



Ing. A. Zollner, Cornelia Einfinger, Dr. H. Schweighardt, Anita Wunder, Dr. M. Dünser, Andrea Brandstätter und Dr. K. Schöpf (v. l. n. r.)

# Eradikation der Bovinen Virus Diarrhoe (BVD) mittels LightCycler® Real-Time PCR

VON MICHAEL DÜNSER, MICHAELA ALTMANN, MAXIMILIAN BIEBL, ANDREA BRANDSTÄTTER, CORNELIA EINFINGER, KARL SCHÖPF, HANS SCHWEIGHARDT, ANITA WUNDER UND ANDREAS ZOLLNER

Erstmalig wurde in Österreich ein Real-Time PCR-Verfahren in einem großangelegten Seuchenscreening an 45.448 Rindern aus 9.019 Tiroler Betrieben angewandt.

## Einleitung

Die systematische Bekämpfung von Tierseuchen bzw. Zoonosen gehört zu den Kernaufgaben der veterinärmedizinischen Institute der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit und hat mittlerweile jahrzehntelange Tradition. Durch Zusammenarbeit mit den Veterinärbehörden der Länder und des Bundes ist es gelungen, die heimischen Rinderbestände nachhaltig von gefährlichen Zoonosen, wie der Brucellose („Abortus Bang“, „Seuchenhaftes Verwerfen“), der Rindertuberkulose („Perlsucht“, „Schwindsucht“), sowie von wirtschaftlich bedeutsamen Seuchen, wie der Enzootischen Rinderleukose (Genus Deltaretrovirus) oder der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (Genus Varicellovirus), zu befreien. Während die klassischen Verfahren

der Serologie, wie Immunodiffusion, Komplementbindungsreaktion und Agglutinationsreaktionen, zusehends von Enzyme-linked Immunoassays (ELISA) verdrängt wurden, setzen sich molekularbiologische Verfahren, wie die Polymerase Chain Reaction (PCR), nur langsam durch, letztendlich, weil es für veterinärmedizinische Fragestellungen bislang kaum kommerziell erhältliche Testsysteme gibt und die Entwicklung, Etablierung und Validierung der Methoden somit den einzelnen Laboratorien obliegen.

Erstmals wurde in Österreich von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Veterinärabteilung der Tiroler Landesregierung ein systematisches Seucheneradikationsprogramm mittels Real-Time PCR in Kombination mit ELISA durchgeführt.

## Der Erreger der Bovinen Virus Diarrhoe

Die Bovine Virus Diarrhoe (BVD) zählt weltweit zu den wirtschaftlich bedeutendsten Infektionskrankheiten des Rindes. Sie wird durch ein

| Genotyp                           | Erreger  | Wirtsspektrum                                |
|-----------------------------------|--|--|
| Pestivirus Typ 1                  | Bovine Virus Diarrhoe Virus-1 (BVDV-1)<br>Bovine Virus Diarrhoe Virus-2 (BVDV-2) | Rind, Schaf, Ziege, Hirsch, Büffel, Schwein  |
| Pestivirus Typ 2                  | Klassische Schweinepest Virus (KSPV)   | Schwein                                      |
| Pestivirus Typ 3                  | Border Disease Virus (BDV)   | Schaf, Ziege, Rind                           |
| Unklassifizierte Pestivirus-Typen | Diverse Isolate  | Giraffe, Rentier, Antilope, Bison, Kantschil |

Tab. 1: Genus Pestivirus der Familie Flaviviridae

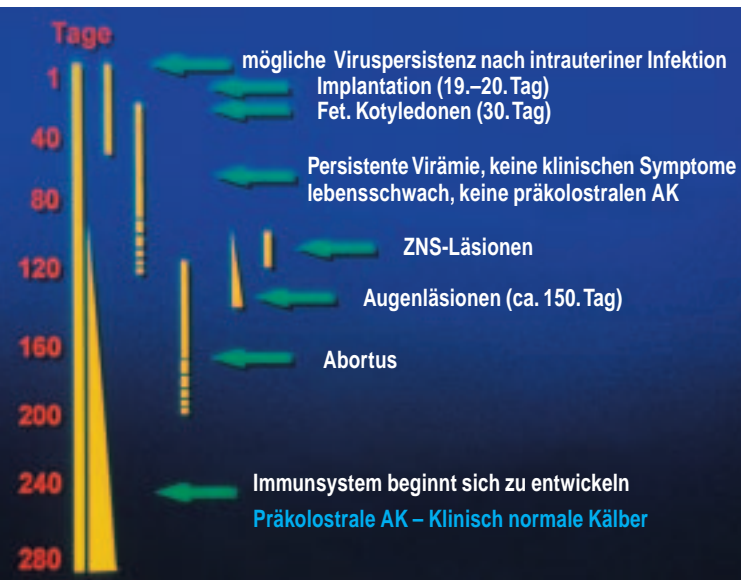


Abb. 1: Die unterschiedlichen Auswirkungen einer BVDV-Infektion während der Trächtigkeit



Abb. 3: Hydrozephalus durch eine BVDV-Infektion während der Gravidität



Abb. 2: Hämorrhagisches Syndrom infolge einer BVDV-Infektion; massive Hämorrhagien im Bereich des Herzens bei einem zwölf Wochen alten Kalb

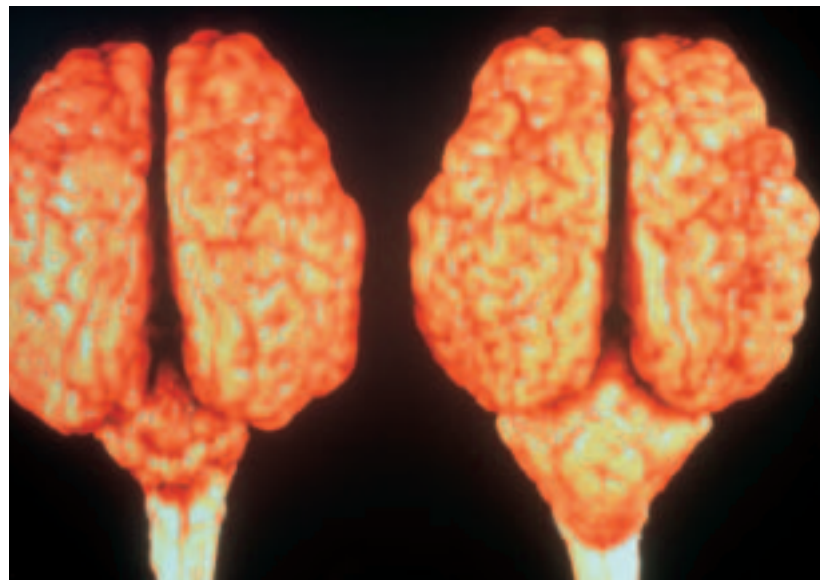


Abb. 4: Links Kleinhirnhypoplasie bei einem Kalb, rechts normal entwickeltes Kleinhirn bei einem gleichaltrigen Tier

Pestivirus (Tab. 1) aus der Familie der Flaviviridae hervorgerufen. Es handelt sich dabei um ein einzelsträngiges RNA-Virus mit positiver Polarität und einer Länge von 12,5 kb. In der Zellkultur lassen sich zwei verschiedene Biotypen des Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV)

unterscheiden, der zytopathogene (zp) sowie der nicht zytopathogene (nzp) Typus.

## Die klinischen Auswirkungen

Die Infektion mit dem Virus der BVD hat in Abhängigkeit vom Im-

munstatus und dem Trächtigkeitsstadium (Abb. 1) des betroffenen Tieres, der Immunitätslage der Herde, dem Geno- oder Biotyp des Erregers und seiner Virulenz verschiedenartige Auswirkungen:

– Die transiente postnatale Infektion immunkompetenter Rinder

nimmt meist einen subklinischen Verlauf, gegebenenfalls kommt es, meist in Verbindung mit Sekundärinfektionen, zu Pneumonien und/oder Durchfall („Bovine Virus Diarrhoe“) bzw. zu Störungen in der Blutgerinnung („hämorrhagisches Syndrom“) (Abb. 2).

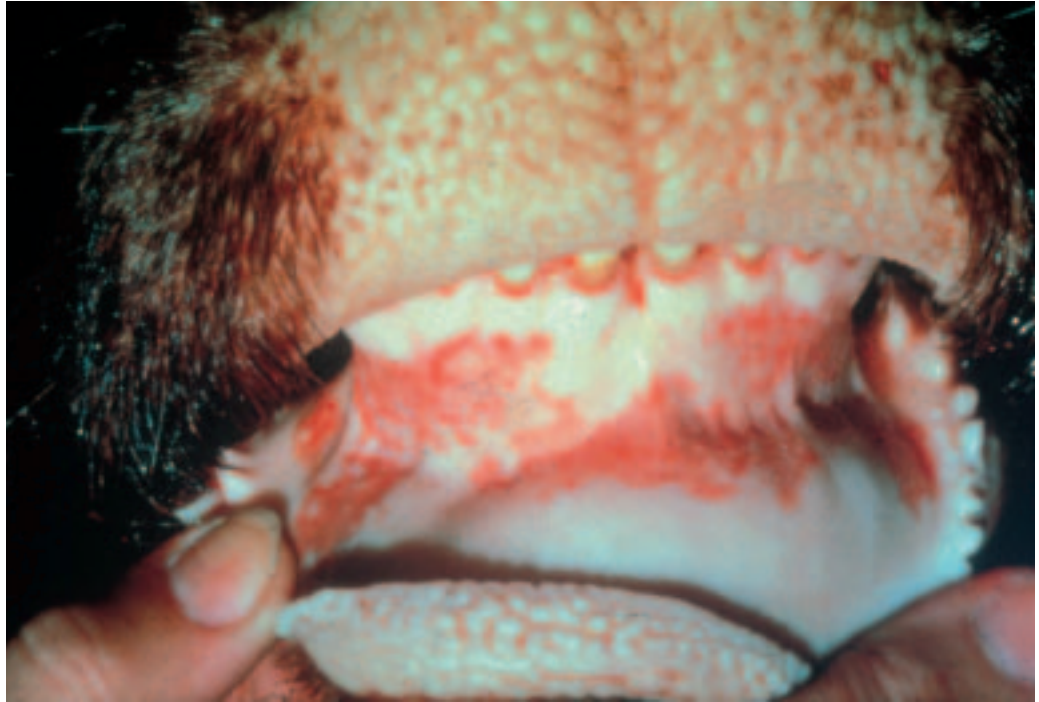


Abb. 5: Massive Erosionen im Bereich der Maulschleimhaut bei Mucosal Disease

- Die transplazentare Infektion des Embryo/Fetus

führt zu Fruchttod, Aborten, der Geburt mißgebildeter Kälber („okulozerebelläres Syndrom“) (Abb. 3, 4) oder aber der Geburt persistenter mit dem BVDV infizierter Kälber („PI-Tiere“). Virämiker bzw. PI-Tiere entstehen ausschließlich pränatal, eine postnatale Infektion mit dem BVDV führt lediglich zur transienten Virämie. Daraus resultiert letztendlich die Bildung neutralisierender Antikörper. Als typische klinische Erscheinungen haben PI-Tiere meist Durchfall, sie kümmern und leiden an Pneumonien.

- Die Superinfektion eines mit einem nsp Virusstamm infizierten PI-Tieres mit einem homologen sp Virusstamm führt zum Ausbruch der sogenannten „Mucosal Disease“ (MD) (Abb. 5), einer stets letal verlaufenden und mit schweren klinischen Erscheinungen ein-

hergehenden Allgemeinerkrankung.

### Seuchenbekämpfung

Aus seroepidemiologischen Studien geht hervor, daß in manchen Regionen bis zu 90% der Rinder im Laufe ihres Lebens eine BVDV-Infektion durchmachen und dann mit der Bildung neutralisierender Antikörper reagieren. Als wichtigste Faktoren für die Verbreitung des BVDV gelten die persistent mit dem Virus infizierten Tiere, da diese zeitlebens hohe Konzentrationen an Virus über sämtliche Körperexkrete und -sekrete ausscheiden und somit durch eine Neuinfektion trächtiger Rinder wiederum zum Entstehen von PI-Tieren beitragen.

Dem Auffinden und Ausmerzen solcher PI-Tiere kommt somit die entscheidende Bedeutung zu, um die Rinderbestände längerfri-

stig frei von dieser Seuche zu bekommen.

Der unkontrollierte Auftrieb von PI-Tieren auf Gemeinschaftsweiden bzw. die Alpung in den Gebirgsregionen spielen eine maßgebliche Rolle bei der BVDV-Verbreitung in seuchenfreie Bestände. Langjährige Erfahrungen in großen Rinderbeständen mit teilweise über 500 Tieren belegen, daß die ausschließliche Weiterverbreitung des BVDV über transiente immunkompetente Tiere letztendlich abbricht, wodurch einmal mehr die Bedeutung der PI-Tiere als Schlüssel zur Seucheneradikation belegt wird.

### BVD-Bekämpfung in Tirol

Im Rahmen eines von der Tiroler Landesregierung geförderten freiwilligen BVD-Bekämpfungsprogramms erfolgte seit 1999 eine systematische Untersuchung aller

Rinder in der Altersgruppe von drei Monaten bis drei Jahren mittels BVD-Antigen ELISA. Durch jährliche Wiederholungsuntersuchung der Bestände konnte der Anteil an PI-Tieren in der Tiroler Rinderpopulation von ursprünglich 1,22% im Jahr 1999 auf 0,23% (Stand 2003) reduziert werden.

## Bekämpfungsstrategien

Aufgrund der meist regional unterschiedlichen Betriebsgrößen und -strukturen gibt es verschiedene Modelle, die darauf abzielen, PI-Tiere ausfindig zu machen und aus der Herde zu entfernen.

### *Tankmilchserologie und Jungtierfenster*

PI-Tiere durchseuchen höchst wirkungsvoll eine Herde, wodurch sich über den Antikörpernachweis in der Tankmilch bzw. in Serumproben BVD-verdächtige Bestände erfassen lassen. In einer nachfolgenden kombinierten Antikörper/Antigen ELISA-Untersuchung erfolgt die Detektion möglicher PI-Tiere in Antikörper-positiven Beständen mittels ELISA. Dieses Verfahren wurde bereits in Skandinavien mit Erfolg eingesetzt, erfordert jedoch aufgrund des mehrstufigen Verfahrens und der verschiedenen Probenmaterialien (Tankmilch, Serumproben) einen erheblichen Aufwand, vor allem, was Administration und Probenlogistik anbelangt.

Da PI-Tiere am häufigsten in der Altersgruppe bis zu drei Jahren anzutreffen sind, ist alternativ bzw. ergänzend zur Tankmilchuntersuchung das sogenannte „Jungtier-

fenster“ entwickelt worden. Eine definierte Anzahl von Jungrindern einer epidemiologischen Einheit wird auf BVDV-Antikörper untersucht. Ein erhöhter Anteil an seropositiven Tieren kann einen Hinweis auf ein aktuelles BVD-Geschehen infolge eines PI-Tieres in der Herde geben.

### *Impfung*

Die Impfung ist ein Verfahren, das in praxi lediglich zur Bestands-sanierung angewandt wird, da es aufgrund der Heterogenität ruminanter Pestiviren zu keiner ausreichenden Immunität gegen alle möglichen BVDV-Feldstämme kommt. Ein flächendeckendes Bekämpfungsprogramm erscheint mit der Impfung somit nicht zielführend.

### *PCR-Screening mittels LightCycler® Real-Time PCR*

Die Entwicklung von Real-Time Geräten schuf erstmals die Voraussetzung, Massenuntersuchungen mittels PCR durchführen zu können. In der Real-Time PCR wird die konventionelle PCR mit einer sofortigen Detektion der entstehenden Amplifikate kombiniert. Durch den Einsatz von sequenzspezifischen fluoreszenzmarkierten Sonden erreicht man überdies ein Höchstmaß an Spezifität.

In unserem Verfahren wird die hohe Sensitivität der Real-Time PCR dahingehend ausgenutzt, gepoolte Proben von bis zu 20 Tieren in einem PCR-Gefäß zu untersuchen. Der Einsatz gepoolter Proben reduziert die Untersuchungskosten im

Vergleich zu den im ELISA erforderlichen Einzeltieruntersuchungen erheblich. Die systematische Untersuchung aller über zehn Wochen alten Tiere eines Bestandes vereinfacht zusätzlich die Seuchenbekämpfung im Gegensatz zum diffizilen Bekämpfungsmanagement beim sogenannten „Tankmilch“-Bekämpfungsprogramm.

## Material und Methode

### *Plasma versus Serum*

Umfangreiche Validierungsstudien zur Nachweisbarkeit viraler RNA in Serum bzw. Plasma wurden im Vorfeld unseres Screenings durchgeführt, um die optimale Matrix für den Nachweis des BVDV unter Praxisbedingungen respektive den Einfluß von Transportdauer und Transportbedingungen zu erheben.

Als optimales Probenmaterial zum Virusnachweis mittels Real-Time PCR erweist sich Plasma aus EDTA-Blutproben, während in Vollblutproben ein verhältnismäßig rascher Abbau der viralen RNA erfolgt.

### *Entnahme und Poolung der Blutproben*

Die Organisation der Probenentnahme erfolgte durch die Veterinärabteilung der Tiroler Landesregierung und wurde durch Amtstierärzte bzw. ortsansässige praktische Tierärzte vorgenommen. Mittels Vacutainer®-Blutentnahmesystem (Fa. Greiner) von 45.448 über zwei Wochen alten Rindern aus 9.019 Tiroler Rinderbeständen entnommene EDTA-Blutproben langten im Zeitraum März–April 2004

im AGES-Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Innsbruck ein. Mittels TECAN-Genesis 4-Kanal Pipettierroboter wurden automatisiert Plasmapools aus je 20 Einzelproben hergestellt und unverzüglich zur weiteren Real-Time PCR-Untersuchung an das AGES-Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Linz gesandt.

### Virus-RNA Extraktion

Zur Extraktion der viralen RNA aus den Plasmaprobe diente der High-Pure Viral RNA-Extraktionskit von Roche Diagnostics.

### Real-Time Reverse Transkriptase PCR

Da es sich beim BVDV um ein RNA-Virus handelt, ist vor der eigentlichen PCR ein sogenannter Reverse Transkriptase Schritt erforderlich, in dem die Virus-RNA in die komplementäre DNA umgeschrieben wird. Als Reagenzien für die Reverse Transkriptase Real-Time PCR verwendeten wir den QuantiTect Probe RT-PCR Kit von Qiagen.

Als Real-Time PCR Gerät kam der LightCycler® von Roche Diagnostics zum Einsatz, da dieses Gerät aufgrund seiner Konstruktionseigenschaften eine besonders kurze Probenlaufzeit ermöglicht, was gerade in der klinischen Massendiagnostik besondere Vorteile bietet.

### Lokalisation von Primern und Sonde: Simultaner Nachweis von BVDV-1, BVDV-2, KSPV und BDV

Zum Nachweis des BVDV in der Real-Time PCR wurde ein Abschnitt der bei Pestiviren hoch konservier-

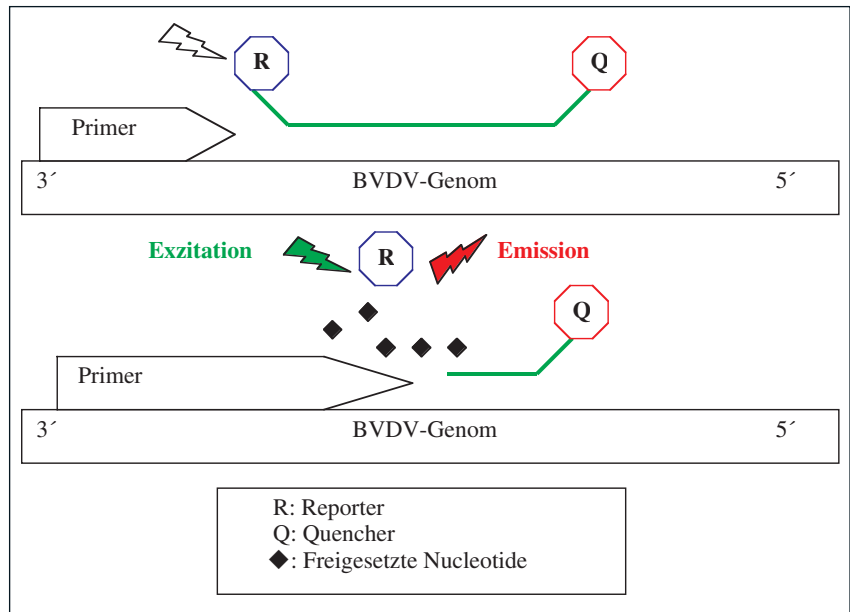


Abb. 6: Prinzip der TaqMan® Sonde

ten 5'Untranslated Region (5'UTR) gewählt. Die Auswahl der Primer bzw. TaqMan® Sonde erlaubt den Nachweis aller Vertreter des Genus Pestivirus bei Haustieren. So ist mit diesem Verfahren der gleichzeitige Nachweis von BVDV-1, BVDV-2, KSPV sowie BDV möglich. Die Spezifität der Methode wurde anhand verschiedener internationaler Pesti-

virus-Referenzstämme sowie einer Reihe österreichischer Feldvirusstämme überprüft.

Bei TaqMan® Sonden handelt es sich um sogenannte „dual labeled probes“, die am 5'Ende mit einem „fluorescent reporter“ Farbstoff, bei unserer Methode mit 6-FAM, gekoppelt sind, während sich am 3'Ende der Sonde als sogenannter „quen-

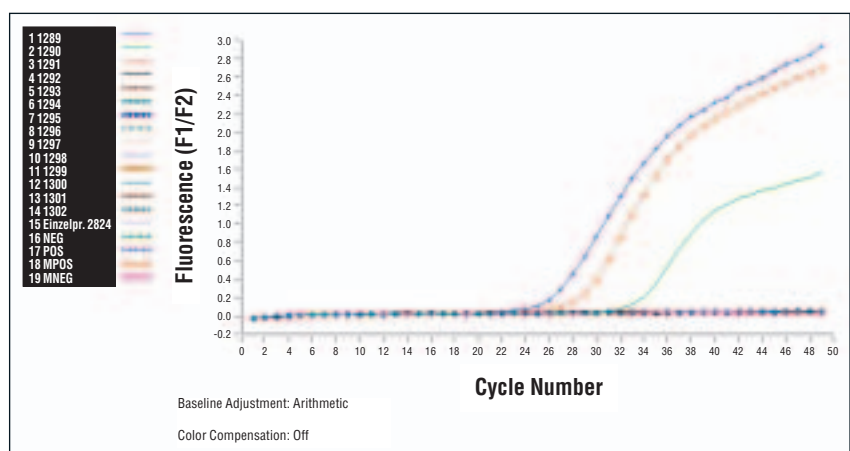


Abb. 7: Auswertung einer BVDV Real-Time PCR am LightCycler® mit 19 Proben; Nr. 2 = positiver Pool; Nr. 17, 18 = Positivkontrollen; restliche Proben bzw. Negativkontrolle zeigen keinen Anstieg und werden somit negativ beurteilt

| Bezirk         | Anzahl der Betriebe | Anzahl der Tiere | BVDV-pos. Tiere (%) | BVDV-pos. Bestände (%) |
|----------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------------|
| Innsbruck      | 57                  | 320              | 0                   | 0                      |
| Innsbruck-Land | 1518                | 7729             | 15                  | 12                     |
| Imst           | 945                 | 3611             | 12                  | 11                     |
| Kitzbüchel     | 1223                | 7500             | 15                  | 10                     |
| Kufstein       | 1366                | 8346             | 24                  | 17                     |
| Landeck        | 1060                | 2825             | 10                  | 9                      |
| Lienz          | 1356                | 6894             | 6                   | 6                      |
| Reutte         | 391                 | 1455             | 1                   | 1                      |
| Schwaz         | 1103                | 6768             | 8                   | 6                      |
| <b>Summe</b>   | <b>9019</b>         | <b>45.448</b>    | <b>91 (0.2%)</b>    | <b>72 (0.8%)</b>       |

Tab. 2. BVDV-Ergebnisse im Untersuchungszeitraum März–April 2004

cher“ der Farbstoff TAMRA befindet (Abb. 6).

Während der Extensionsphase der PCR bewirkt die 5'–3' Exonuclease-Aktivität der DNA-Polymerase eine Ablösung des „fluorescent reporters“, was ein meßbares Fluoreszenzsignal auslöst, das sich proportional zur Menge der angesammelten PCR-Produkte verhält und somit auch eine quantitative Aussage zur Viruskonzentration im Probenmaterial zuläßt (Abb. 7).

### Antigen-ELISA

Im Falle eines positiven PCR-Ergebnisses wurden die am AGES-Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Innsbruck verbliebenen Einzelproben des betreffenden Pools mittel Chekit III ERNS-ELISA (Fa. Bommeli) auf BVDV untersucht.

Zum Ausschluß transient infizierter Tiere erfolgte eine Nachuntersuchung der ELISA-positiven Reagenten nach 4–6 Wochen. Bei Bestätigung der positiven Erstuntersuchung wurden diese Tiere aus dem Bestand entfernt und der Schlachtung zugeführt.

### Qualitätsmanagement

Alle Stufen der Laboruntersuchung an beiden beteiligten Laboratorien entsprachen der Akkreditierungsnorm EN/ISO 17.025.

### Ergebnisse

Von den insgesamt 2260 untersuchten Pools waren 64 in der Real-Time PCR positiv, dies entspricht einem Anteil von 2,8%. In diesen Pools konnten mittels ELISA 91 BVDV-positive Tiere aus insgesamt 72 Beständen ermittelt werden (siehe Tab. 2).

Da es sich hierbei um die Ergebnisse der Erstuntersuchung handelt und die Nachuntersuchung zum Ausschluß transient-infizierter Tiere zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch aussteht, dürfte der tatsächliche Anteil an PI-Tieren im Jahr 2004 unter 0,2% liegen.

### Schlußfolgerung

Die Entwicklung und Etablierung eines am Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Linz nach EN/ISO 17.025 akkreditierten Real-Time PCR Verfahrens zum Nachweis von BVDV eröffnet eine völlig neue Perspektive zur Eradikation ei-

ner der wirtschaftlich bedeutendsten Infektionserkrankungen bei Rindern. Die im Vergleich zu den gängigen Laborverfahren höhere Sensitivität in Verbindung mit einer 100%igen Spezifität ermöglicht überdies die Untersuchung von bis zu 40 Tieren als gepoolte Proben, wodurch einerseits die Laborkosten deutlich reduziert werden konnten und andererseits ein höherer Probandendurchsatz ermöglicht wird. So konnten in einem Zeitraum von zwei Monaten 45.448 Rinder erfolgreich auf BVDV untersucht werden.

*Dr. M. Dünser, Fachtierarzt für Klinische Laboratoriumsdiagnostik, Dr. H. Schweighardt, Fachtierarzt für Klinische Laboratoriumsdiagnostik, Michaela Altmann, M. Biebl, Cornelia Einfinger und Ing. A. Zollner, Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Linz, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH.*

*Dr. K. Schöpf, Fachtierarzt für Klinische Laboratoriumsdiagnostik, Andrea Brandstätter und Anita Wunder, Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Innsbruck, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH.*

*Literatur beim Verfasser*

*Der Landesveterinärdirektion des Landes Tirol (Landesveterinärdirektor HR Dr. E. Wallnöfer) sei für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen gedankt.*

*Bei Herrn Dr. W. Gaede vom Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt möchten wir uns für die Unterstützung bei der Methodenetablierung herzlich bedanken.*