1.2 Antigennachweis mittels ELISA

Für den Antigennachweis werden amtlich zugelassene ELISA-Testkits nach Herstellerangaben eingesetzt.

Folgende Testkits sind derzeit in Deutschland zugelassen:

- Herdchek BVDV AG/Leukozyten (IDEXX)
- Herdchek BVDV Ag/Serum Plus (IDEXX)
- BVD/MD p80 Ag (Inst. Pourquier)
- BVDV-antigen mix (Inst. Pourquier)
- PrioBVDV Ag PI plus
- PrioCHECK Ag PI focus

12.3.1.3 Antigennachweis mittels Indirekter Immunfluoreszenz

Zielstellung: Detektion persistent virämischer Tiere

Hautstanzen (vorzugsweise mind. 6 mm Ø) werden in flüssigem Stickstoff oder in auf ca. –70°C herabgekühltem n-Heptan schockgefroren 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:
- a) Anti-Pestivirus-mAk (z.B. WB 103/105, c.c. pro)
 - b) 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 min
- Kurz waschen in PBS
- Inkubation mit mAk in vom Hersteller empfohlener Arbeitsverdünnung in PBS für 60 min
- Waschen in PBS: 3 x 5 min
- Inkubation mit FITC-markiertem Sekundärantikörper (Anti-Maus-Ig-FITC-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: 3 x 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-Fluoreszenzerhaltung-Puffer

Mikroskopische Beurteilung der Schnitte

Für die mikroskopische Beurteilung der Schnitte ist ein aufrechtes Mikroskop mit Auflichtfluoreszenz (Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 W) 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 Haarfollikel-epithel, in Haarmatrixzellen der Haarzwiebel sowie in der dermalen Haarpapille.

12.3.1.4 Antigennachweis mittels Durchflusszytometrie

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

12.3.1.5 Virusgenomnachweis mittels RT-PCR

Für den Nachweis von BVD-Virusgenom werden zugelassene Testkits bzw. an ihnen validierte PCR-Protokolle eingesetzt.

Nachstehende PCR-Kits sind in Deutschland amtlich zugelassen:

- ADIAVET BVD REALTIME, (AES-Laboratoire)
- BVDV-LC®, LightCycler RT-PCR Kit, (AnDiaTec)

- BoVir-SL TaqMan RT-PCR-Kit (AnDiaTec)
- BVDV Q-PCR-HP (Inst. Pourquier)
- Virotype BVDV (LDL Leipzig)

Protokolle für eine konventionelle pan-pesti PCR unter Verwendung der Standardprimer nach Vilcek, eine subtypenspezifische BVD-RT-PCR und eine vom AVID zur Anwendung empfohlenen *real time* RT-PCR sind im Folgenden aufgeführt.

Konventionelle pan pesti RT-PCR (Hoffmann, mod. nach Vilcek)

RNA-Isolierung: Die RNA-Isolierung erfolgt mit Extraktionsverfahren, die für die Aufreinigung von viraler RNA aus den verschiedenen Ausgangsmaterialien zugelassen sind.

- zellfreie Proben: z.B. QIAamp RNA viral Mini Kit (Qiagen), Trizol (Invitrogen)
- zellhaltige Proben: z.B. RNeasy Mini Kit (Qiagen), Trizol (Invitrogen)

(1) Die gleichzeitige Aufreinigung von sicher negativen Proben zur Kontrolle des Kreuzkontaminationsfreien Arbeitens während der RNA-Extraktion ist empfohlen. Für die Aufreinigung von bis zu 7 Feldproben sollte mindestens eine RNA-Isolierungs-Kontrolle (RIC) mitgeführt werden. Bei einer größeren Anzahl von Proben sollte die Anzahl der RIC entsprechend erhöht werden.

(2) Die RNA-Extraktion erfolgt nach den Vorgaben der Hersteller und wird nur durch die Zugabe einer „Internen Kontroll-RNA (IC)“ zu jeder Probe modifiziert. Diese IC kontrolliert den Erfolg der RNA-Extraktion und der RT-PCR.

(3) Die Zugabe von Interner Kontroll-RNA (IC) zur Probe erfolgt nachdem der Lysispuffer die RNasen der Probe zerstört hat. Die Menge der eingesetzten IC-RNA richtet sich nach dem Elutionsvolumen und sollte davon $\frac{1}{10}$ betragen.

– Zum Beispiel bei einem Elutionsvolumen von 50 µl werden 5 µl IC der lysierten Probe zugesetzt

– IC-RNA in RNA-Safe-Buffer (RSB): 2×10^5 Kopien/µl

– 10 sec kräftig per Hand mixen

– Proben kurz zentrifugieren

(4) Weitere Co-Extraktion von viraler und IC-RNA entsprechend den Protokollen der Hersteller

– Lagerung der RNA: kurzfristig auf Eis; mittelfristig bei –20°C; langfristig bei –70°C

Durchführung der PCR:

(1) Die Amplifizierung erfolgt auf Basis des Superscript III One-Step RT-PCR Kits (#12574-026; Invitrogen) in 25 µl Gesamtvolumen.

(2) Als Kontrollen werden neben der RNA-Isolierungskontrolle (RIC) eine „No Template“ Kontrolle (NTC) und mindestens eine positive Kontrolle mitgeführt.

(3) Nach Herstellung der Mastermixe werden je 20 µl vorgelegt und 5 µl Template zugefügt.

Mastermix	Panpesti-Nachweis	
	1 X	N X
RNase freies Wasser	4,0 µl	
2x Reaction Mix	12,5 µl	
MgSO ₄ (5 mM)	0,5 µl	
SS III RT/Platinum Taq-Mix	1,0 µl	
Primer-1: ML120 (20pmol/µl)	1,0 µl	
Primer-2: ML121 (20pmol/µl)	1,0 µl	
Total Volumen Mastermix:	20 µl	
Template: Feldprobe/n (N x) RIC NTC (SDW) T7-PK3alf (2 x 10 ³ Kopien/µl)	je 5µl	
Cycler-Programm:	RT	30 min 50°C
	Inaktiv./Aktiv.	2 min 94°C
	Denaturierung	30 sec 94°C
	Annealing	1 min 57°C
	Elongation	1 min 68°C

40
Zyklen

Auswertung:

Die eingesetzten Primer amplifizieren ein Produkt von ca. 300 bp in den allermeisten Pestiviren (Ausnahme: atypisches Pestivirus Hobi)

- Für die NTC und die RIC sollte kein Amplifikat feststellbar sein.
- Für die PC (T7-PK3alf) sollte ein Produkt von ca. 300 bp feststellbar sein.
- Reagieren die positiven und negativen Kontrollen entsprechend den Erwartungen, ist eine Auswertung der Feldproben möglich.
- Hierbei werden alle Banden, die eine der PC ähnliche Größe aufweisen, als verdächtig angesehen.
- Eine abschließende Charakterisierung der positiven Feldproben ist über eine Sequenzierung von Abschnitten der 5'-NTR möglich.

Primer-Sequenzen (Vilcek)

Primer ML120 (=V324) 5'-ATG CCC WTA GTA GGA CTA GCA-3'

Primer ML121 (=V326) 5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3'

Genotypspezifische RT-PCR (n. Strebelow)**RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung erfolgt üblicherweise durch chromatographische Trennung an Silica-Oberflächen. Dafür sind in Abhängigkeit von der Probenart verschiedene kommerziell erhältliche Kits verwendbar.

Denaturierungsmix

Reagenzien	Konzentration	µl/Probe
DMSO p.a.	99,5 %	0,5
Primer rev.	15 pmol	1,0
Probe		2,5

Zur Denaturierung wird der Reaktionsansatz im Thermocycler erst 5 min auf 95 °C und dann für 2 min auf 42 °C erhitzt. Danach erfolgt Abkühlung auf 4 °C.

Der Reaktionsansatz wird dann zentrifugiert (zur Entfernung evtl. vorhandener Tröpfchen vom Gefäßrand oder Deckel).

Dann erfolgt die Zugabe des RT-Mix.

RT-Mix

Reagenzien	Konzentration	µl/Probe
5x –RT-Puffer	1x	3,0
dNTP-Mix	je 100 mM	0,4
Dest. Wasser Rnase frei		7,15
Rnasin	4 U	0,1
AMV-Revertase	3,5 U	0,35

Je 11 µl RT-Mix werden zur denaturierten Probe pipettiert. Der Ansatz wird geschüttelt und zentrifugiert und dann für 30 min bei 42 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Revertase wird dann für 5 min auf 98 °C erhitzt. Dann wird der Reaktionsansatz auf 4 °C abgekühlt und zentrifugiert. Danach erfolgt die Zugabe des PCR-Mix.

PCR-Mix

Reagenzien	Konzentration	µl/Probe
Magnesiumchlorid	25 mM	2,1
10x Polymerasepuffer	1x	3,5
steriles dest. Wasser		28,15
Primer forw.	15 pmol	1,0
Taq-Polymerase	1,25 U	1,25

Je 35 µl PCR-Mix werden zur Probe (RT-Ansatz) pipettiert. Mit 35 µl Mineralöl wird überschichtet. Die Reaktion wird dann einem Thermocyclus aus Denaturierung, Annealing und Elongation unterzogen.

Primer und Temperaturprofil für BVDV I

UTR51 (rev. Primer): 5'-CAA CTC CAT GTG CCA TGT AC-3'

BVD I (forw. Primer): 5'-GGT AGC AAC AGT GGT GAG TTC-3'

Temperaturprofil: 3 min 92 °C; 35 x (30 sec 92 °C, 30 sec 55 °C, 1 min 72 °C); 7 min 72 °C; 4 °C bis Ende (258bp)

Primer und Temperaturprofil für BVDV II

UTR51 (rev. Primer): 5'-CAA CTC CAT GTG CCA TGT AC-3'

BVD II (forw. Primer): 5'-AGC GGT AGC AGT GAG TTC ATT-3'

Temperaturprofil: wie für BVDV (257bp)

Auswertung und Validierung

Die Auswertung der RT-PCR erfolgt durch Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Spezifität positiver Reaktionen wird durch anschließende Direktsequenzierung der PCR-Fragmente überprüft.

Real time RT-PCR (n. Gaede)**Prinzip**

Nach der Nukleinsäure-Isolierung erfolgen mit Hilfe eines *one-tube* RT-PCR Kits die reverse Transkription viraler RNA in cDNA und die anschließende Amplifikation im als *real-time* RT-PCR im geschlossenen System.

Für den Virusnachweis ohne Speziesdifferenzierung werden Primer und eine Sonde mit pan-Pesti-Spezifität eingesetzt. Damit wird die sichere Detektion aller bisher bekannten BVDV-Stämme gewährleistet. Positive Resultate werden mit diesem System auch für KSPV und BDV erzielt.

Der spezifische Nachweis einer Infektion mit BVDV 2 ist mit Hilfe spezies-spezifische Sonde in Kombination mit einem weiteren pan-Pesti-Primerpaar möglich. Ein analoges spezifisches System für BVDV 1 existiert nicht. Die Sonde PPV reagiert zwar negativ auf BVDV 2, detektiert aber neben BVDV 1 auch BDV und KSPV. Indirekt ist die spezifische Bestätigung des Vorliegens von BVDV 1 nur durch den Ausschluss von BVDV 2, BDV und ggf. KSPV mit für diese Virusspezies spezifischen Sonden möglich.

Alternativ wird auf die Möglichkeit der Differenzierung durch die Analyse der viralen Gensequenzen bzw. durch spezifische Anfärbung von Virusisolaten mit Hilfe monoklonaler Antikörper verwiesen.

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgt üblicherweise durch chromatographische Trennung an Silica-Oberflächen. Dafür sind in Abhängigkeit von der Probenart verschiedene kommerziell erhältliche Kits verwendbar. In automatisierten Systemen kann die aktive Silica-Oberfläche zur Separation an Magnetpartikel gekoppelt sein. Die hier dargestellte Auflistung umfasst lediglich einige erprobte und geeignete Beispiele.

Blutserum und EDTA-Plasma (auch gepoolt)

Die RNA-Isolierung aus Blutproben erfolgt nach den Herstellerangaben der jeweiligen Kithersteller.

- RNeasy Mini Kit, (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- High Pure Viral RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- High Pure Viral Nucleic Acid Isolation Kit*** (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Agowa Mini Kit, manuelle und automatisierte Nukleinsäureextraktion (Agowa, Berlin, Deutschland)

*** bevorzugt bei unsauberen Plasmen mit Anteil an Zellen bzw. Hämoglobin, auch bei Vollblut einsetzbar

Milch (auch gepoolt)

Der BVDV-Nachweis in Milchproben erfolgt im Zellsediment. Dazu werden die Zellen von ca. 10 bis 50 ml (bei Poolproben) zur Sedimentation für 10 min bei 3000 g zentrifugiert, mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die weitere Bearbeitung erfolgt wiederum nach den Herstellerangaben der jeweiligen Kithersteller.

- RNeasy Mini Kit, (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- High Pure Viral Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Gewebe und Tupfer

Die RNA-Isolierung aus Geweben erfolgt nach den Herstellerangaben der jeweiligen Kithersteller.

- RNeasy Mini Kit, (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Zellkulturen

Zellen von Zellkulturen mit BVDV-verdächtigem CPE werden durch Abzentrifugieren gewonnen und danach entsprechend den Herstellerangaben des verwendeten Kits zur RNA-Isolation aufbereitet.

- RNeasy Mini Kit, (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- High Pure Viral Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Ansatz der RT-PCR

Die hier beschriebenen Parameter gelten für die Verwendung des Quantitect Probe RT-PCR Kits® (Qiagen, Hilden, Deutschland) auf dem Mx3000 (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) und iCycler (Biorad, Hercules, USA). Bei Verwendung anderer Geräte-Systeme für die *real-time* PCR kann eine Anpassung erforderlich werden, insbesondere wenn diese Geräte nicht im üblichen 96er Blockformat arbeiten. Die Eignung anderer Enzymkits ist im Bedarfsfall zu prüfen.

Reaktionsgemisch (20 µl): enthaltend

- 10 µl QuantiTect Probe RT-Mastermix,
- 0,2 µl QuantiTect Probe RT-Mix,
- 1,0 µl forward-primer (Gebrauchslösung: 10 pmol/µl),
- 1,0 µl reversed-primer (Gebrauchslösung: 10 pmol/µl),
- 1,0 µl Sonde (Gebrauchslösung: 4 pmol/µl****) und
- 2 µl RNA-Template

**** Die optimale Konzentration der Sonde kann variieren und muss ggf. überprüft werden.

Thermocycler-Programm für *one-step* RT-PCR:

- reverse Transkription: 50 °C, 30 min,
- Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase: 95 °C, 15 min,
- 45 Zyklen: Denaturierung bei 94 °C für 20 sek und Annealing/Primer-Extension bei 60 °C für 1 min.
- Messung der Fluoreszenz zum Ende der Annealingphase (FAM-Filter)

Auswertung und Validierung:

Die Spezifität und die diagnostische Sensitivität der *real-time* RT-PCR zum Nachweis und zur Differenzierung von BVDV 1 und BVDV 2 wurden in umfangreichen Untersuchungen an Virusisolaten der verschiedenen pestivirus-Spezies geprüft.

Die *real-time* RT-PCR dient in erster Linie zum qualitativen Nachweis von BVDV. Durch Erstellung von Eichkurven nach Paralleltitration von Virusstämmen für die PCR wie auch für die Virusisolierung auf der Zellkultur kann ein quantitativer Nachweis erfolgen. Eine absolute Quantifizierung bzw. die Ermittlung der labor-spezifischen Nachweisgrenze sind ebenfalls durch die Verwendung eines synthetischen Standards (Bezugsquelle: FLI Insel Riems) möglich.

Die typische Nachweisgrenze liegt bei ca. 50–100 Viruskopien. Bei BVDV-PI werden üblicherweise ct-Werte von 25–30 (positive Signale zwischen dem 25. und 30. Zyklus) gemessen. Bei der Untersuchung von Poolproben, die Blut oder Milch von PI enthalten, muss ein ct-Wert von ca. 30–35 erwartet werden. Eine Laborvergleichsuntersuchung hat ergeben, dass bei Zykluszahlen >35 die Gefahr falsch-positiver Reaktionen proportional zunimmt. Wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen können dagegen durch die Freisetzung zellulärer RNasen zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Tabelle 1: Primer für die BVDV *real-time* RT-PCR (pan-pesti)

Pestivirus-spezifische Primers (5'-UTR)	Quelle	Fragment	Anwendung
Primer: Pesti 3 CCT GAG TAC AGG RTA GTC GTC A Primer: Pesti 4 GGC CTC TGC AGC ACC CTA TCA	Hyndman et al. (1998)	~171 bp	<i>one-step</i> RT-PCR zum simultanen Nachweis von BVDV 1 und BVDV 2 in Kombination mit der Sonde TQ-Pesti
Primer: A 11 AGT ACA GGG TAG TCG TCA GTG GTT CG Primer: A 14 CAA CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA G	McGoldrick et al. (1998)	~220 bp	Differenzierung von BVDV 1 und BVDV 2 in Kombination mit den Sonden PPV oder BVD-2

Tabelle 2: TaqMan-Sonden für den simultanen Nachweis von BVDV 1 und BVDV 2 sowie zur Differenzierung von BVDV 1 und BVDV 2

TaqMan DNA-probes (5'-FAM und 3'-TAMRA)	Quelle	Spezifität
Sonde: TQ-Pesti („Reiting-Sonde“) TGC YAY GTG GAC GAG GGC ATG C	Gaede et al. (2005)	Genus Pestivirus
Sonde: BVD-2 CTG ATA GGG TGT AGC AGA GAC CCT	McGoldrick et al. (1999)	BVDV 2
Sonde: PPV CTG ATA GGG TGC TGC AGA GGC CCA CT	McGoldrick et al. (1999)	BVDV 1, außerdem CSFV und BDV

12.3.2 Indirekter Erregernachweis

12.3.2.1 Neutralisationstest

Prinzip

Dieser Test basiert auf einer *in vitro* Neutralisation einer definierten Virusmenge durch spezifische (neutralisierende) Antikörper in Seren. Durch logarithmische Verdünnung der Seren wird der neutralisierende Antikörpertiter bestimmt. Die 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 weiter unten 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 (8–12 Verdünnungsstufen). Die letzten 50 µl werden verworfen. Jede Kavität enthält jetzt 50 µl einer Serum-Medium-Verdünnung.

Mindestens zwei positive Referenzseren (BVD-ref1 oder 2 für BVD1-AK; BVD-ref3 für BVD2-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 KID₅₀ der Testvirussuspension gegeben. Die Testvirussuspension muss unmittelbar vor Gebrauch mit Kulturmedium auf 100 KID₅₀/50 µl (2000 KID₅₀/ml) eingestellt werden. Die benötigte Menge an Testvirus (ca. 5 ml pro Mikrotiterplatte) ist in einem Ansatz herzustellen. Der Verdünnungsfaktor um die Testvirussuspension auf 100 KID₅₀/50 µl einzustellen wird rechnerisch ermittelt. Ein Rechenbeispiel ist weiter unten 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 KID₅₀ 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 CO₂-Schrank (2,5 bzw. 5 % CO₂). Während dieser Zeit findet der Neutralisationsprozess statt.

Zellsuspension

Nach der Inkubationszeit werden in jede Kavität 100 µl der entsprechenden Zellsuspension hinzugefügt. Die Zelldichte muss so eingestellt sein, dass nach 24 Stunden ein konfluenter Zellrasen entsteht (ca. 300 000 Zellen/ml). Die Mikrotiterplatte verbleibt für 72 h zur Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Umgebung im CO₂-Schrank (2,5 bzw. 5 % CO₂).

Immunreaktion

Grundsätzlich, d. h. auch bei Verwendung eines zytopathogenen NT-Virus sollte die Auswertung des Testes nach Detektion des Virus mittel 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, (Herkunft: Zellbank des FLI)

Zellkulturmedien

– Referenzviren, BVD-1: NADL; BVD2: CS8644; Virusbank des FLI)

– monoklonale Antikörper gegen Pestviren (Herkunft: kommerzielle Anbieter, z. B. cc pro)

– Peroxidase markierte Anti-Maus-Antikörper (Herkunft: kommerzielle Hersteller, z. B. Sigma)

– Positiv- und Negativreferenzen

– Standardmäßige Laborausstattung für ein Viruslabor (Sterilwerkbank, Umkehrmikroskop, CO₂-Schrank (37 °C), Zentrifuge, Wärmeschrank (80 °C), Kühlschrank, Kühltruhe (–20 °C, –70 °C).

Reagenzien

Referenzseren: NRL BVD, FLI Insel Riems

Antibiotikallösung 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 KID₅₀/50 µl haben. Folglich muss das Ausgangsvirus entsprechend verdünnt werden. Die Berechnung des Verdünnungsfaktors erfolgt nach der Formel:

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

entlogarithmieren.

Reziproker Wert = Virusverdünnung.

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

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

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

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

→ Das Ausgangsvirus muss 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												

12.3.2.2 Antikörper-ELISA

Für den Antikörpernachweis werden amtlich zugelassene ELISA-Testkits nach Herstellerangaben eingesetzt.

Folgende Testkits sind derzeit in Deutschland zugelassen:

– HerdChek BVDV Ab (IDEXX)

indirekt

– Svanovir BVDV (2 Handelsformen) (Svanova)

indirekt

– Ceditest BVDV (Cedi Diagn.),

kompetitiv

– BVD/MD p80 Antikörper (Inst. Pourquier)

kompetitiv

– Chekit BVD-Sero II (Bommeli)

indirekt

– SERELISA BVD/MD Antikörper (Synbiotics)

kompetitiv

Sonstiges

Hinweis auf Veröffentlichungen im Amtlichen Teil des elektronischen Bundesanzeigers

Inhalt des Amtlichen Teils des elektronischen Bundesanzeigers vom 30. Oktober 2008:

Eisenbahn-Bundesamt

– Außenstelle Frankfurt/Saarbrücken –

Öffentliche Bekanntmachung gemäß § 23 Abs. 2 des Allgemeinen Eisenbahngesetzes (AEG) – Freistellung von Bahnbetriebszwecken betreffend Flurstücke in der Gemeinde Wiltingen –. Vom 24. Oktober 2008

Öffentliche Bekanntmachung gemäß § 23 Abs. 2 des Allgemeinen Eisenbahngesetzes (AEG) – Freistellung von Bahnbetriebszwecken betreffend ein Flurstück in der Stadt Bad Homburg –. Vom 27. Oktober 2008

Eisenbahn-Bundesamt

– Außenstelle Köln –

Öffentliche Bekanntmachung gemäß § 23 Abs. 2 des Allgemeinen Eisenbahngesetzes (AEG) – Freistellung von Bahnbetriebszwecken betreffend ein Flurstück im Bereich der Gemeinde Hennef –. Vom 27. Oktober 2008

Die Internetadresse lautet:

www.ebundesanzeiger.de