

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. E. Märklbauer

**Entwicklung und Prüfung von Verfahren zum Nachweis
des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe
in getrockneten Ohrgewebeproben
mittels Antigen-ELISA und *real time* RT-PCR**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Robert Günther Fux
aus
München

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Prof. Dr. Märtlbauer
Korreferent: Prof. Dr. Klee

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

meinen Eltern

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Infektionen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe Pathogenese und klinische Bilder	2
2.1.1	Postnatale Infektionen	2
2.1.2	Intrauterine Infektionen	4
2.1.3	Persistent infizierte Tiere (PI Tiere)	7
2.2	Taxonomie, Aufbau und für den Virusnachweis bedeutsame Strukturen des BVDV	9
2.2.1	Taxonomische Stellung des BVDV	9
2.2.2	Aufbau des BVDV	10
2.2.3	Für den BVDV-Nachweis bedeutsame Virusstrukturen	12
	RNA der 5'-untranslated region (5'UTR)	12
	Hüllprotein E ^{ms}	13
	Nichtstrukturprotein 2/3 (NS2/3)	14
2.3	Methoden zum BVDV-Nachweis	16
2.3.1	Virusisolierung in der Zellkultur	16
2.3.2	Antigennachweis	18
	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (FACS)	18
	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	19
	Immunhistochemische Untersuchungen (IHC)	20
2.3.3	<i>RT-Polymerase chain reaction</i> (RT-PCR)	22
3.	Material und Methoden	24
3.1	Spendertiere für Gewebe- und Blutproben	24
3.1.1	PI Tiere ohne nachweisbare kolostrale BVDV-Antikörper	24
3.1.2	PI Tiere mit kolostralen BVDV-Antikörpern	25
3.1.3	BVDV-freie Tiere	26
3.2	Herstellung des Probenmaterials	27
3.2.1	Herstellung von Leukozytenpellets	27
3.2.2	Herstellung von trockenkonservierten Ohrgewebeproben	27

3.3	Belastungsfaktoren	28
3.3.1	Kolostrale Antikörper	28
3.3.2	Lagerungstemperaturen	29
3.3.3	Bakterielle Kontaminationen	29
3.3.4	Kontaminationen mit Rinderkot	30
3.4	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	31
3.4.1	Solubilisierung der Antigene	31
3.4.2	Verwendete ELISAs	32
3.4.3	Durchführung der ELISAs	33
3.4.4	Auswertung	33
3.5	<i>Real time RT-Polymerase chain reaction (real time RT-PCR)</i>	34
3.5.1	Freisetzung der BVDV-RNA	34
	Enzymatischer Verdau mit Hilfe von Proteinase K	34
	Mechanische Freisetzung mit Hilfe einer Laborschwingmühle	34
3.5.2	Isolierung der BVDV-RNA	35
3.5.3	Verwendete PCR-Systeme und Durchführung der PCR	36
	„Pesti“-PCR	36
	„Panpesti-System 1.1“	36
3.5.4	Pooluntersuchungen	38
3.5.5	Auswertung	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	39
4.1.1	Solubilisierung der BVDV-Antigene mittels Detergentien	39
	Kompatibilität verschiedener Detergentien mit dem AG-Nachweis im ELISA	39
	Potential ausgewählter Detergentien zur AG-Freisetzung aus Ohrstanzproben	42
4.1.2	Varianzen und Sensitivität beim AG-Nachweis mittels ELISA	44
4.1.3	Einfluss probenintrinsic BVDV-Antikörper	47
	Auswirkungen zugesetzter kolostraler Antikörper auf den AG-Nachweis	47
	AG-Nachweis in Ohrstanzproben verschiedener Kälber in der kolostralen Phase	51

4.1.4	Auswirkungen ausgewählter Umwelteinflüsse auf den AG-Nachweis im ELISA	56
	Einfluss verschiedener Temperaturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzen auf den AG-Nachweis	56
	Einfluss bakterieller Kontamination frischer Ohrstanzen auf den AG-Nachweis	58
4.2	<i>Real time</i> RT-PCR	60
4.2.1	Freisetzung und Isolierung der BVDV-RNA aus Ohrgewebeproben	60
	Freisetzung der RNA durch enzymatischen Verdau bzw. mechanische Bearbeitung	60
	Vergleich verschiedener kommerzieller Kits für die RNA-Aufreinigung nach mechanischer Probenbearbeitung	61
4.2.2	Vergleich der Sensitivität unterschiedlicher <i>real time</i> RT-PCR-Assays	63
4.2.3	Einfluss kolostraler Antikörper und verschiedener Umweltfaktoren auf den BVDV-Nachweis in Ohrgewebeproben mittels <i>real time</i> RT-PCR	64
	RNA-Nachweis in Ohrstanzen verschiedener Kälber in der kolostralen Phase	64
	Einfluss verschiedener Temperaturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzen auf den RNA-Nachweis	66
	Einfluss bakterieller Kontaminationen frisch gewonnener Ohrstanzen auf den RNA-Nachweis	67
	Inhibitorischer Effekt von Kotkontaminationen auf den RNA-Nachweis	68
4.2.4	Potential des etablierten <i>real time</i> RT-PCR-Verfahrens für die Untersuchung von Ohrstanzen als Poolproben	70
	Nachweis von BVDV-RNA in gepoolten Proben	70
	Stabilität der BVDV-RNA im Gewebehomogenat aus der Laborschwingmühle	71
5.	Diskussion	72
5.1	Freisetzung der nachzuweisenden BVDV-Strukturen aus den trockenkonservierten Ohrstanzproben	72
5.1.1	Solubilisierung der Antigene mittels Detergentien	72
5.1.2	Freisetzung und Isolierung der RNA	74
5.2	Sensitivität und Varianzen	75
5.2.1	Sensitivität und Varianzen beim AG-Nachweis	75
5.2.2	Sensitivität und Varianzen beim RNA-Nachweis	76

5.3	Einfluss kolostraler Antikörper auf die Nachweisbarkeit des BVDV in Ohrstanzproben	77
5.3.1	Einfluss kolostraler Antikörper auf den AG-Nachweis	77
5.3.2	Einfluss kolostraler Antikörper auf den RNA-Nachweis	80
5.4	Einfluss ausgewählter Umweltfaktoren auf die Qualität der Ohrstanzen	81
5.4.1	Auswirkungen ausgewählter Umwelteinflüsse auf den AG-Nachweis	81
5.4.2	Auswirkungen ausgewählter Umwelteinflüsse auf den RNA-Nachweis	82
5.5	Eignung für die Massendiagnostik	84
5.6	Schlussfolgerungen	85
6.	Zusammenfassung/Summary	86
7.	Literatur	88
8.	Anhang	115
8.1	Materialliste	115
8.1.1	Geräte und Laborhilfsmittel	115
8.1.2	Kommerzielle Kits	116
8.1.3	Chemikalien, Enzyme und Lösungen	117
8.2	Verwendete Abkürzungen	118

1. Einleitung

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) ist weltweit einer der ökonomisch bedeutendsten Krankheitserreger der Rinder. Infektionen mit dem BVDV können eine große Vielfalt an klinischen Folgen, wie Störungen der Fruchtbarkeit, Aborte, missgebildete und lebensschwache Nachkommen sowie gastrointestinale und respiratorische Schleimhauterkrankungen wie die Bovine Virusdiarrhoe und die letal endende *Mucosal Disease* nach sich ziehen.

Für die Verbreitung des BVDV in der Rinderpopulation sind dabei in erster Linie persistent infizierte Tiere verantwortlich, die aus einer intrauterinen Infektion während des ersten Trächtigkeitsdrittels hervorgehen. Diese lebenslangen Virämiker scheiden das Virus in großen Mengen mit allen Se- und Exkreten aus und stellen das wichtigste Erregerreservoir dar. Die Ausrottung des BVDV aus den Nutztierbeständen kann daher nur durch die frühzeitige Detektion und die anschließende Elimination der persistent infizierten Tiere aus den Rinderbeständen erfolgen. Trotz weltweiter Anstrengungen wurde jedoch bisher in keiner Region eine erfolgreiche BVDV-Tilgung abgeschlossen. Ursächlich dafür sind im Wesentlichen zwei Punkte. Zum einen basiert die Suche nach BVDV-positiven Tieren in den meisten Kontrollprogrammen auf serologischen Methoden, welche auf Bestandsebene durchgeführt werden (Jungtierfenster, Tankmilch). Die Identifizierung des infizierten Einzeltieres erfolgt erst im Anschluss durch den BVDV-Nachweis. Durch dieses Vorgehen können beträchtliche Zeitspannen zwischen Auftreten und Nachweis neuer BVDV-Infektionen vergehen („Diagnostische Trägheit“). Durch Transport und Handel von virämischen Tieren kommt es in dieser Zeit zu einer weiteren Verbreitung des Erregers. Zum anderen stellt die Diagnostik junger Kälber ein Problem dar. Durch die Aufnahme großer Mengen maternaler Antikörper mit dem Kolostrum kann das Virus im persistent infizierten Kalb soweit verdrängt oder verdeckt werden, dass es mit den meisten etablierten Nachweismethoden nicht erkannt wird („Diagnostische Lücke“).

In dieser Arbeit sollte ein Nachweisverfahren für eine sichere und frühzeitige Erkennung persistent BVDV-infizierter Kälber jeden Alters etabliert und auf seine analytische Sensitivität überprüft werden. Zudem sollte dieses Verfahren für die Massendiagnostik geeignet sein. Grundlage dafür war die BVDV-Detektion mittels Antigen-ELISA bzw. *real time* RT-PCR in trockenkonservierten Ohrstanzproben, die im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen Tiermarkierung leicht und sicher gewonnen werden könnten. Zusätzlich wurde der Einfluss kolostraler Antikörper und ausgewählter Umweltfaktoren auf die BVDV-Nachweisbarkeit in Ohrgewebsproben untersucht.

2. Schrifttum

2.1 Infektionen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe

Pathogenese und klinische Bilder

Infektionen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) können bei Rindern sehr unterschiedliche Folgen haben. Diese Vielfalt beruht auf der vielschichtigen Pathogenese, die hinter dem Komplex der Bovinen Virusdiarrhoe/*Mucosal Disease* (BVD/MD) steht. Welche Ausprägung eine BVDV-Infektion dabei annimmt, hängt zum einen vom Virus (z. B. Genotyp, Biotyp und Virulenz) und zum anderen vom Wirtstier (z. B. Immunkompetenz bzw. Immuntoleranz, Trächtigkeitsstadium, Kolostrumaufnahme, Sekundärerreger und Umwelteinflüsse) ab.

2.1.1 Postnatale Infektionen

BVDV-Infektionen immunkompetenter, seronegativer Rinder erfolgen meist nach direktem oder indirektem Kontakt mit virusausscheidenden Rindern (Bolin, 1995; Houe, 1995; Lindberg und Houe, 2005; Niskanen und Lindberg, 2003). Vor allem persistent BVDV infizierte Tiere (PI Tiere, vgl. 2.1.3) scheiden das Virus lebenslang in großen Mengen mit allen Se- und Exkreten aus und repräsentieren somit den wichtigsten Vektor für die Verbreitung des Erregers (Brock *et al.*, 1991; Brock, 2003; Coria und McClurkin, 1978; Houe, 1995; Houe, 1999). Auch akut infizierte Rinder stellen eine potentielle Infektionsquelle dar, doch ist die Virusausscheidung bei diesen Tieren zeitlich und mengenmäßig stark begrenzt, so dass die Erregertransmission, verglichen mit PI Tieren, deutlich weniger effizient ist (Bolin, 1995; Brownlie *et al.*, 1987; Houe, 1995; Meyling *et al.*, 1990; Meyling und Jensen, 1988).

Nach der Virusadsorption dürfte die primäre Virusvermehrung (venerische und iatrogene Infektionen ausgenommen) meist in der oronasalen Schleimhaut und dem lokalen Lymphgewebe erfolgen (Bolin und Ridpath, 1990). Im Zusammenhang mit der anschließenden Virämie kommt es zur systemischen Verbreitung und einer Virusvermehrung in verschiedenen Organsystemen. Während dieses Zeitraums lässt sich das BVDV in der Regel vom dritten bis zehnten Tag aus Blut und Nasensekret isolieren (Brownlie, 1990b). Die einsetzende Immunantwort führt schließlich zur Elimination des Erregers und zur Ausbildung einer lang anhaltenden Immunität und zur Serokonversion (Brownlie, 1990b; Harkness *et al.*, 1978).

Der Großteil der transienten BVDV-Infektionen verläuft subklinisch (Ames, 1986; Baker, 1995). Lediglich ein milder Anstieg der Körpertemperatur und eine Leukopenie über wenige Tage können nachgewiesen werden. Weiterhin wurden subklinische Infektionen mit einem Rückgang der Milchleistung in Milchviehbeständen in Verbindung gebracht (Moerman *et al.*, 1994). Die hohe Prävalenz seropositiver Rinder lässt sich vorwiegend auf diese inapparenten Infektionen zurückführen (Baker, 1995; Harkness *et al.*, 1978).

In Abhängigkeit von Virusstamm, Immunstatus des Wirtes und verschiedenen Umweltfaktoren kann eine BVDV-Infektion auch zum Krankheitsbild der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) führen. Diese kommt bei Rindern jeden Alters, bevorzugt aber bei sechs bis zwölf Monate alten Tieren vor (Baker, 1995). Nach einer Inkubation von fünf bis sieben Tagen zeigt sich transientes Fieber, welches mit einer deutlichen Leukopenie einhergeht (Duffell und Harkness, 1985). Das klinische Bild ist weiterhin durch allgemeine Schwäche, Anorexie, Diarrhoe und Erosionen an Maulschleimhaut, Flotzmaul und im Zwischenzehenspalt geprägt. Bei laktierenden Rindern kommt es zum deutlichen Abfall der Milchleistung (Baker, 1995). In vielen Fällen führt die Infektion außerdem zu einer sekundären Immunsuppression im Tier, so dass dessen Anfälligkeit für Sekundärerreger steigt (Potgieter, 1995). Dieser Pathomechanismus wird auch bei der Beteiligung des BVDV an Faktorenkrankheiten, wie der Enzootischen Bronchopneumonie diskutiert (Baker, 1987; Callan und Garry, 2002; Potgieter, 1995; Radostits und Townsend, 1989; Reggiardo, 1979). Im Allgemeinen ist die BVD mit einer geringen Mortalität verbunden. Doch sind auch Krankheitsausbrüche mit einer Morbidität bis 40% beschrieben, bei denen nach schwerem Krankheitsverlauf Mortalitäten zwischen 10% und 25% auftraten (Baker, 1995; Carman *et al.*, 1998; Hibberd *et al.*, 1993).

Unter dem Begriff des „Hämorrhagischen Syndroms“ wurde eine akute, mit hoher Todesrate einhergehende Verlaufsform bei Mastkälbern und adulten Rindern in Nordamerika beschrieben. Hierbei kam es neben den klassischen Symptomen zu einer hochgradigen Thrombozytopenie, was zu teilweise massiven Blutungen in den Schleimhäuten und den Augen, Epistaxis und blutiger Diarrhoe führte (Corapi *et al.*, 1990b; Liebler *et al.*, 1995; Rebhun *et al.*, 1989). Diese hämorrhagische Verlaufsform wurde anfänglich vor allem mit Genotyp-II-Stämmen in Verbindung gebracht (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). Bei späteren Ausbrüchen und vergleichenden Untersuchungen konnte allerdings keine Korrelation zwischen Genotyp und Virulenz nachgewiesen werden (Brownlie *et al.*, 1998; Carman *et al.*, 1998; David *et al.*, 1994; Hibberd *et al.*, 1993; Wolfmeyer *et al.*, 1997).

2.1.2 Intrauterine Infektionen

Vom ökonomischen Standpunkt betrachtet, ziehen Infektionen um den Konzeptionszeitpunkt und während der Gravidität die schwersten Folgen nach sich. Durch das BVDV treten vielfältige Störungen im Reproduktionsgeschehen auf, wobei vor allem der Zeitpunkt der Infektion über deren Ausprägung entscheidet.

Bereits in der frühen Phase des Reproduktionszyklus haben BVDV-Infektionen weit reichende Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit. Dies kann entweder durch eine negative Beeinflussung des Milieus in Eileiter und Uterus oder durch direkte Schäden am Embryo selbst begründet sein (Grooms, 2004). Ursächlich für Ersteres dürfte unter anderem der Tropismus des BVDV für verschiedene Gewebe und Zellarten des weiblichen Geschlechtsapparates sein (Grooms *et al.*, 1998). Zudem konnten interstitielle Entzündungen der Ovarien (Ssentongo *et al.*, 1980) und der Eileiter (Archbald *et al.*, 1973), sowie ein reduziertes Follikelwachstum in den Eierstöcken (Fray *et al.*, 1999; Grooms *et al.*, 1998) in Zusammenhang mit dem Virusnachweis gezeigt werden. Zudem könnte eine gestörte Hormonausschüttung der Ovarien, neben den pathologisch-anatomischen Veränderungen Ursache für Unfruchtbarkeiten sein (Fray *et al.*, 1999; Fray *et al.*, 2000; Fray *et al.*, 2002). Von einigen Autoren werden direkte Schäden an embryonalen Zellen als zweite Komponente angesehen, mit der sich der frühe embryonale Tod nach einer BVDV-Infektion erklären lässt (Brownlie *et al.*, 1998; Carlsson *et al.*, 1989; Grooms, 2004; Moennig und Liess, 1995). Pathogenetische Unterschiede zu Infektionen, die zur Immuntoleranz führen (vgl. unten), werden dabei jedoch nicht aufgezeigt. In der frühen Phase der Trächtigkeit wird der abgestorbene Embryo resorbiert, was sich im Tierbestand durch „Umrindern“ und schlechte Konzeptionsraten äußert (McGowan *et al.*, 1993; Virakul *et al.*, 1988).

Erfolgt die Infektion zu einem späteren Trächtigkeitszeitpunkt, ist vor allem der Entwicklungsstand des fetalen Immunsystems ausschlaggebend für die Folgen. Bereits bei der Erstbeschreibung der BVD im Jahre 1946 wurde die Krankheit im Zusammenhang mit Aborten beschrieben (Olafson *et al.*, 1946). Diese treten vor allem im ersten, aber auch im zweiten Trimester der Trächtigkeit auf (Brownlie *et al.*, 1998; Liebler-Tenorio, 2005; Thierauf, 1993). Der Tod des Fetus erfolgt dabei in der Regel 10 bis 27 Tage nach der Infektion (Grooms, 2004). Als Ursache werden direkte Schäden an der Frucht und Läsionen an der Plazenta diskutiert (Brownlie *et al.*, 1998; Grooms, 2004). Die Ausstoßung des Fetus kann jedoch erst Wochen oder Monate nach dessen Tod erfolgen (Baker, 1995; Murray, 1991), wobei auch mumifizierte Früchte beobachtet wurden (Done *et al.*, 1980; Scott *et al.*, 1973).

Transplazentare Infektionen vor dem 100. Trächtigkeitstag, seltener bis zum 125. Tag, können zur Immuntoleranz gegenüber diesem BVDV führen (Coria und McClurkin, 1978; Grooms, 2004; McClurkin *et al.*, 1984; Moennig und Liess, 1995). Zu diesem Zeitpunkt ist die fetale Immunkompetenz noch nicht vollständig entwickelt, so dass virale Proteine als „körpereigen“ geduldet werden können. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer B- und T-lymphozytären Immuntoleranz (Grooms, 2004; Potgieter, 1995). Das BVDV persistiert somit lebenslang im betroffenen Tier, welches das Virus nicht eliminieren kann. Hierdurch lässt sich das Fehlen von BVDV-spezifischen Antikörpern erklären (Donis und Dubovi, 1987c). Dies bezieht sich jedoch nur auf den homologen Virusstamm, der die Immuntoleranz induzierte. Gegen heterologe, antigenetisch unterschiedliche BVD-Viren kann eine spezifische Immunität ausgebildet werden. Persistent BVDV infizierte Tiere (PI Tiere) werden in der Regel gesund geboren und weisen meist keine klinischen Auffälligkeiten auf. Erreichen weibliche PI Tiere die Geschlechtsreife, gebären sie stets immuntolerante Kälber (Baker, 1995; Liess, 1985; McClurkin *et al.*, 1979). Die weiteren Verlaufsformen der persistenten Infektion sind in Kapitel 2.1.3 dargestellt.

Fetale Infektionen im zweiten Trächtigkeitsdrittel, vor allem zwischen Tag 100 und 150 der Gestation, können zu kongenitalen Missbildungen führen (Duffell und Harkness, 1985). In diesem Entwicklungsstadium fallen die letzten Phasen der Organogenese und der Ausbildung des fetalen Immunsystems zusammen, was für die Entwicklungsstörungen ursächlich sein könnte. Noch ist unklar, ob die Defekte durch entzündliche Reaktionen oder direkte virale Einwirkung (z. B. inhibiertes Zellwachstum, gestörte Zelldifferenzierung oder Zelltod) entstehen (Brownlie *et al.*, 1998; Castrucci *et al.*, 1990; Grooms, 2004). Am häufigsten finden sich Schäden, die das Zentrale Nervensystem betreffen (Grooms, 2004). Unter anderem wurden Fälle von zerebellarer Hypoplasie, Hydrocephalus oder Hypomyelogenese beschrieben (Baker, 1995; Bielefeldt-Ohmann, 1995; Grooms, 2004). Zudem wurde beobachtet, dass das Ausmaß der Kleinhirnschäden mit dem Alter der Frucht zunimmt (Brown *et al.*, 1973). Des Weiteren konnten Augendefekte (z. B. Katarakt, Mikrophthalmus und Retinadegeneration), Hypotrichose bzw. Alopezie, Thymusatrophie und Skelettdeformationen (z. B. Brachygnathie, Schädeldeformationen und Mikromelie) nach fetalen BVDV-Infektionen beobachtet werden (Baker, 1995; Grooms, 2004). Oft sind solche Tiere nach der Geburt in Abhängigkeit von Art und Schwere der Missbildung nicht länger lebensfähig und müssen euthanasiert werden.

Der Großteil der nach dem 125. Gestationstag infizierten Feten bildet jedoch eine aktive Immunität gegen das BVDV aus. Das Virus wird eliminiert und das Kalb wird gesund mit präkolostralen neutralisierenden Antikörpern geboren (Grooms, 2004). Ob solche späten Infektionen Auswirkungen auf das Wachstum oder den späteren Gesundheitsstatus einzelner Tiere haben, bleibt zu klären (Grooms, 2004; Munoz-Zanzi *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 1969).

2.1.3 Persistent infizierte Tiere (PI Tiere)

PI Tiere (vgl. 2.1.2) scheiden das nzp BVDV lebenslang in großen Mengen mit allen Se- und Exkreten aus und stellen somit das wichtigste Virusreservoir dar. Einige der immuntoleranten Kälber werden lebensschwach geboren oder zeigen ein verlangsamtes Wachstum („Kümmerer“). Häufig sind PI Kälber jedoch klinisch unauffällig, gelangen in den Handel und repräsentieren somit die wichtigste Transmissionsquelle des BVDV (Coria und McClurkin, 1978; Liess, 1985; McClurkin *et al.*, 1984; Potgieter, 1995; Sandvik, 2005).

Eine persistierende Infektion ist Voraussetzung für die Entstehung der *Mucosal Disease* (MD) (Brownlie, 1991; Liess *et al.*, 1974). Dieser stets tödlich endenden und in verschiedenen Formen auftretenden Krankheit liegt eine komplexe Pathogenese zugrunde. Der Ausbruch der MD erfolgt nach einer Superinfektion von PI Tieren mit einem zytopathogenen (zp) BVD-Virus (Bolin *et al.*, 1985; Brownlie *et al.*, 1984). Dieses kann entweder von einem anderen an MD erkrankten Tier übertragen werden (Baker, 1995; Torgerson *et al.*, 1989) oder durch Mutation im PI Tier (z. B. Insertionen zellulärer RNA, Deletionen, Duplikationen, Punktmutationen oder Rekombinationen, vgl. 2.3.3) entstehen. Dabei ist die antigenetische Verwandtschaft vom persistierenden nzp Virus zum superinfizierenden zp Stamm entscheidend.

Bei identischen oder sehr ähnlichen Antigenen der beiden Biotypen (homologes Viruspaar) erstreckt sich die Immuntoleranz des PI Tieres auch auf das zp Virus (Brownlie, 1990a). Dies führt zum Krankheitsbild der akuten MD, welche oft im Alter von sechs Monaten bis zwei Jahren auftritt. In betroffenen Betrieben erkrankt dabei meist eine Alterskohorte. Charakteristische Symptome sind Fieber, allgemeine Schwäche, Anorexie, Tachykardie und Tachypnoe sowie wässrige, teilweise blutige Durchfälle und in deren Folge Dehydratation und Azidose. Häufig sind Läsionen der Maulschleimhäute und des Flotzmauls zu finden, seltener an Vulva, Präputium und Zitzen. Erosionen und Entzündungen im Interdigitalspalt und am Kronsaum können zu Lahmheiten führen (Baker, 1995; Braun *et al.*, 1996). Die akute MD tritt oft betriebsweise gehäuft auf und führt binnen Tagen oder weniger Wochen zum Tod bzw. zur Euthanasie der betroffenen Tiere. Bestehen hingegen zwischen nzp und zp Virusstamm deutliche antigenetische Unterschiede (heterologes Viruspaar) kann auch das PI Tier mit der Bildung neutralisierender Antikörper reagieren und den zp Biotyp eliminieren, ohne dass es zu einer Erkrankung kommt (Bolin, 1988; Bolin, 1995; Brownlie und Clarke, 1993). Neben diesen beiden Extremen, Tod durch akute MD und Eliminierung des zp Virus durch das Immunsystem, gibt es noch verschiedene Zwischenformen, die einer Superinfektion eines PI Tieres folgen können.

Experimentelle Infektionen von immuntoleranten Tieren mit heterologen zp BVDV führten zur Antikörperbildung, ohne dass klinische Auffälligkeiten zu beobachten waren. Nach mehreren Monaten erkrankten diese Tiere jedoch unter den typischen Symptomen der MD, wobei aus dem Gewebe ein zp Biotyp zu isolieren war (Bolin, 1995; Brownlie und Clarke, 1993). Nach heutigem Verständnis dürfte diese *late onset* MD auf eine Rekombination vom persistierenden nzp Virus mit dem heterologen zp Stamm zurückzuführen sein, wodurch eine zp Viruschimäre entsteht, die sich aufgrund der ihr entgegen gebrachten Immuntoleranz ungehindert vermehren kann und zum Krankheitsausbruch führt (Becher *et al.*, 2001; Fritzscheier *et al.*, 1995; Fritzscheier *et al.*, 1997; Ridpath und Bolin, 1995).

Einen weiteren vom typischen Bild der akuten MD abweichenden Krankheitsverlauf findet man bei der chronischen MD. Wie bei der akuten Form lassen sich sowohl ein nzp als auch ein zp Virus nachweisen. Die betroffenen Tiere sterben jedoch nicht innerhalb kurzer Zeit, sondern leiden an einem chronischen Krankheitsprozess, der sich über mehrere Monate erstrecken kann (Baker, 1995; Brownlie, 1991). Die chronische MD ist charakterisiert durch Inappetenz, Abmagerung, kontinuierliche oder intermittierende Durchfälle, Nasen- und Augenausfluss. Des Weiteren sind erosive Läsionen an den Maulschleimhäuten und der Haut, sowie Alopezie und Hyperkeratose zu finden. Auftretende Lahmheiten beruhen auf Laminitis, Nekrosen des Interdigitalspalts oder Klauendeformationen. Erkrankte Tiere können bis zu 18 Monate überleben, sterben aber früher oder später an allgemeiner Entkräftung (Baker, 1995). Die genauen pathogenetischen Hintergründe und Unterschiede zur akuten Form sind noch unzureichend beschrieben. Vor allem die Rolle des Viruspaars und ihre antigenetische Verwandtschaft bedürfen weiterer Aufklärung.

2.2 Taxonomie, Aufbau und für den Virusnachweis bedeutsame Strukturen des BVDV

2.2.1 Taxonomische Stellung des BVDV

Das BVDV, mit seinen beiden Genotypen I und II, bildet nach dem letzten Bericht des *International Committee on Taxonomy of Viruses* zusammen mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus*, CSFV) und dem Border Disease Virus (BDV) das Genus *Pestivirus* (van Regenmortel *et al.*, 2000). Dieses und die beiden Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus* stellen die Mitglieder der Familie *Flaviviridae* dar. Es handelt sich hierbei um relativ kleine, behüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom von positiver Polarität und einem offenen Leserahmen (*open reading frame*) (Collet, 1988b; Donis, 1995). Die Namensgebung und die Einteilung einzelner Pestivirus-Isolate erfolgte ursprünglich anhand des Wirtsspektrums und serologischer Untersuchungen mittels mono- und polyklonaler Antikörper (Bolin *et al.*, 1988; Corapi *et al.*, 1990a; Edwards *et al.*, 1988; Edwards und Paton, 1995; Paton *et al.*, 1995). Pestiviren sind jedoch nicht streng wirtsspezifisch. Neben Haustieren wie Rind, Schaf und Schwein sind auch verschiedene Wildwiederkäuer wie z. B. Reh, Hirsch, Büffel, Bison, Alpaka, Rentier, Gämse, Maushirsch oder Giraffe für Pestivirus-Infektionen empfänglich (Arnal *et al.*, 2004; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 1999; Doyle und Heuschele, 1983; Goyal *et al.*, 2002; Utenthal *et al.*, 2005; Vilcek *et al.*, 2005b). Heute beruht die Gliederung der Pestiviren in Genotypen und deren Subgruppen in erster Linie auf der Sequenzanalyse bestimmter Genomabschnitte, vor allem der 5'UTR, dem N^{pro} und dem E2 (Becher *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1999; Becher *et al.*, 2003; Harasawa, 1996; Ridpath *et al.*, 1994; Van Rijn *et al.*, 1997; Vilcek *et al.*, 1997; Vilcek *et al.*, 2001; Vilcek *et al.*, 2005b). Aufgrund der Aufschlüsselung immer neuer Isolate wird die Einteilung der Pestiviren laufend angepasst. Derzeit werden für den Genotyp BVDV-I zwölf Subgruppen beschrieben (Vilcek *et al.*, 2004; Vilcek *et al.*, 2005a), während das BVDV-II uneinheitlich in zwei oder drei genetische Gruppen unterteilt wird (Becher *et al.*, 1999; Beer *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2002; Vilcek *et al.*, 2005a). Für das BDV wurden bisher vier mögliche Genotypen beschrieben (Arnal *et al.*, 2004; Becher *et al.*, 2003). Das CSFV wurde in zwei Subgruppen unterteilt (Becher *et al.*, 1999). Neben diesen sieben Genotypen existieren weitere „exotische“ Isolate (Giraffen- bzw. Gabelbock-Isolat), die in keinem näheren Verwandtschaftsverhältnis zu den etablierten Gruppen stehen und daher potentielle neue Genotypen darstellen (Avalos-Ramirez *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1999; Becher *et al.*, 2003; Vilcek *et al.*, 2005b).

2.2.2 Aufbau des BVDV

Das BVDV ist ein relativ kleines, behülltes RNA-Virus. Unter dem Elektronenmikroskop stellen sich die Virionen als pleomorphe, sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 40 bis 60nm dar (Bielefeldt Ohmann und Bloch, 1982; Gray und Nettleton, 1987; Ward und Kaeberle, 1984). Das Nukleokapsid hat einen Durchmesser von 20 bis 25nm (Bielefeldt Ohmann, 1990). Die Hülle des Virus besteht aus einer Lipidmembran und drei glykolisierten Hüllproteinen (Collett *et al.*, 1989; Donis, 1995; Thiel *et al.*, 1991) und zeigt auf seiner Oberfläche ringartige Strukturen mit einem Durchmesser von 10 bis 12nm (van Regenmortel *et al.*, 2000). Das BVDV besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom von positiver Polarität. Dieses hat eine durchschnittliche Länge von zirka 12,5kb und kodiert in einem großen *open reading frame* (ORF) die Information für etwa 4000 Aminosäuren (Collett *et al.*, 1988a; Collett *et al.*, 1988b; Collett *et al.*, 1991; Deng und Brock, 1992). Eine Kopfgruppe (5'-*cap*) oder ein Poly-A-Schwanz am 3'-Ende fehlen (Brock *et al.*, 1992; Collett *et al.*, 1988b; Donis, 1995). Am 5'-Ende findet sich ein Genomabschnitt, der nicht in ein Proteinprodukt übersetzt wird. Diese 5'UTR (vgl. 2.2.3) zeigt eine komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur und ist für die Initiation der Translation der nachfolgenden Proteine entscheidend (Brown *et al.*, 1992; Chon *et al.*, 1998; Le *et al.*, 1998; Pestova und Hellen, 1999). Im Anschluss folgen die Sequenzen für das N^{pro} und die Strukturproteine des BVDV. Beim N^{pro} handelt es sich um eine N-terminale Autoprotease, die sich selbstständig vom Polyprotein abspalten kann. Für die Replikation *in vitro* scheint das Protein nicht essentiell zu sein (Muyldermans *et al.*, 1996; Rümenapf *et al.*, 1998; Stark *et al.*, 1993; Tratschin *et al.*, 1998; Wiskerchen *et al.*, 1991). Das erste Strukturprotein ist das Kapsidprotein C (p14), welches für die Bildung des Nukleokapsids und für die Translokation der nachfolgenden Proteine in das Endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist (Rümenapf *et al.*, 1993; Thiel *et al.*, 1991; Thiel *et al.*, 1992; Thiel *et al.*, 1993). Im Anschluss folgen die Hüllproteine E^{ms} (E0, gp48; vgl. 2.2.3), E1 (gp25) und E2 (gp53). Es handelt sich hierbei um Glykoproteine, die Bestandteil der Hülle sind (Collett *et al.*, 1988a; Donis, 1995; Donis und Dubovi, 1987b; Thiel *et al.*, 1991). Im Falle des E1 und E2 sind die Proteine über hydrophobe Domänen in der Lipidmembran verankert (Donis, 1995; Rümenapf *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1996). Untereinander bilden die Hüllproteine über Disulfidbrücken Homo- und Heterodimere (Branza-Nichita *et al.*, 2001; Branza-Nichita *et al.*, 2002; Donis, 1995; Thiel *et al.*, 1991; Weiland *et al.*, 1990). Vor allem das E2 ist für den rezeptor-vermittelten Viruseintritt in die Wirtszelle entscheidend (Hulst und Moormann, 1997; Liang *et al.*, 2003; Xue und Minocha, 1993; Xue und Minocha, 1996).

Dieses stellt gleichzeitig das Hauptimmunogen für die Bildung neutralisierender Antikörper dar (Donis *et al.*, 1988; Donis, 1995; Donis und Dubovi, 1987c; Weiland *et al.*, 1989). Im Gegensatz dazu werden gegen das E^{ms} und das E1 im geringeren Maße bzw. keine neutralisierenden Antikörper gebildet (Boulangier *et al.*, 1991; König *et al.*, 1995; Rügenapf *et al.*, 1991; Weiland *et al.*, 1992; Weiland *et al.*, 1999). Im Anschluss an die Hüllproteine folgen die Sequenzen der verschiedenen, zytosolisch vorkommenden Nichtstrukturproteine (NS): p7, NS2/3 (p125) bzw. NS2 (p54) und NS3 (p80) (vgl. 2.2.3), NS4a und b sowie NS5a und b (Donis, 1995). Diese bilden den Replikationsapparat, der für die zytosolische Vermehrung der Pestiviren entscheidend ist (Behrens *et al.*, 1998). Der N-terminale Anteil des NS2/3 (NS2) fungiert als Autoprotease und spaltet das NS3 ab (Lackner *et al.*, 2004). Dieses besitzt zwei Domänen mit Serin-Protease- und NTPase/Helikase-Aktivität (Grassmann *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2000; Warrenner und Collett, 1995) und stellt den Hauptbestandteil der Replikationseinheit dar. Bei nzp BVD-Viren lassen sich die Spaltprodukte des NS2/3 nur kurz nach der Zellinfektion nachweisen, während sie bei zp Biotypen ständig zu finden sind (Lackner *et al.*, 2004). Die anderen Nichtstrukturproteine erfüllen Funktionen als Cofaktoren bei der Replikation bzw. ihre Aufgaben sind noch nicht ausreichend geklärt (Failla *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2001; Tautz *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 1998). Der NS3-Anteil ist aufgrund seiner funktionell wichtigen Domänen hochkonserviert und induziert die Bildung von Antikörpern (Corapi *et al.*, 1990a; Deregt *et al.*, 1990; Deregt *et al.*, 2005). Den Abschluss im BVDV-Genom bildet die 3'UTR. Ein Poly-A-Schwanz ist wie bei allen Vertretern der *Flaviviridae* nicht vorhanden (Collett *et al.*, 1988b; Deng und Brock, 1993; Donis, 1995). Die 3'UTR zeigt konservierte Abschnitte sowie haarnadelförmige Strukturen und soll bei der Steuerung der Replikation eine Rolle spielen (Yu *et al.*, 1999).

2.2.3 Für den BVDV-Nachweis bedeutsame Virusstrukturen

Für die Detektion des BVDV haben sich bestimmte Strukturen des Virus als besonders bedeutend erwiesen. Deren Eigenschaften und Funktionen werden im Folgenden kurz dargestellt.

RNA der 5'-untranslated region (5'UTR)

Am 5'-Ende des BVDV-Genoms findet sich ein Bereich, der nicht in ein Proteinprodukt übersetzt wird. Diese 5'UTR (*untranslated region*) hat eine Länge von etwa 385 Nukleotiden (Collett *et al.*, 1988b; Deng und Brock, 1992). Die wichtigste Struktur in diesem Bereich ist die *internal ribosome entry site* (IRES), die für die *cap*-unabhängige Initiation der Translation der nachfolgenden Proteinsequenzen verantwortlich ist (Chon *et al.*, 1998; Deng und Brock, 1993; Pestova und Hellen, 1999; Poole *et al.*, 1995). An der Bildung dieser IRES sind hochkonservierte und variable Abschnitte der 5'UTR beteiligt (Brown *et al.*, 1992). Die konservierten Bereiche sind zueinander großteils komplementär. Dadurch kommt es zur Ausbildung zahlreicher haarnadelförmiger Schleifen (Deng und Brock, 1993). Die sich hieraus ergebenden Domänen interagieren untereinander, so dass sich eine komplexe tertiäre Struktur ergibt (Le *et al.*, 1998). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Mutationen in bestimmten hochkonservierten Bereichen der IRES-Sequenz zum Verlust der Struktur und damit der Funktion führen können (Chon *et al.*, 1998; Fletcher *et al.*, 2002; Rijnbrand *et al.*, 1997). Dadurch lässt sich die Konservierung dieser Sequenzen bei allen Pestiviren erklären (Harasawa und Giangaspero, 1998; Le *et al.*, 1998). In der 5'UTR finden sich mehrere AUG-Codons, doch nur das direkt nach der IRES gelegene (Position 386) dient als Startpunkt für die Translation des ORF (Deng und Brock, 1993; Rijnbrand *et al.*, 1997). Für das CSFV konnte gezeigt werden, dass der eukaryotische Initiationsfaktor 3 an die IRES bindet und vermutlich für die Translation von Bedeutung ist (Sizova *et al.*, 1998). Die Beteiligung weiterer zellulärer Faktoren bleibt unklar (Pestova und Hellen, 1999; Sanderbrand *et al.*, 2000). Ebenfalls ist die direkt der IRES folgende Nukleotidsequenz und Struktur für eine effektive Initiation von Bedeutung (Fletcher *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die 5'UTR bedingt durch eine bifunktionale Struktur in der Lage ist, den Wechsel zwischen Translation und Transkription der nachfolgenden RNA und umgekehrt, zu induzieren (Yu *et al.*, 2000). Wegen des hohen Konservierungsgrades bestimmter Abschnitte der 5'UTR ist diese für den Nachweis mittels RT-PCR besonders geeignet (Gaede *et al.*, 2005; McGoldrick *et al.*, 1998; Vilcek *et al.*, 1994).

Hüllprotein E^{rns}

Das E^{rns} ist eines von drei Hüllproteinen des BVDV. Wie bei den anderen Hüllproteinen handelt es sich um ein stark glykolisiertes Protein (Collett et al., 1988a; Rümenapf et al., 1993). Es besteht aus 227 vorwiegend hydrophilen Aminosäuren, kann über Disulfidbrücken Homodimere ausbilden und lässt sich in infizierten Zellen, als Bestandteil der Virionen und als frei gelöstes Protein im umgebenden Medium nachweisen (Rümenapf et al., 1993; Thiel et al., 1991). Das E^{rns} (*envelope, ribonuclease, soluble*) zeigt einige herausragende Eigenschaften, die auch für seine Namensgebung entscheidend waren. Einige Abschnitte dieses Proteins sind hochkonserviert (Collett *et al.*, 1988a; Donis, 1995; Schneider *et al.*, 1993). Beim Vergleich dieser Sequenzen fielen Analogien zu bestimmten Klassen von RNasen auf. Schneider *et al.* (1993) wiesen erstmals die Funktion des E^{rns} als Ribonuklease nach. Für die Replikation des CSFV in der Zelle war diese Funktion unerheblich. Mutationen im Bereich der konservierten RNase-Sequenzen führten jedoch zur Attenuierung oder zur Apathogenität des Virus (Meyers *et al.*, 1999). Zudem wurde eine Funktion des E^{rns} bei der Evasion des Immunsystems diskutiert. Doppelsträngige RNA (dsRNA), wie sie bei der Replikation des BVDV vorkommt, induziert die Produktion von α - und β -Interferon. Das E^{rns} zeigte sowohl eine dsRNA-spezifische Bindungsaktivität als auch eine dsRNase-Funktion, wodurch die Signalfunktion der dsRNA auf das Immunsystem unterbunden werden könnte (Iqbal *et al.*, 2004). Ein weiterer Unterschied zu den übrigen Hüllproteinen ist, dass es keine hydrophobe Domäne für die Verankerung in den Membranen besitzt (Rümenapf et al., 1993). Dennoch erfolgt eine Interaktion mit der Membran über den C-terminalen Anteil des E^{rns}. Diese Bindung ist jedoch, wie Versuche mit verschiedenen Detergentien zeigten, bei weitem schwächer als der transmembranale Anker des E1 und E2 (Fetzer *et al.*, 2005). Die Freisetzung des E^{rns} aus infizierten Zellen dürfte jedoch nicht allein auf der schwachen Membranbindung beruhen (Rümenapf et al., 1993). Vielmehr konnte nachgewiesen werden, dass die N-Glykan-Anteile des Glykoproteins über die Steuerung des intrazellulären Transports entscheidenden Einfluss auf die Sekretion haben (Branza-Nichita *et al.*, 2004). In weiteren Arbeiten wurde aufgezeigt, dass das E^{rns} über bestimmte Rezeptoren an Wirtszellen binden kann und durch einen transmembranalen Transport ins Zellinnere gelangt. Daher dürfte es neben dem E2 Bedeutung für die Virusadsorption haben (Hulst und Moormann, 1997; Iqbal *et al.*, 2000; Iqbal und McCauley, 2002; Langedijk, 2002). Mehrfach wurde beschrieben, dass neben dem E2 auch das E^{rns} im Wirtsorganismus die Bildung von Antikörpern induzieren kann und dass diese neutralisierende Eigenschaften besitzen (Boulanger et al., 1991; Donis und Dubovi, 1987c; König et al., 1995; Weiland et al., 1992).

Nichtstrukturprotein 2/3 (NS2/3)

Das NS2/3 (p125) stellt ungespalten mit etwa 1300 Aminosäuren das größte der Nichtstrukturproteine dar (Collett *et al.*, 1988a). Bei nicht zytopathogenen BVD-Viren lässt sich, mit Ausnahme des Zeitraums kurz nach der Zellinfektion, nur das ungespaltene Protein nachweisen. Dagegen sind bei zytopathogenen Biotypen, die für die Pathogenese der MD entscheidend sind, die gespaltenen Produkte NS2 und NS3 ständig nachweisbar (Lackner *et al.*, 2004). Letzteres gilt dabei als Marker für die Zytopathogenität (Donis *et al.*, 1991; Donis und Dubovi, 1987a). Ursächlich für die Spaltung des NS2/3 bei zp Viren sind unterschiedliche Mutationen im Genom. Unter anderem wurden Insertionen zellulärer RNA (Becher *et al.*, 1996; Becher *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1991; Meyers *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 1998; Tautz *et al.*, 1993), Deletionen (Kupfermann *et al.*, 1996; Meyers und Thiel, 1996; Tautz *et al.*, 1994), Duplikationen und Rekombinationen (Becher *et al.*, 2002; Kümmerer *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 1992; Meyers und Thiel, 1996; Nagai *et al.*, 2003) oder Punktmutationen (Kümmerer und Meyers, 2000) beschrieben. Die Spaltung beruht auf einer Cystein-Autoprotease-Funktion des NS2-Anteils. Kurz nach der Zellinfektion ist sowohl bei nzp als auch bei zp Viren eine Aktivität dieser Protease zu beobachten. Bei nzp Biotypen wird diese jedoch nach wenigen Stunden herunterreguliert, so dass es zu keiner weiteren Bildung von NS3 kommt. Dieses ist jedoch ein wichtiger Bestandteil des Replikationsapparates und kann durch das ungespaltene NS2/3 nicht ausreichend ersetzt werden. Zp Viren haben die Möglichkeit zur Hemmung der Autoprotease verloren, wodurch eine ungesteuerte Virusvermehrung abläuft (Lackner *et al.*, 2004; Lackner *et al.*, 2005). Bei der Steuerung der Proteaseaktivität kommt dem zellulären Protein *Jiv* (*J-domain protein interacting with viral protein*) eine besondere Bedeutung zu. Dieses dient als Cofaktor für die Aktivierung der Autoprotease (Lackner *et al.*, 2005; Rinck *et al.*, 2001). Die Menge an *Jiv*, die intrazellulär vorhanden ist, limitiert somit die Autoproteaseaktivität (Lackner *et al.*, 2005; Lackner *et al.*, 2006). Bei einigen zp Biotypen wurden die Sequenzen des *Jiv* als Insertionen im BVDV-Genom nachgewiesen (Lackner *et al.*, 2005; Meyers und Thiel, 1996; Müller *et al.*, 2003). Das NS3 besitzt konservierte Domänen mit wichtigen Funktionen für die Replikation. Zum einen hat es eine Serin-Protease-Funktion und zum anderen zeigt es eine NTPase/Helikase-Aktivität (Grassmann *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2000; Tamura *et al.*, 1993; Tautz *et al.*, 1997; Warrener und Collett, 1995; Wiskerchen und Collett, 1991; Xu *et al.*, 1997). Das NS3 hat sowohl für die posttranslationale Prozessierung der nachfolgenden Nichtstrukturproteine als auch für die Synthese des Negativstrangs große Bedeutung (Gu *et al.*, 2000; Tautz *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997).

Einige der Sequenzen des NS3, vor allem im Bereich der Helikase-Domäne, dienen als hochkonservierte Epitope, die eine starke Antikörperbildung hervorrufen (Brown *et al.*, 2002; Deregt *et al.*, 2005). Diese Antikörper sind zwischen verschiedenen Pestiviren kreuzreaktiv (Edwards und Paton, 1995; Moennig *et al.*, 1987; Paton *et al.*, 1991b; Wensvoort *et al.*, 1989), besitzen jedoch keine neutralisierende Wirkung (Bolin und Ridpath, 1989; Collett, 1992; Edwards und Paton, 1995; Potgieter, 1995).

2.3 Methoden zum BVDV-Nachweis

Für den Nachweis des BVDV wurden verschiedene Testmethoden etabliert, welche auf der Detektion unterschiedlicher Virusstrukturen beruhen. All diese Verfahren haben charakteristische Eigenschaften hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, Einfluss maternalen Antikörper und Eignung für bestimmte Probenmaterialien.

2.3.1 Virusisolierung in der Zellkultur

Die klassische Methode zum Nachweis infektiöser BVD-Viren ist die Virusisolierung in der Zellkultur. Dabei erfolgt eine mehrtägige Kultivierung von Probenmaterial auf Zellkulturen, die für das BVDV empfänglich sind (Gillespie *et al.*, 1960). Hierfür eignen sich unter anderem primäre bovine Nieren-, Turbinal- und Hodenzellen (Edwards, 1990; Ferrari, 1985; Onyekaba *et al.*, 1987). Der Nachweis der BVDV-Infektion erfolgt anschließend durch die Detektion viraler Proteine mittels enzym- oder fluoreszenzmarkierter Antikörper im Fluoreszenzmikroskop, im Durchflusszytometer oder als Immunoperoxidase-Assay bzw. Monolayer-ELISA im Photometer (Afshar *et al.*, 1991; Deregt *et al.*, 1990; Donis *et al.*, 1988; Edwards, 1990; Saliki *et al.*, 1997; Ward und Kaerberle, 1984). Daneben können BVDV-Isolate aufgrund ihres Verhaltens in der Zellkultur als nicht zytopathogen (nzp) oder zytopathogen (zp) charakterisiert werden. Letztere verursachen *in vitro* innerhalb 24 bis 48 Stunden *post infectionem* den Zelltod durch Apoptose (Collett *et al.*, 1989; Gillespie *et al.*, 1960; Lee und Gillespie, 1957; Zhang *et al.*, 1996).

Nach wie vor stellt die Virusisolierung eines der sensitivsten BVDV-Nachweisverfahren dar, wobei die Sensitivität unter anderem vom Volumen des Probeninokulums und der Zeitspanne der Inkubation abhängt (Sandvik, 1999; Sandvik, 2005). Deshalb wird diese Methode oft als Goldstandard bei vergleichenden Untersuchungen zur Evaluierung neuer Diagnostik- und Kontrollverfahren eingesetzt (Brinkhof *et al.*, 1996; Gottschalk *et al.*, 1992; Graham *et al.*, 1998; Saliki, 2000; Saliki und Dubovi, 2004; Sandvik und Krogsrud, 1995; Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Als Probenmaterial kommen Serum, Vollblut, Samen, Schleimhautabstriche oder Organproben in Frage. Die besten Resultate lassen sich jedoch mit isolierten Blutleukozyten erzielen (Brock, 1995; Saliki und Dubovi, 2004). Bestimmte Probenbestandteile können die Virusisolierung negativ beeinflussen und eine korrekte Auswertung gegebenenfalls unmöglich machen. Dazu zählen zytotoxische Inhaltsstoffe, Pilz- und Bakterienkontaminationen und neutralisierende Antikörper (Saliki und Dubovi, 2004; Schelp und Greiser-Wilke, 2003).

So kann beim Nachweis von PI Tieren mittels Virusisolierung aus Blutleukozyten eine deutliche Diagnostische Lücke aufgrund kolostraler Antikörper beobachtet werden (Brock *et al.*, 1998; Palfi *et al.*, 1993; Zimmer *et al.*, 2004). Bedingt durch den hohen Zeit- und Arbeitsaufwand lassen sich nur begrenzte Probenzahlen bearbeiten, so dass diese Methode nur eingeschränkt für die Massendiagnostik geeignet ist.

2.3.1 Antigennachweis

Im Gegensatz zur Isolierung infektiöser BVD-Viren in der Zellkultur kann der direkte Nachweis BVDV-spezifischer Antigene sehr schnell erfolgen. Der entscheidende Schritt für die Durchsetzung des Antigen (AG)-Nachweises in der BVDV-Diagnostik gelang mit der Entwicklung monoklonaler Antikörper (mAK), die bestimmte Epitope einzelner Virusproteine erkennen (Edwards et al., 1991; Haines et al., 1992; Paton et al., 1991b). Dazu zählen sowohl hochkonservierte Bindestellen, die für eine „panpesti“-Diagnostik geeignet sind, als auch spezifische Antigenstrukturen, mit denen eine Klassifizierung von Genotypen möglich ist (Beer und Wolf, 1999; Edwards *et al.*, 1991). Je nach Probenart wurden unterschiedliche Techniken zum AG-Nachweis etabliert, die in Kombination mit den eingesetzten mAK und den hiermit detektierten Proteinen charakteristische Vor- und Nachteile besitzen.

Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Diese Methode nutzt die im Blut enthaltenen Leukozyten zum BVDV-Nachweis. Mononukleäre Blutzellen werden zu einem großen Teil durch das Virus infiziert, so dass sich in ihrem Zytoplasma virale Proteine nachweisen lassen (Bielefeldt *et al.*, 1987; Sopp *et al.*, 1994). Für die schnelle Detektion dieser Virusantigene in den weißen Blutkörperchen wurden verschiedene Protokolle beschrieben, die auf einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung und der anschließenden Analyse in einem Durchflusszytometer basieren (Beer und Wolf, 1999; Qvist *et al.*, 1990). Durch Lyse der Erythrozyten in einer gerinnungsgehemmten Blutprobe und anschließender Zentrifugation werden die Leukozyten isoliert und im Anschluss mit einer Paraformaldehydlösung fixiert. Daraufhin wird die Zellmembran mittels Detergentien permeabilisiert und somit für Antikörper durchgängig gemacht. Ein primärer mAK, der an das zytoplasmatisch vorliegende NS3 bindet, wird durch Zugabe eines gefärbten Konjugats markiert. In einem Durchflusszytometer wird anschließend der Anteil fluoreszierender und somit BVDV-positiver Zellen bestimmt und damit der Probenstatus festgelegt (Beer und Wolf, 1999; Qvist *et al.*, 1991). Beim Einsatz eines „panpesti“-reaktiven primären mAK (z. B. WB103/105) ergibt sich eine schnelle Diagnostikmethode zur Auffindung transient und persistent infizierter Rinder. Die Sensitivität des Verfahrens zeigte sich bei der Untersuchung von PI Tieren im Vergleich zur Virusisolierung als sehr hoch (Qvist *et al.*, 1991). Das Vorkommen von maternalen Antikörpern im PI Kalb kann jedoch auch bei dieser Nachweismethode zu falsch negativen Ergebnissen führen (=Diagnostische Lücke). Daher können negative Befunde von Kälbern bei postkolostral gewonnenen Blutproben bis zu einem Alter von drei Monaten nicht als valide anerkannt werden (Wolf, 2005).

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Mit der Etablierung BVDV-spezifischer mAK wurde die Grundlage für die rasche und differenzierte Entwicklung verschiedener *Enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA) zum AG-Nachweis geschaffen (Entrican *et al.*, 1995; Fenton *et al.*, 1991; Gottschalk *et al.*, 1992; Mignon *et al.*, 1991; Shannon *et al.*, 1991).

Die ersten AG-ELISAs benutzten spezifische Antikörper für das Nichtstrukturprotein 3, da dieses hochkonservierte Epitope besitzt (Corapi *et al.*, 1990a; Paton *et al.*, 1991b; Sandvik und Krogsrud, 1995). Da das NS3 nur zytoplasmatisch vorkommt, muss das Probenmaterial einer Vorbehandlung unterzogen werden, um eine größtmögliche Sensitivität zu erreichen (Saliki und Dubovi, 2004; Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Mit Vollblut ließen sich die besten Ergebnisse erzielen, wenn vor der Durchführung des ELISAs eine Isolierung der Blutleukozyten und deren Lyse erfolgte (Greiser-Wilke *et al.*, 1993). Die Sensitivität der verschiedenen beschriebenen NS3-ELISAs bei der Untersuchung von weißen Blutkörperchen liegt im Vergleich zur Virusisolierung im Bereich von 94 % bis 100% (Brinkhof *et al.*, 1996; Gottschalk *et al.*, 1992; Mars und Van Maanen, 2005; Mignon *et al.*, 1992). Bei der Analyse von Serumproben konnte hingegen nur eine Sensitivität von 46% bis 48% festgestellt werden (Graham *et al.*, 1998). Bei der Untersuchung von PI Tieren in der kolostralen Phase mittels Blutproben kommt es auch beim NS3-ELISA regelmäßig zu falsch negativen Ergebnissen aufgrund maternaler Antikörper (Brinkhof *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 2004).

Bei später entwickelten AG-ELISAs wurde das NS3 durch das Strukturprotein E^{ms} als Zielantigen ersetzt (Saliki *et al.*, 2000; Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Dieses Hüllprotein lässt sich auf der Oberfläche der Virionen nachweisen, wird aber auch von infizierten Zellen in das umgebende Medium abgegeben, so dass es frei gelöst im Serum vorkommt (Rümenapf *et al.*, 1993). Damit entfällt eine aufwendige Probenbearbeitung, wie sie für die Freisetzung des zellgebundenen NS3 nötig ist. Außerdem zeigte sich, dass sich das im Serum enthaltene BVDV über einen längeren Zeitraum stabil konservieren lässt (Saliki *et al.*, 1997).

Somit eignen sich diese E^{ms}-ELISAs auch für zellfreie Probenmaterialien wie Serum, Plasma oder auch Milchproben (Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Bei der Untersuchung von Serumproben von über drei Monate alten Kälbern konnte im Vergleich zur Virusisolierung im Mikrotiter-Format eine relative Sensitivität von 93,6% nachgewiesen werden, wobei die falsch negativen Ergebnisse vorwiegend auf akut infizierte Tiere zurückgeführt wurden (Saliki *et al.*, 2000).

Ein weiterer Vorteil des E^{ms} als Zielstruktur ist, dass seine Detektion im ELISA im Vergleich zum NS3 weniger durch maternale Antikörper inhibiert wird. Somit ist vermutlich auch die Diagnostische Lücke kürzer (Sandvik, 2005; Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Mehrfach wurde die Verwendung von E^{ms}-ELISAs zum BVDV-Nachweis aus frischem oder eingetrocknetem Ohrgewebe beschrieben (Cornish et al., 2005; Huchzermeier et al., 2004; Kühne et al., 2005). Hierbei wurden Kälber verschiedener Alterstufen vergleichend zur Virusisolierung aus Blutleukozyten, FACS-Analyse, PCR oder immunhistochemischen Untersuchungen getestet. Bei allen Studien erzielten die verschiedenen E^{ms}-ELISAs bei der Detektion von PI Tieren anhand von Ohrgewebeproben eine Sensitivität von 100%. Auch elf Tiere, die aufgrund einer definierten Belastung mit kolostralen Antikörpern eine deutliche Diagnostische Lücke bei der Virusisolierung zeigten, konnten mit einem E^{ms}-ELISA sicher nachgewiesen werden (Kühne et al., 2005).

Immunhistochemische Untersuchungen (IHC)

Immunhistochemische Techniken zum Nachweis viraler Antigene im Gewebe wurden bereits früh zur Aufklärung der Pathogenese der BVD/MD eingesetzt (Bielefeldt Ohmann, 1988; Bielefeldt Ohmann, 1983; Brusckke et al., 1998; Liebler-Tenorio et al., 2000; Wilhelmsen et al., 1991). Hierbei konnte gezeigt werden, dass das BVDV sowohl bei PI Tieren als auch zeitweise bei transient infizierten Tieren in vielen Organen und Zellarten nachzuweisen ist (Bielefeldt, 1988; Bielefeldt-Ohmann, 1995; Ellis *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 1989; Fredriksen *et al.*, 1999; Liebler-Tenorio *et al.*, 2002; Shin und Acland, 2001; Spagnuolo-Weaver *et al.*, 1997). Die sich hieraus ergebenden diagnostischen Möglichkeiten wurden zunächst im Rahmen pathologischer Untersuchungen genutzt (Ellis et al., 1995; Haines et al., 1992; Thür et al., 1996a; Thür et al., 1997). Für die Sensitivität der Methodik ist dabei die Kombination aus Schnitttechnik, Art der Fixierung und Färbemethode entscheidend. Thür *et al.* (1996a; 1997) konnten bei der Untersuchung diverser Organe die besten Resultate mit Kryostatschnitten und einem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Protokoll erzielen. Für die BVDV-Detektion in abortierten, teilweise autolytischen Feten erschienen hingegen formalinfixierte Paraffinschnitte des Gehirns als geeignet.

Beim immunhistologischen Nachweis des BVDV ist vor allem die Wahl des primären mAK entscheidend. Sensible Epitope können durch Fixierungsschritte oder autolytische Prozesse zerstört werden. So erzielte ein gegen das NS2/3 gerichteter mAK (C16) in Verbindung mit Kryostatschnitten einerseits beste Ergebnisse, andererseits erwies er sich für formalinfixierte Paraffinschnitte als ungeeignet (Thür et al., 1996a).

Im Gegensatz dazu konnten verschiedene Autoren zeigen, dass ein mAK (15C5), der mit einem stark konservierten Epitop des Hüllproteins E^{rms} reagiert, sehr gut zum Virusnachweis in formalinfixierten Präparaten geeignet ist (Brock, 1995; Brodersen, 2004; Ellis et al., 1995; Haines et al., 1992; Thür et al., 1997). Für die Suche nach lebenden PI Tieren eignen sich Hautbiopsien oder Ohrstanzen als Probenmaterial für die Immunhistochemie (IHC). In verschiedenen Studien konnten hierbei im Vergleich zur Virusisolierung Sensitivitäten zwischen 97,6% und 100% erzielt werden (Brodersen, 2004; Grooms und Keilen, 2002; Njaa et al., 2000; Thür et al., 1996b). Die Entnahmestelle der Biopsie spielt dabei keine Rolle, da sich das BVDV gleichmäßig in der Haut von PI Tieren verteilt nachweisen lässt (Thür et al., 1996b). Die stärkste Färbung zeigte sich hierbei im Bereich des *Stratum basale* und des *Stratum spinosum* der Epidermis sowie in den Wurzelscheiden der Haare (Njaa et al., 2000; Thür et al., 1996a). Im Gegensatz dazu ergaben immunhistochemisch untersuchte Hautproben von transient infizierten Tieren nur vereinzelt positive Ergebnisse (Grooms und Keilen, 2002). In einer Studie mit Kälbern, die experimentell mit sechs verschiedenen BVDV-Stämmen akut infiziert wurden, konnte zu keinem Zeitpunkt bei einem Tier eine Infektion mittels IHC von Hautbiopsien nachgewiesen werden (Ridpath *et al.*, 2002). Njaa *et al.* (2000) konnten hingegen abhängig von der Infektionsdosis in geringen Umfang eine BVDV-spezifische Färbung in der Haut beobachten. Auch aus Felduntersuchungen sind IHC-positive Proben von transient infizierten Tiere bekannt (Grooms und Keilen, 2002). Beim Einsatz einer BVDV-Lebendvakzine konnten keine Auswirkungen auf die IHC-Untersuchung BVDV-naiver Tiere beobachtet werden (DuBois *et al.*, 2000). In einer Studie mit neugeborenen Kälbern im Alter von ein bis vier Wochen mit nicht dargestellter Kolostrumversorgung konnten PI Tiere sicher erkannt werden (Grooms und Keilen, 2002). Braun *et al.* (1999) konnten bei elf PI Kälbern im Alter zwischen einem und 50 Tagen BVDV-Antigene in der Haut immunhistologisch nachweisen. Ein ELISA mit Blutleukozyten derselben Tiere als Probenmaterial erkannte, vermutlich durch maternale Antikörper bedingt, nur vier der elf Tiere. Auch andere Autoren gehen davon aus, dass kolostrale Antikörper die Nachweisbarkeit der BVDV-Antigene im Gewebe mittels IHC nicht beeinträchtigen (Brodersen, 2004; Goyal, 2005; Sandvik, 2005).

2.3.3 RT-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR-Systeme zum Nachweis des BVDV sind seit Anfang der 1990er Jahre in Verwendung. Anfangs wurde die Reverse Transkription (RT) der Virus-RNA und die PCR-Amplifikation in zwei getrennten Schritten durchgeführt (Belak und Ballagi-Pordany, 1991; Brock, 1991; Horner *et al.*, 1995; Radwan *et al.*, 1995; Vilcek *et al.*, 1994). Hierbei besteht jedoch die Gefahr der Kreuzkontamination mit *complementary DNA* (cDNA) und somit von falsch positiven Ergebnissen (Sandvik, 2005). Mit der Entwicklung von *one tube*-Assays, bei denen beide Reaktionen nacheinander in demselben Gefäß ablaufen, konnte diese Fehlerquelle ausgeschlossen werden (Drew *et al.*, 1999; Easton *et al.*, 1994; Pfeffer *et al.*, 2000). Um eine weitere Steigerung der Sensitivität und Spezifität zu erreichen, wurden diverse Protokolle für eine *nested* RT-PCR entwickelt (Hyndman *et al.*, 1998; McGoldrick *et al.*, 1999; Sullivan und Akkina, 1995). Hierbei wird ein bereits vervielfältigtes DNA-Fragment ein weiteres Mal in einer PCR vermehrt. Dies erfolgt mit einem Primerpaar, das innerhalb des in der ersten Reaktion verwendeten angeordnet ist.

Der Nachweis des Amplifikationsproduktes erfolgt bei der herkömmlichen PCR durch Gel-Elektrophorese. Hierfür muss die cDNA aus dem Reaktionsgefäß entnommen werden, wodurch die Gefahr einer Kontamination von Labor und Probenmaterial besteht (McGoldrick *et al.*, 1999). Mit dem Einsatz der *real time* PCR-Technologie in der BVD-Diagnostik konnte dies vermieden werden (Bhudevi und Weinstock, 2001; Gaede *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2006; Mahlum *et al.*, 2002; McGoldrick *et al.*, 1998; McGoldrick *et al.*, 1999). Bei der *real time* PCR werden dem Reaktionsansatz fluoreszenzmarkierte Sonden beigegeben. Diese Oligonukleotide binden in dem Bereich an die Zielsequenz, der durch das Primerpaar begrenzt wird. Unabhängig von der angewendeten Sonden-Technik kommt es parallel zur Vermehrung des Amplifikationsproduktes zum Anstieg der Fluoreszenz, der durch ein optisches System erkannt wird. Anhand der Zunahme der Fluoreszenz erfolgt nicht nur der Nachweis des PCR-Produktes, sondern es ist gleichzeitig die Möglichkeit einer Quantifizierung gegeben (Mackay *et al.*, 2002). Die Sensitivität und Spezifität der PCR ist in erster Linie von den gewählten Primern bzw. Sonden abhängig. Für den Einsatz in der Diagnostik ist vor allem entscheidend, dass möglichst alle BVDV-Isolate erkannt werden. Nachdem die frühen RT-PCR-Systeme verschiedenste Genomregionen des BVDV als Zielstruktur verwendeten (Belak und Ballagi-Pordany, 1991; Brock, 1991; Horner *et al.*, 1995), weisen neuere Assays vorwiegend die hochkonservierte 5'UTR nach (Bhudevi und Weinstock, 2001; Gaede *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2006; Kim und Dubovi, 2003; Letellier *et al.*, 1999; McGoldrick *et al.*, 1998; Renshaw *et al.*, 2000; Vilcek *et al.*, 1994; Weinstock *et al.*, 2001).

Die RT-PCR wurde in verschiedenen Studien nicht nur zum BVDV-Nachweis, sondern auch zur gleichzeitigen Differenzierung von Genotypen eingesetzt (Bhudevi und Weinstock, 2001; Letellier *et al.*, 1999; Letellier und Kerkhofs, 2003; Ridpath und Bolin, 1998). Gaede *et al.* (2005) nutzten ein „panpesti“-reaktives Primerpaar in Kombination mit verschiedenen Sonden, um zwischen BVDV, CSFV und BDV zu unterscheiden.

Mehrfach hat sich gezeigt, dass der BVDV-Nachweis mittels RT-PCR im Vergleich zur Virusisolierung und zum AG-ELISA wesentlich sensitiver ist (Deregt *et al.*, 2002; Horner *et al.*, 1995; Renshaw *et al.*, 2000). So wurden diverse PCR-Systeme erfolgreich zum Virusnachweis aus Milch (Bendfeldt *et al.*, 2005; Drew *et al.*, 1999; Gaede *et al.*, 2003; Kozasa *et al.*, 2005; Radwan *et al.*, 1995; Renshaw *et al.*, 2000), Blut- und Serumproben (Deregt *et al.*, 2002; Fulton *et al.*, 2006; Gaede *et al.*, 2003; Kim und Dubovi, 2003; Weinstock *et al.*, 2001), Follikelflüssigkeit (Kim und Dubovi, 2003), Samenproben (Da Silva *et al.*, 1995; Givens *et al.*, 2003; Heath *et al.*, 2003), Pleural- und Peritonealflüssigkeit aus abortierten Feten (Hyndman *et al.*, 1998) und diversen frischen oder formalinfixierten Gewebeproben (Bhudevi und Weinstock, 2003; Cornish *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2006; Scheibner *et al.*, 2000) angewendet. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass eine effektive, dem Probenmaterial angepasste Form der RNA-Isolierung mindestens so wichtig ist wie das verwendete PCR-System selbst (Deregt *et al.*, 2002; Saliki und Dubovi, 2004; Scheibner *et al.*, 2000). Die hohe Sensitivität der Methode an sich erlaubt dabei auch ein Poolen von Proben, was zu einer deutlichen Kostenreduktion führen kann (Bendfeldt *et al.*, 2005; Drew *et al.*, 1999; Gaede *et al.*, 2003; Letellier *et al.*, 2005; Weinstock *et al.*, 2001).

Für die Detektion einzelner PI Tiere innerhalb eines BVD-Kontrollverfahrens stellen Blut- bzw. Serumproben oder Ohrstanzen mögliche Probenmaterialien dar. Verschiedene Autoren berichteten, dass sich die BVDV-RNA in Blutproben unabhängig vom Vorhandensein maternalen Antikörper zuverlässig nachweisen lässt (Gaede *et al.*, 2003; Rossmanith *et al.*, 2001; Sandvik, 1999; Sandvik, 2005). Anhand von Blutproben definierter PI Kälber, die sieben Tage nach Kolostrumaufnahme entnommen wurden, konnten in einer Studie mittels RT-PCR alle 19 getesteten Tiere erkannt werden. Die Virusisolierung erzielte dagegen nur in 4 von 25 und der AG-ELISA nur in 10 von 25 Fällen positive Ergebnisse (Zimmer *et al.*, 2004). Pooluntersuchungen von 3599 Ohrgeweben einjähriger Kalbinnen mit 100 Proben pro Pool zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit den Einzelergebnissen der IHC und eines AG-ELISAs der selben Proben. In der gleichen Studie erkannte die RT-PCR 36 Pools als positiv, bei denen jeweils 99 BVDV-freie Ohrstanzen (Bestimmung mittels AG-ELISA) vorsätzlich mit dem Gewebe eines PI Tier vermischt wurden (Kennedy *et al.*, 2006).

3. Material und Methoden

3.1 Spendertiere für Gewebe- und Blutproben

3.1.1 PI Tiere ohne nachweisbare kolostrale BVDV-Antikörper

Als Spender für Blut- und Gewebeproben wurden institutseigene persistent BVDV-infizierte Rinder verwendet. Die Tiere stammten aus einer vorangegangenen Studie zur Untersuchung der kolostralen Phase (Wolf, 2005). Die intrauterine BVDV-Infektion der Rinder (vgl. Tabelle 1) erfolgte nach Weidekontakt der trächtigen Muttertiere mit einem PI Rind (BVDV1-CR4043). Zwei Tiere (**A2** und **G2**) wurden von PI Rindern geboren. Die Haltung der Spendertiere erfolgte in den institutseigenen Stallungen am Oberwiesenfeld.

Zum Zeitpunkt der Tötung bzw. der Probennahme waren bei keinem Tier kolostrale Antikörper nachweisbar (Ceditest[®] BVDV, vgl. Wolf, 2005). Die Ohren wurden bei der Schlachtung vom Körper abgetrennt, in Plastikbeutel verpackt und bis zur weiteren Bearbeitung (vgl. 3.2.2) bei 4°C gelagert.

Tab. 1: PI Tiere ohne nachweisbare kolostrale BVDV-Antikörper: Angaben zum Infektionszeitpunkt der Tiere und zu deren Alter bei der Tötung (Gewinnung des Ohrgewebes)

PI Tier	fetales Alter bei BVDV-Infektion (d)	Alter bei Tötung (d)
B	84-91	252
C	83-90	308
D	54	324
E	62-69	336
G	52-59	
H	43-50	833
I	40-47	568
K	97-104	377
A2	Mutter PI	198
G2	Mutter PI	Totgeburt

3.1.2 PI Tiere mit kolostralen BVDV-Antikörpern

Im Rahmen einer Impfstoffprüfung wurden Kalbinnen 72 Tage *post inseminationem* mit dem BVDV-I-Feldisolat PT810 intranasal infiziert. Die hieraus resultierenden persistent infizierten Kälber erhielten Kolostrum *ad libitum*. Prä- und postkolostral, kurz vor der Euthanasie, wurden den Tieren EDTA-Blutproben entnommen. Durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung (mAK WB103/105) und nachfolgender Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil BVDV-Antigen-haltiger Leukozyten bestimmt (prä- und postkolostrale Proben). Der postkolostrale Antikörper (AK)-Titer wurde mit Hilfe eines Serum-Neutralisationstests (SNT) ermittelt. Tabelle 2 zeigt die ermittelten Werte. Im Alter von ein bis zwei Wochen wurden die Kälber euthanasiert. Die Ohren wurden abgetrennt, etwa einen Tag kühl gelagert und anschließend bei -80°C tiefgefroren (Oktober 2001). Nach dem Auftauen wurden daraus trockenkonservierte Ohrstanzproben (vgl. 3.2.2) hergestellt.

Tab. 2: PI Tiere in der kolostralen Phase: Angaben zur Belastung mit maternalen Antikörpern und deren Einfluss auf den BVDV-Nachweis in Blutleukozyten

PI Tier	präkolostrale Blutprobe		Euthanasie Lebenstag	Blutprobe bei Euthanasie		SNT- Titer
	NS3-positive			NS3-positive		
	Lymphozyten	Granulo-/ Monozyten		Lymphozyten	Granulo-/ Monozyten	
KB5	35%	30%	9	0,7%	0,2%	>2900
KB6	53%	47%	8	1,3%	1,5%	
KB11	50%	58%	13	0,6%	0,1%	
KB12	56%	46%	13	0,3%	0,4%	
KB18	42%	43%	6	3,8%	8,3%	
KB1	57%	48%	5	6,5%	9,0%	2299
KB7	60%	49%	8	3,3%	3,5%	724
KB10	48%	44%	13	11%	63%	72
KB4	64%	47%	9	38%	42%	45
KB2	65%	46%	10	16%	54%	<10
KB8	49%	42%	7	37%	67%	
KB15	43%	38%	9	39%	47%	

3.1.3 BVDV-freie Tiere

BVDV-freie Gewebeproben für die PCR-Pooluntersuchungen wurden von adulten Schlachtrindern gewonnen. Im Schlachthof München wurde von Schlachtkörpern jeweils ein Ohr abgetrennt, separat in Plastikbeutel verpackt und bis zur Herstellung der Ohrstanzproben (vgl. 3.2.2) kühl gelagert.

Zur Bestimmung des Infektionsstatus wurde während der Schlachtung EDTA-Blut gewonnen. Hieraus wurden Leukozyten isoliert (vgl. 3.2.1), welche durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung und Analyse im Durchflusszytometer und mittels *real time* RT-PCR auf das Vorhandensein von BVDV überprüft wurden. Ebenso wurden Ohrgewebeproben der Tiere nach Standardprotokoll aufbereitet (vgl. 3.5.2) und in der *real time* RT-PCR getestet. Zudem wurden die Blutproben mit einem BVDV-Antikörper-ELISA (BAR VAC[®] BVDV-Diagnostikum) untersucht. Nur bei negativen Ergebnissen aller Analysen wurde das zugehörige Ohrgewebe als Probenmaterial für die Pooluntersuchungen verwendet.

3.2 Herstellung des Probenmaterials

3.2.1 Herstellung von Leukozytenpellets

Dem PI Tier **G** wurde am 524. Lebenstag Blut aus der *Vena jugularis* entnommen und mittels EDTA (1,6mg/ml) stabilisiert. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte mittels eines Cell DYN 3500 Analysegerätes (1. Medizinische Tierklinik, LMU): 56,4% Lymphozyten, 37,8% Granulozyten und 5,8% Monozyten. Durch Ammoniumchloridlyse wurde die Leukozytenfraktion gewonnen. Zu einem Teil Blut wurden 3 Teile Lysispuffer (8,29g/l NH₄Cl, 1,0 g/l KHCO₃ und 1mM EDTA in A. demin) gegeben und 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10min bei 2000rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Danach wurde das Zellpellet durch Resuspendieren mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ und anschließender Zentrifugation (5min, 2000rpm) dreimal gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ resuspendiert und Aliquots zu je 2x10⁷ Zellen in 2ml Schraubröhren (Sarstedt) überführt. Diese wurden 5min bei 2000rpm zentrifugiert, dekantiert und bei 4°C aufbewahrt. Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie wurde der Anteil BVDV-Antigen-haltiger Leukozyten bestimmt. 25,6% der Lymphozyten und 31,5% der Granulozyten/Monozyten-Population zeigten eine BVDV-NS3-spezifische Immunfluoreszenz.

3.2.2 Herstellung von trockenkonservierten Ohrgewebeproben

Die frischen bzw. aufgetauten Rinderohren wurden mit einem Skalpell in ca. 2x2mm große Gewebestücke (mittleres Gewicht ca. 16mg, n=57) zerlegt. Diese Proben wurden, gegebenenfalls nach weiterer Bearbeitung (vgl. 3.3), mit dem zugehörigen Stanzkegel in TypiFix™ Probenbehältnisse (Agrobiogen) eingebracht und verschlossen. Das TypiFix™ System enthält Molekularsiebperlen, eine hygroscopische Substanz, die dem Gewebe Feuchtigkeit entzieht. Analog dazu wurden Probenserien hergestellt, bei denen die Gewebestücke zusammen mit 15 bis 20 aktivierten (1h bei 240°C) Molekularsiebperlen (Merck) in 2ml Schraubröhren verschlossen wurden. Bis zur Testung wurden die Proben, soweit nicht anders angegeben (vgl. 3.3), bei 4°C gelagert (Mindestlagerzeit eine Woche).

3.3 Belastungsfaktoren

Neben der Bestimmung der analytischen Sensitivität der Testsysteme und der Etablierung geeigneter Probenbearbeitungsverfahren wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere für die Ohrstanzdiagnostik bedeutsame Faktoren untersucht. Zum einen handelte es sich hierbei um probenintrinsische BVDV-Antikörper, zum anderen um ausgewählte Umweltfaktoren, die präanalytisch zu einer Zerstörung von BVDV-Strukturen in der Ohrstanze bzw. zu einer Hemmung der Analysemethode selbst führen könnten.

3.3.1 Kolostrale Antikörper

Um die Auswirkungen maternaler Antikörper auf die Ohrstanzdiagnostik zu untersuchen, wurden in den AG-ELISAs neben Proben von PI Kälbern in der kolostralen Phase (vgl. 3.1.2) zusätzlich artifiziell mit BVDV-Antikörpern belastete Ohrstanzen getestet.

Um den prinzipiellen Effekt der Antikörper auf die verschiedenen BVDV-Antigene darzustellen, wurden 100 frische Ohrgewebeproben des PI Tieres **I** in einem Polypropylenröhrchen (15ml) mit 4ml AK-haltigem Serum (postkolostral von Tier **E** gewonnen; SNT-Titer 1:32000 gegen homologes BVDV CR4043) versetzt und 2h bei 25°C inkubiert. Die Gewebeproben wurden nach der Inkubation auf Zellstoff ausgelegt und anschließend in die TypiFix™ Behältnisse verbracht. In einem parallel durchgeführten Versuch wurde die aufgenommene Menge Serum pro Stanze durch Gewichtsmessung bestimmt. Jede Stanze nahm dabei im Mittel 10% ihres Ausgangsgewichtes an Serum auf.

Für die genauere Quantifizierung des Neutralisationseffekts auf den E^{rns}-Nachweis wurden getrocknete Stanzen des Tieres **I** mit verschiedenen Mengen AK-haltigem Serums (postkolostral von Tier **E** gewonnen; SNT-Titer 1:45255 gegen homologes BVDV CR4043) über Nacht bei 4°C inkubiert. Hierzu wurde das Serum in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ verdünnt, so dass stets eine Zugabe von mindestens 4µl gewährleistet war. Die zugesetzten Mengen entsprachen dabei 2µl, 1µl, 0,5µl und 0,25µl des unverdünnten Serums.

Der Einfluss der kolostralen Phase *in vivo* wurde anhand verschiedener PI Kälber innerhalb der ersten zwei Lebenswochen untersucht (vgl. 3.1.2).

3.3.2 Lagerungstemperaturen

Um die Stabilität der nachzuweisenden BVDV-Strukturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzen unter verschiedenen Temperaturbedingungen zu untersuchen, wurden homologe Probenserien der Tiere **I** bzw. **G2** nach dem Verbringen in das Stanzgefäß für 16h bei Raumtemperatur ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) gelagert und dann folgenden Belastungstemperaturen ausgesetzt: 9h bei 50°C bzw. 5Tage bei 37°C , bei $23^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$, bei 4°C und bei -20°C . Anschließend wurden die Probengefäße bis zur Testung zwei Wochen bei Raumtemperatur (Tier **I**) bzw. bei 4°C (Tier **G2**) gelagert.

3.3.3 Bakterielle Kontaminationen

Der Abbau der BVDV-Proteine und -RNA im Gewebe durch bakterielle Fermentation ist eine potentielle Ursache für falsch negative Untersuchungsergebnisse. Anhand ausgesuchter Bakterien wurde untersucht, ob das Eintrocknen der Ohrstanzen mittels Molekularsieb prinzipiell geeignet ist, den mikrobiellen Verderb ausreichend zu unterbinden. Um die bakterielle Ausgangskontamination zu ermitteln, die natürlicherweise dem Ohrgewebe anhaftet, wurden frisch gefertigte Stanzproben in 1ml NaCl-Lösung gegeben. Nach kurzem Schütteln wurden aus $100\mu\text{l}$ der Lösung in der bakteriologischen Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin folgende Keime isoliert: α -hämolyisierende Streptokokken, *Staphylococcus* spez., Mikrokokken und aerobe Sporenbildner.

Für den Versuch wurden Keime ausgewählt (vgl. Tabelle 3), die im Milieu „Kuhstall“ vorkommen und potentielle Protease- und RNase-Bildner sind. Die Isolate wurden der Routinediagnostik des Instituts entnommen. Die fäkale Mischflora wurde aus frischem Kot eines BVDV-freien Rindes auf Blutagarplatten angezüchtet.

Von jedem Keim wurde mit NaCl-Lösung eine Suspension (McFarland 0,5) hergestellt, die anschließend 1:10 in NaCl-Lösung verdünnt wurde. Von dieser Gebrauchslösung wurden jeweils $10\mu\text{l}$ auf frische Ohrgewebeproben des PI Tieres **I** gegeben. Um die bakterielle Aktivität auf den kontaminierten Stanzen zu fördern, wurden die Proben für 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Verbringung des Ohrgewebes in das TypiFix™ Probennahmesystem (vgl. 3.2.2). Die Proben wurden bis zur Testung bei Raumtemperatur gelagert.

Die Keimzahlbelastung der einzelnen Proben wurde mittels Oberflächenverfahren auf Blutagarplatten ermittelt. Die Gebrauchslösung wurde 1:10⁴ und 1:10⁵ verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 0,1ml im Doppelansatz auf Blutagarplatten ausgespatelt, welche anschließend für 24h bis 48h bei 37°C inkubiert wurden. Anhand der ausgezählten Kolonien wurde die Keimbelastung der einzelnen Stanze ausgerechnet (vgl. Tabelle 3).

Tab. 3: Für die Kontaminationsversuche verwendete Bakterienspezies und Keimgehalt der einzelnen Ohrstanzen

Spezies	CFU pro Stanze
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,9x10 ⁵
<i>Escherichia coli</i>	3,1x10 ⁵
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	6,8x10 ⁵
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,9x10 ⁵
fäkale Keimflora*	1,4x10 ⁵

* α- und anhämolysierende Streptokokken, *Staphylococcus spez.*, *Micrococcus spez.* und *Escherichia coli*

3.3.4 Kontaminationen mit Rinderkot

Jeweils 300mg Kot eines BVDV-freien Rindes wurden mittels Molekularsieb (vgl. 3.2.2) eingetrocknet. Jedes Kot-Pellet wurde in 300µl RLT Puffer (vgl. 3.5.2) aufgenommen und mit einer Laborschwingmühle homogenisiert (vgl. 3.5.1).

Vier Stanzproben des PI Tieres **G2** wurden einzeln mit je 600µl RLT Puffer homogenisiert. Jeder dieser Ansätze wurde in vier Aliquots zu je 100µl Homogenat aufgeteilt. Jeweils ein Aliquot wurde mit 150µl, 75µl oder 37,5µl der Kotzubereitung kontaminiert. Ein Aliquot ohne Kotzusatz diente als Kontrolle. Die anschließende RNA-Aufreinigung erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben mit Hilfe des RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). Die gewonnenen RNA-Eluate wurden unverdünnt und teilweise (Ansätze mit 150µl bzw. 75µl Kotzusatz) 1:10 in Elutionspuffer verdünnt in der *real time* RT-PCR getestet.

3.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Detektion der BVDV-Antigene erfolgte nach der Solubilisierung durch unterschiedliche Detergentien in kommerziell erhältlichen ELISA-Systemen, die entweder das Nichtstrukturprotein 3 bzw. das Hüllprotein E^{ms} (allein oder in Kombination) nachweisen.

3.4.1 Solubilisierung der Antigene

Zur Freisetzung der BVDV-Antigene aus dem eingetrockneten Ohrgewebe wurden verschiedene Detergentien eingesetzt und verglichen. Aufgrund der chemischen Struktur und den damit einhergehenden Eigenschaften wurde eine möglichst breite Auswahl getroffen, welche in Tabelle 4 dargestellt ist. Anhand der hydrophilen Gruppe wurde zwischen ionischen, zwitterionischen und nicht ionischen Seifen unterschieden. Beim hydrophoben Anteil wurde zwischen Phenylderivaten, aliphatischen Ketten und Steroidgerüsten differenziert.

Tab. 4: Zur Solubilisierung der BVDV-Antigene verwendete Detergentien und ihre Einteilung nach dem chemischen Aufbau

Detergens	hydrophile Gruppe	hydrophobe Gruppe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	ionisch	aliphatische Kette
Deoxycholol		Steroidgerüst
EMPIGEN BB[®] (n-Dodecyl-N,N-Dimethylglycin)	zwitterionisch	aliphatische Kette
CHAPS (3-[(N-3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-Propansulfonat)		Steroidgerüst
Triton X100 (Octylphenyl-Polyethylenglykol) Nonidet P-40 (Octylphenyl-Polyethylenglykol)	nicht ionisch (Polyethylenoxid)	Phenylderivat
Tween 20 (Polyethoxysorbitanlaurat)		aliphatische Kette
Tween 80 (Polyethoxysorbitanoleat)		
OGP (Octyl-β-D-Glukopyranosid)	nicht ionisch (Zucker)	aliphatische Kette
Digitonin		Steroidgerüst

Zur Ermittlung eines geeigneten Standard-Detergens für die nachfolgenden Versuche, wurden die Seifen auf ihre Kompatibilität mit den verschiedenen ELISA-Tests und auf ihr Potenzial zur Solubilisierung beider Antigene (NS3 und E^{ms}) untersucht. Hierfür wurden mit den Detergentien und PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ Solubilisierungspuffer in unterschiedlichen Konzentrationen (w/v bei kristallinen Stoffen bzw. v/v bei Lösungen) hergestellt.

Zur AG-Freisetzung wurden die Proben in ein 1,5ml Reagiergefäß gegeben und zusammen mit 600µl (500µl bei Leukozytenpellets) des Solubilisierungspuffers für 4h bei 23°C (±2°C) inkubiert. Der Überstand wurde anschließend für die Testung im ELISA verwendet.

Als Standard-Puffer für die folgenden Versuche zum Einfluss probenintrinsicischer BVDV-Antikörper und der Bedeutung ausgewählter Umwelteinflüsse auf den AG-Nachweis wurde 1%iges Triton X100 verwendet.

3.4.2 Verwendete ELISAs

Alle zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung in Deutschland nach § 17c TierSG für die BVDV-Diagnostik zugelassenen und kommerziell erhältlichen AG-ELISAs wurden in dieser Arbeit berücksichtigt. Tabelle 5 gibt einen detaillierten Überblick. Die Ergebnisse der verschiedenen Tests werden im Weiteren anonymisiert dargestellt. Den NS3-ELISAs werden zufällig die Kennungen Ep80-1, Ep80-2 und Ep80-3 zugeordnet. Die verbleibenden AG-ELISAs, die das E^{ms} allein oder in Kombination mit anderen Antigenen nachweisen, werden im Folgenden als EE-1, EE-2, EE-3 und EE-4 bezeichnet.

Tab. 5: Zum BVDV-Antigen- und Antikörper-Nachweis verwendete ELISA-Systeme

ELISA	Analyt (Herstellerangaben)	Zugelassenes Probenmaterial	Hersteller
Ceditest® BVDV	Antikörper gegen NS3	Serum, Plasma und Milch	Cedi Diagnostics B.V.
Ceditest® BVDV-Ag	NS3	Leukozyten	
CheKit BVD-Virus-III	E ^{ms}	Blutserum, -plasma und Vollblut	Bommeli Diagnostics
ELISA BVD/MD Antigen Mix	NS2/3 und E ^{ms}	Serum, Plasma, Vollblut, Leukozyten und Blutgerinnsel	Institut Pourquier
ELISA BVD/MD P80 Antigen	p80 (=NS3)	Leukozyten	
HerdChek BVDV Antigen/Leukozyten	BVDV-spezifisches Antigen (polyklonaler Test)	Leukozyten, Organe, Zellkulturen und Nasentupfer	Idexx Laboratories
HerdChek BVDV Antigen/Serum Plus	E ^{ms}	Serum, Plasma, Vollblut und Ohrgewebe-Stanzproben	
Serelisa™ BVD p80 Ag Mono Indirect	p80/125 (=NS2/3)	Serum, Plasma, Vollblut, Leukozyten, Gewebeextrakte und Ohrgewebeproben	Synbiotics Corporation

3.4.3 Durchführung der ELISAs

Die Probenüberstände (vgl. 3.4.1) wurden unverdünnt und in log₄-Verdünnung (bis 1:64 bei Ohrstanzproben bzw. bis 1:16 bei Leukozyten, in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺) getestet. Um ein möglichst zeitgleiches Aufbringen auf die ELISA-Platte zu gewährleisten, wurden die einzelnen Proben zunächst in eine 96-Loch-U-Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert und anschließend mit einer Mehrkanalpipette (Süd-Laborbedarf) auf die ELISA-Platte verbracht. Die weitere Durchführung der ELISAs erfolgte nach Herstellerangaben. Die Messung der Optischen Dichte (OD)-Werte erfolgte mit einem *Sunrise Touchscreen* (Tecan) Photometer und der Software *Magellan* (Tecan). Eine Korrektur der OD-Werte erfolgte, falls vorgeschrieben, nach Herstellervorgaben.

3.4.4 Auswertung

Für jede Probe wurden die gemessenen OD-Werte gegen die Verdünnung aufgetragen, woraus sich die jeweilige Titrationskurve ergab. Die Verdünnung am Schnittpunkt dieser Kurve mit dem vom jeweiligen Hersteller festgelegten *cut off* (positive Freigabegrenze) wurde als Antigen-Titer (AG-Titer) definiert. Fällt dieser Wert in einen Bereich, der nicht durch die Probenverdünnung abgedeckt ist (für Ohrstanzproben >64 und <1), wurde der AG-Titer in den Bereichen 0,5 bis 1 und 64 bis 128 aus dem Kurvenverlauf graphisch extrapoliert. AG-Titer außerhalb wurden mit <0,5 bzw. >128 angegeben. Für den Fall, dass keine relevante Testreaktion bezüglich OD-Wert und Kurvenverlauf zu erkennen war, wurde der Titer mit 0 angegeben. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte auf Grundlage des AG-Titers. Neben Minimum (Min.), Maximum (Max.) und arithmetischem Mittel (Mittel) wurden bei homologen Probenserien die Standardabweichung (STD) und der Variationskoeffizient (VK=STD/Mittel) als Kennziffern der Streuung angegeben. Die statistische Prüfung erfolgte anhand der STUDENT-Verteilung (t-Test). Signifikante Unterschiede lagen vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p \leq 0,05$) lag.

3.5 Real time RT-Polymerase Chain Reaktion (real time RT-PCR)

Der Nachweis des BVDV-Genoms im Ohrgewebe erfolgte nach Freisetzung und Isolierung der RNA durch *real time* RT-PCR. Um Kreuzkontaminationen möglichst auszuschließen, wurde ein *one-step* RT-PCR-Protokoll durchgeführt (vgl. 3.5.3). Die dabei nachgewiesene RNA-Sequenz liegt in einer genetisch stark konservierten Region des BVDV-Genoms, der 5'UTR. Die Arbeitsschritte der RNA-Freisetzung, der RNA-Isolierung, der Herstellung des Mastermix und das Ansetzen der PCR-Reaktion wurden räumlich und arbeitstechnisch getrennt durchgeführt. Als Messgerät wurde das *GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System* (PE Applied Biosystems) verwendet.

3.5.1 Freisetzung der BVDV-RNA

Um eine zufriedenstellende Freisetzung der BVDV-RNA aus den getrockneten Ohrstanzproben zu ermöglichen, wurden zwei verschiedene Methoden verglichen.

Enzymatischer Verdau mit Hilfe von Proteinase K

Einzelne Proben wurden zusammen mit 400µl einer Proteinase K-Lösung (9ml 0,25M EDTA [pH7], 1ml 10%iges SDS und 2mg Proteinase K) in ein 1,5ml Reagiergefäß gegeben und 1h bei 56°C in einem Thermomixer (ca. 400rpm) inkubiert. Aus dem Überstand wurde die RNA mit dem High Pure Viral RNA Kit (Roche) isoliert (vgl. 3.5.2).

Mechanische Freisetzung mit Hilfe einer Laborschwingmühle

Eine Stanzprobe, eine Stahlkugel (Durchmesser 5mm) und eine Pufferlösung (Menge und Art abhängig vom verwendeten RNA-Isolierungskit, vgl. Tabelle 6) wurden in ein 2ml Reagiergefäß gegeben. Mittels des zugehörigen Racks wurden die Gefäße in eine Laborschwingmühle (Retsch) eingespannt und darin in Schwingung versetzt. Hierdurch wurde das enthaltene Gewebe durch die immer wieder aufprallende Stahlkugel zerkleinert und homogenisiert. Das entstandene Gewebe-Puffer-Gemisch wurde für die RNA-Isolierung verwendet.

Um eine optimale Ausbeute an RNA zu erhalten, wurden verschiedene RNA-Aufreinigungskits und deren individuelle Pufferlösungen in Kombination mit der Schwingmühle (in verschiedenen Einstellungen) getestet. Als Standardeinstellung der Laborschwingmühle wurde in den anschließenden Versuchen 2min bei 25Hz verwendet.

3.5.2 Isolierung der BVDV-RNA

Um die BVDV-RNA aus den Probenansätzen zu gewinnen, wurden verschiedene kommerziell erhältliche RNA-Isolierungskits verwendet und verglichen (vgl. Tabelle 6). Darunter sind Produkte, die auf dem Prinzip der Guanidiniumthiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion beruhen, die die RNA über Bindung an eine Silica-Membran isolieren oder die beide Methoden kombinieren. Die Durchführung der RNA-Extraktion erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers. Als Puffer für die Homogenisierung in der Schwingmühle wurde der jeweilige im Isolierungskit enthaltene Binde- oder Lysispuffer verwendet (vgl. Tabelle 6). Die RNA-Eluate wurden bis zur Testung auf Eis gelagert.

Als Standardmethode für die anschließenden Versuche zum Einfluss probenintrinsic BVDV-Antikörper und der Bedeutung ausgewählter Störeinflüsse auf den RNA-Nachweis wurde die mechanische Bearbeitung in der Laborschwingmühle in Kombination mit dem RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit (300µl RLT-Puffer) verwendet. Der vom Hersteller vorgeschriebene Proteinase K-Schritt dieses Kits wurde modifiziert. Bei Probenvolumina >200µl wurden 600µl Proteinase K-Lösung (590µl H₂O + 10µl Proteinase K) zugesetzt, bei Volumina <200µl wurden nur 300µl (295µl H₂O + 5µl Proteinase K) der Lösung verwendet. Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte ansonsten nach Herstellerangaben.

Tab. 6: RNA-Isolierungskits und die zur Gewebekomogenisierung verwendeten Puffer

Hersteller	RNA-Isolierungskit	Puffer/Menge
Roche	High Pure RNA Isolation Kit High Pure Viral RNA Kit High Pure RNA Tissue Kit	Lysis/Binding Buffer; 400µl Binding Buffer; 400µl Binding Buffer; 400µl
Qiagen	RNeasy [®] Mini Kit RNeasy [®] Fibrous Tissue Mini Kit RNeasy [®] Lipid Tissue Mini Kit	RLT; 300 µl RLT; 300 µl QIAzol; 1ml
peqLab	peqGold TriFast [™]	peqGold TriFast; 1ml

3.5.3 Verwendete PCR-Systeme und Durchführung der PCR

Zum Nachweis der isolierten BVDV-RNA wurden zwei verschiedene *real time* RT-PCR-Systeme (TaqMan) vergleichend getestet. Als Plattform für die *one-step* RT-PCR wurde in beiden Fällen der QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit (Qiagen) verwendet. Die Zusammensetzung des jeweiligen Mastermix und das verwendete Temperaturprofil sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

„Pesti“-PCR (Gaede *et al.*, 2005)

Dieses System setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Die Primer wurden erstmals von HYNDMAN für eine *nested* PCR beschrieben (Hyndman *et al.*, 1998). Die Sonde wurde von REITING entwickelt (Gaede *et al.*, 2005). Primer und Sonde wurden von der Operon Biotechnologies GmbH (Köln) bezogen. Tabelle 7 stellt die verwendeten Primer und die Sonde im Detail dar.

Tab. 7: Primer und Sonde der "Pesti"-PCR

	Bezeichnung	Sequenz
Forward Primer	Pesti3	5'-CCT GAG TAC AGG RTA GTC GTC A-3'
Reverse Primer	Pesti4	5'-GGC CTC TGC AGC ACC CTA TCA-3'
Sonde	TQ-Pesti	Fam-TGC YAY GTG GAC GAG GGC ATG C-Tamra

„Panpesti-System 1.1“ (PP1.1) (Hoffmann *et al.*, 2006)

Für die Versuche wurde von Dr. Hoffmann/Friedrich-Loeffler-Institut freundlicher Weise ein fertiger Primer-Sonden-Mix zur Verfügung gestellt. Tabelle 8 stellt die im Mix enthaltenen Primer und Sonde dar. Die Sonde entspricht der der „Pesti“-PCR, mit der Modifikation, dass hier ein *Black-hole-quencher* verwendet wurde. Der *Forward* Primer ist eine Entwicklung von HOFFMANN (Hoffmann *et al.*, 2006), der *Reverse* Primer wurde von VILCEK beschrieben (Vilcek *et al.*, 1994). Das PP1.1 wurde in den anschließenden Versuchen zum Einfluss probenintrinsic BVDV-Antikörper und der Bedeutung ausgewählter Störeinflüsse auf den RNA-Nachweis als Standard-PCR verwendet.

Tab. 8: Primer und Sonde des "Panpesti-Systems 1.1"

	Bezeichnung	Sequenz
Forward Primer	BVD190-F	5'-GRA GTC GTC ART GGT TCG AC-3'
Reverse Primer	V326	5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3'
Sonde	TQ-Pesti	Fam-TGC YAY GTG GAC GAG GGC ATG C-BHQ1

Tab. 9: Reaktionsansatz und Temperaturprofil der verwendeten RT-PCR-Assays

	„Panpesti-System 1.1“	„Pesti“-PCR
Reaktionsansatz	20µl Mastermix/5µl Probe	15µl Mastermix/5µl Probe
Mastermix		
RT-PCR Master Mix	12,5µl	10 µl
RNase-free water	5,25µl	2,4µl
RT Mix	0,25µl	0,2µl
Primer/Sonden	2µl Primer-Sonden-Mix	0,8µl Pesti3 (10pmol/µl) 0,8µl Pesti4 (10pmol/µl) 0,8µl TQ-Pesti (4pmol/µl)
Temperaturprofil	1x	
Reverse Transkription	30min bei 50 °C	
Enzymaktivierung	15min bei 95 °C	
	42x	45x
Denaturierung	30sec bei 95 °C	30sec bei 94 °C
Annealing/Extension	1min bei 57 °C 1min bei 68 °C	1min bei 60 °C

Der Mastermix wurde auf Eis in einem 1,5ml Reagiergefäß angefertigt und kurz geschüttelt (Vortex). Jeweils 15 bzw. 20µl wurden in ein *MicroAmp[®] Optical Tube* (Applied Biosystems) gegeben. Nach Zugabe von 5µl des RNA-Eluates wurden die *Tubes* mit *MicroAmp[®] Optical Caps* (Applied Biosystems) verschlossen und in das *GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System* eingesetzt. Die PCR wurde nach dem in Tabelle 9 dargestellten Temperaturprotokoll durchgeführt. Die Messung der Reporter-Fluoreszenz erfolgte in der Extensionsphase.

3.5.4 Pooluntersuchungen

Für die Massendiagnostik ist die Einzeluntersuchung von Ohrgewebeproben ein erheblicher Kostenfaktor. Daher wurde der Möglichkeit der Untersuchung von gepoolten Proben nachgegangen. Die Poolung erfolgte auf Ebene der Homogenate nach der Probenbearbeitung mit der Laborschwingmühle (vgl. 3.5.1). Von Einzelproben der Tiere **B**, **C**, **D**, **E**, **I**, **K**, **KB11** und **KB18** wurden mit 300µl RLT-Puffer Gewebhomogenate hergestellt. Von jedem Ansatz wurden zwei Aliquots zu je 100µl gewonnen. Aus einem Aliquot wurde die BVDV-RNA nach Standardprotokoll (vgl. 3.5.2) isoliert und als Kontrolle verwendet. Das zweite Aliquot wurde in einem Pool getestet. Hierfür wurden Homogenate aus Ohrstanzen von BVDV-freien Rindern (vgl. 3.1.3) hergestellt. Je ein Probenaliquot (100µl) aus den Ohrstanzen der PI Tiere wurde mit 900µl BVDV-freiem Homogenat vermengt. Aus diesem Gemenge wurde anschließend die RNA isoliert (vgl. 3.5.2). Die RNA-Eluat der gepoolten und der ungepoolten Probe wurden vergleichend in der *real time* RT-PCR getestet.

Um die Haltbarkeit der BVDV-RNA im Probenhomogenat zu überprüfen, wurden Homogenate von Ohrstanzen der oben aufgeführten Tiere hergestellt. Von jedem Ansatz wurden zwei Aliquots zu je 100µl gewonnen. Ein Ansatz wurde sofort bearbeitet (vgl. oben), beim zweiten wurde das Homogenat für 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt und anschließend die RNA isoliert und in der PCR getestet.

3.5.5 Auswertung

Nach Abschluss der PCR erfolgte die Auswertung mittels *GeneAmp*[®]-Software (PE Applied Biosystems). Der Vergleich der Proben erfolgte auf Basis des *threshold cycle* (Ct-Wert). Der *threshold* wurde zu Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation festgelegt. Die *Baseline*-Korrektur erfolgte automatisch. Der Ct-Wert ist jener PCR-Zyklus, an dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Bei homologen Probenreihen wurden Minimum (Min.), Maximum (Max.) und arithmetisches Mittel (Mittel) sowie als Kennziffern der Streuung die Standardabweichung (STD) und die Spanne (R) zwischen dem kleinsten und größten Ct-Wert angegeben. Die statistische Prüfung erfolgte anhand der STUDENT-Verteilung (t-Test). Signifikante Unterschiede lagen vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p \leq 0,05$) lag.

4. Ergebnisse

Zunächst erfolgt die Darstellung der Ergebnisse zur Nachweisbarkeit der BVDV-Antigene in getrockneten Ohrstanzproben mittels *Antigen-Capture-ELISA*. Im Anschluss daran werden die Resultate zum RNA-Nachweis mittels *real time RT-PCR* beschrieben. In beiden Abschnitten wird gezeigt, welchen Einfluss die Art der Freisetzung des jeweiligen Analyten und das Testverfahren an sich auf die Sensitivität des BVDV-Nachweises haben. Die Bedeutung probenintrinsic kolostraler Antikörper auf die BVDV-Detektion im Ohrgewebe sowie die Auswirkungen verschiedener Umweltfaktoren auf die gewonnenen Stenzen werden jeweils im Anschluss dargestellt.

4.1 *Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*

Der Nachweis der BVDV-Antigene erfolgte mittels kommerziell erhältlicher ELISAs. Diese lassen sich in Testsysteme unterteilen, die ausschließlich das Nichtstrukturprotein 3 nachweisen oder das Hüllprotein E^{ms}, allein oder in Kombination mit anderen Antigenen, detektieren (vgl. 3.4.2).

4.1.1 *Solubilisierung der BVDV-Antigene mittels Detergentien*

Die Freisetzung der BVDV-Antigene aus dem Ohrgewebe erfolgte durch Solubilisierung mittels verschiedener Detergentien. Um für die weitergehenden Untersuchungen ein einheitliches „Standard“-Detergens zu finden, das die nachzuweisenden BVDV-Antigene zufriedenstellend freisetzt und die Detektion im ELISA nicht stört, wurde eine Reihe verschiedener Seifen mit unterschiedlichem chemischem Aufbau getestet und verglichen (vgl. 3.4.1).

Kompatibilität verschiedener Detergentien mit dem AG-Nachweis im ELISA

Zur Prüfung der Verträglichkeit der einzelnen Seifen mit dem AG-Nachweis im ELISA wurden standardisierte Leukozytenpellets eines adulten PI Tieres (vgl. 3.2.1) mit den Detergentien inkubiert und die Überstände in den ELISAs getestet. Die Leukozyten enthalten große Mengen an BVDV-Antigen, das sich zudem im Vergleich zum Ohrgewebe leicht und homogen freisetzen lassen sollte. Die erzielten Ergebnisse lassen daher auf die Kompatibilität der Seifen mit dem jeweiligen Test bzw. Antigen schließen. In den Abbildungen 1 und 2 sind die Titrationskurven bei der Verwendung von ionischen und zwitterionischen bzw. nicht ionischen Detergentien vergleichend im NS3-ELISA Ep80-1 und im E^{ms}-ELISA EE-3 dargestellt.

Ergebnisse

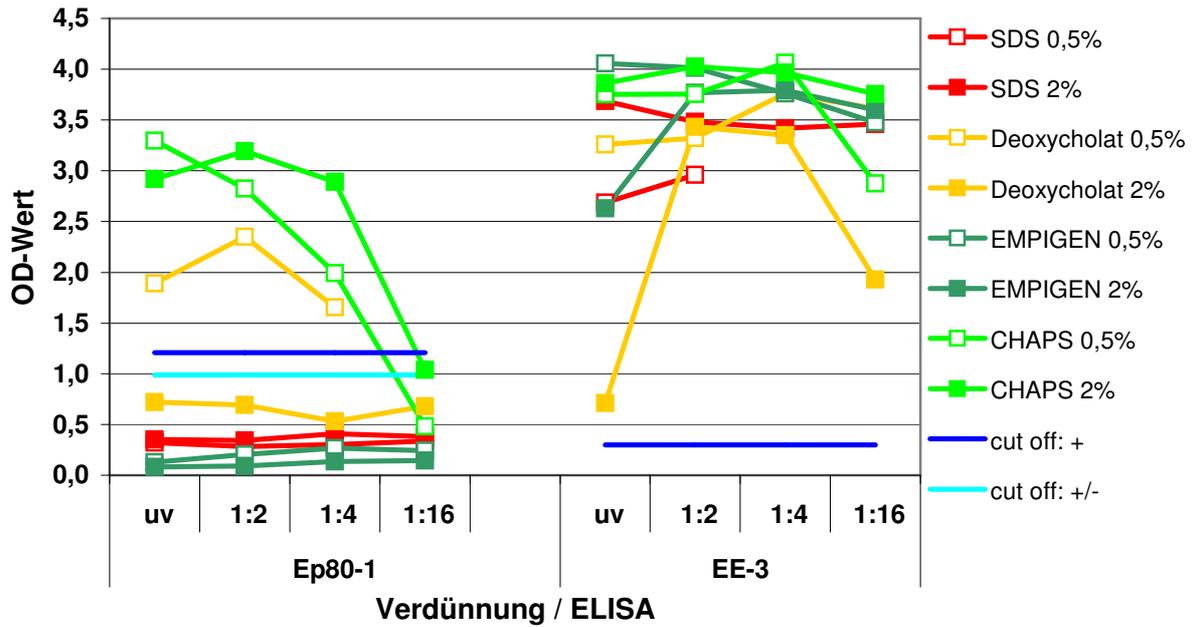


Abb. 1: Kompatibilität ionischer und zwitterionischer Detergentien mit dem AG-Nachweis aus Leukozyten im NS3-ELISA Ep80-1 und im E^{ms}-ELISA EE-3 (Darstellung der Titrationskurven)

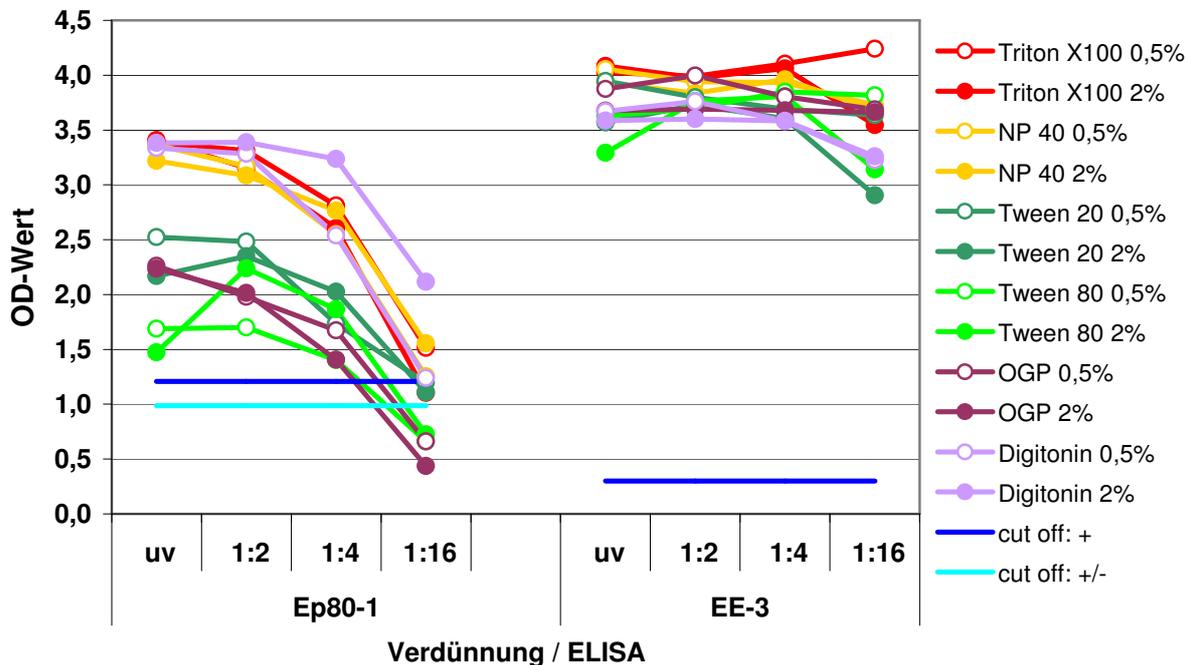


Abb. 2: Kompatibilität nicht ionischer Detergentien mit dem AG-Nachweis aus Leukozyten im NS3-ELISA Ep80-1 und im E^{ms}-ELISA EE-3 (Darstellung der Titrationskurven)

Die erzielten AG-Titer für die unterschiedlichen Seifen und ELISAs sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Bei der Verwendung des ionischen Detergens SDS konnte das BVDV mittels NS3-ELISA nicht erkannt werden. Bei den E^{ms}-Tests konnte in manchen Fällen beobachtet werden, dass die unverdünnte Probe deutlich niedrigere OD-Werte (teilweise unter dem *cut off*) erzielte als die folgenden Verdünnungen. Ein ähnliches konzentrationsabhängiges Verhalten konnte auch bei Deoxycholat festgestellt werden, wobei der NS3-Nachweis weniger inhibiert wurde. Die zwitterionischen Seifen EMPIGEN und CHAPS erbrachten in den E^{ms}-ELISAs maximale Ergebnisse. Ersteres führte jedoch bei den NS3-ELISAs fast ausschließlich zu negativen Resultaten. Auch alle nicht ionischen Tenside erzielten bei der E^{ms}-Detektion höchste AG-Titer. Diese Detergentien waren auch mit den NS3-ELISAs kompatibel, wobei die Polyethylenoxide Triton X100 und Nonidet P-40, sowie das Digitonin zum Teil besonders hohe Werte erzielten.

Tab. 10: Kompatibilität verschiedener Detergentien mit dem AG-Nachweis in Leukozyten mittels ELISA (Darstellung der AG-Titer)

Detergens	Antigen-ELISA						
	Ep80-1	Ep80-2	Ep80-3	EE-1	EE-2	EE-3	EE-4
SDS 0,5%	0	0	0	>32*	>32	k. E.	2,8*
SDS 2%	0	0	0	0	23,0*	>32	>32
Deoxycholat 0,5%	6,7	2,4	8,6	>32*	18,0	>32	8,0
Deoxycholat 2%	0	<0,5	7,7	>32*	20,0*	>32*	8,7*
EMPIGEN 0,5%	0	0	1,2	>32	>18	>32	>32
EMPIGEN 2%	0	0	0	>32	>32	>32*	19,0*
CHAPS 0,5%	8,3	4,7	16,0	>32	>32	>32	17,4
CHAPS 2%	14	6,4	17,4	>32	>32	>32	20,1
Triton X100 0,5%	21,6	k. E.	26,4	>32	>32	>32	21,8
Triton X100 2%	14,4	2,1	21,7	>32	>32	>32	18,4
NP 40 0,5%	16,7	5,3	>32	>32	>32	>32	17,9
NP 40 2%	23,4	5,7	>32	>32	>32	>32	20,6
Tween 20 0,5%	15,6	6,8*	27,4	>32	>32	>32	>32
Tween 20 2%	13,2	5,0*	20,1	>32	>32	>32	17,4
Tween 80 0,5%	6,4*	4,0*	11,6	>32	21,0	>32	>32*
Tween 80 2%	9,2	4,3*	16,5	>32	>32	>32	>32*
OGP 0,5%	7,7	<0,5	30,7	>32	>32	>32	23,2
OGP 2%	5,2	<0,5	4	>32	>32	>32	25,2
Digitonin 0,5%	16,5	3,0	23,1	>32	>32	>32	21,8
Digitonin 2%	>32	3,9	19,5	>32	>32	>32	23,1

*: Die unverdünnte Probe ergab einen deutlich niedrigeren OD-Wert als die erste Verdünnung.
k. E.: aus technischen Gründen kein Ergebnis

Potential ausgewählter Detergentien zur AG-Freisetzung aus Ohrstanzproben

Für die Prüfung des Potentials zur Solubilisierung von Antigenen aus Ohrstanzen wurde, mit Ausnahme der ionischen Detergentien, je ein Vertreter (CHAPS, Triton X100, Tween 20, OGP und Digitonin) der untersuchten Tensid-Klassen gewählt. Je Detergens wurden sechs Proben eines PI Tieres (A2) in den ELISAs Ep80-1, EE-1, EE-2 und EE-3 getestet. Die Angaben zu den resultierenden AG-Titern sind in Tabelle 11 ersichtlich.

Tab. 11: Vergleich der AG-Solubilisierung aus eingetrockneten Ohrstanzproben eines PI Tieres durch ausgewählte Detergentien (Darstellung der AG-Titer, n=6 je Detergens)

ELISA	Detergens (1%)	AG-Titer				
		Min.	Mittel	Max.	STD	VK
Ep80-1	CHAPS	<0,5	10,1	48,0	18,6	184,9%
	Triton X100	2,4	10,3	44,0	16,6	161,6%
	Tween 20	1,1	10,1	37,5	13,9	138,3%
	OGP	1,1	10,2	59,5	21,7	212,8%
	Digitonin	3,2	7,0	13,9	3,5	50,4%
EE-1	CHAPS	73,1	93,6	105,8	12,9	13,8%
	Triton X100	52,9	84,0	96,7	18,9	22,5%
	Tween 20	56,3	77,9	106,4	18,4	23,6%
	OGP	68,6	98,6	125,3	19,8	20,1%
	Digitonin	73,1	85,7	103,1	10,4	12,1%
EE-2	CHAPS	>128	>128	>128	*	*
	Triton X100	110,6	>128	>128	*	*
	Tween 20	111,0	>128	>128	*	*
	OGP	115,5	>128	>128	*	*
	Digitonin	>128	>128	>128	*	*
EE-3	CHAPS	62,0	103,2	>128	33,1	32,0%
	Triton X100	60,9	93,0	125,4	27,2	29,2%
	Tween 20	53,6	79,1	100,2	20,9	26,4%
	OGP	59,5	98,3	>128	32,9	33,5%
	Digitonin	60,7	90,3	>128	23,0	25,5%

*: wegen mehrerer nicht austitrierter Proben keine Angaben zur Streuung;

Beim Vergleich der Detergentien innerhalb eines Tests ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, mit Ausnahme bei ELISA EE-2: hier ergab die Verwendung von Tween 20 im Vergleich zu CHAPS ($p=0,038$) und Digitonin ($p=0,025$) signifikant niedrigere Werte. Bei den E^{fns} -nachweisenden Tests lagen die mittleren AG-Titer zwischen 77,9 und 98,6 (EE-1), >128 (EE-2) und zwischen 79,1 und 103,2 (EE-3). Die Streuung der Ergebnisse war mit Variationskoeffizienten (VK) von 12,1 bis 23,6% (EE-1) und 25,5 bis 33,5% (EE-3) vergleichsweise niedrig. Die niedrigsten AG-Titer einzelner Proben in den verschiedenen Tests lagen noch 52,9fach (EE-1), 110,6fach (EE-2) und 53,6fach (EE-3) über der Freigabegrenze.

Ergebnisse

Die mittleren AG-Titer im NS3-ELISA Ep80-1 lagen in einem Bereich von 7,0 bis 10,3. Auffällig ist dabei die große Streuung der Ergebnisse mit VK von 184,9%, 161,6%, 138,3% und 212,8%. Lediglich bei Proben, die mit Digitonin solubilisiert wurden lag der VK mit 50,4% niedriger. Eine Probe erzielte im NS3-Test einen Wert im negativen Bereich (AG-Titer <0,5 bei der Verwendung von CHAPS), vier weitere Stenzen lagen nur knapp über dem *cut off* (AG-Titer <2 bei der Verwendung von Tween 20 bzw. OGP).

4.1.2 Varianzen und Sensitivität beim AG-Nachweis mittels ELISA

Zur Abklärung der beobachteten großen Varianzen beim NS3-Nachweis wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt. Diese Variabilität könnte AG-bezogen, tierindividuell oder in Abhängigkeit vom verwendeten Detergens bzw. ELISA auftreten.

Jeweils sieben bzw. acht Proben von drei PI Tieren (**B**, **C** und **K**) wurden in Triton X100 (1%) inkubiert und im NS3-Test Ep80-2 und den E^{ms}-ELISAs EE-1 und -3 getestet. Abbildung 3 zeigt die Titrationskurven der verschiedenen Tiere im NS3-Test.

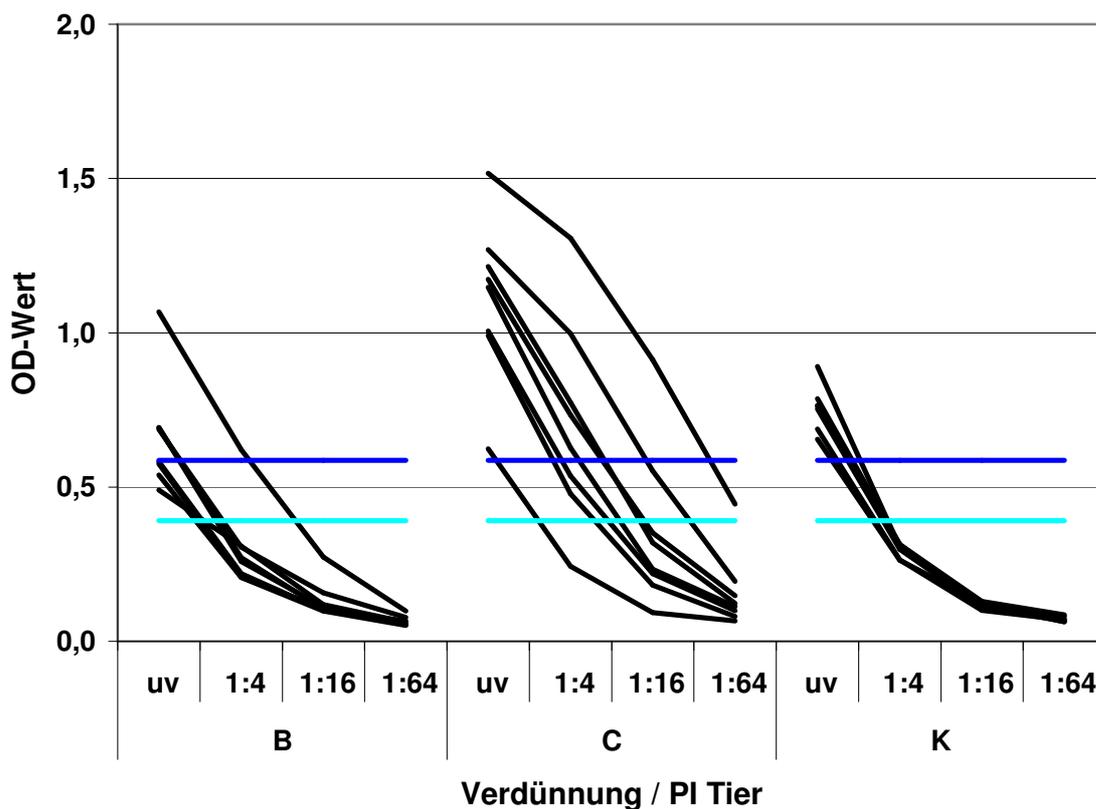


Abb. 3: Vergleich mehrerer Proben von drei verschiedenen PI Tieren (**B**, **C** und **K**) im NS3-ELISA Ep80-2 (Darstellung der Titrationskurven, n=7 bzw. 8)

Die mittleren AG-Titer der PI Tiere **B** (1,5) und **K** (1,7) lagen deutlich niedriger als bei Tier **C** (10,3). Bei Rind **B** lagen vier Proben im fraglichen Bereich. Es fallen Unterschiede in der Streuung der Ergebnisse bei den einzelnen Tieren auf. Die VK haben Werte von 15,6% (**K**), 84,5% (**B**) und 130,2% (**C**). Die gleichen Proben in den ELISAs EE-1 und EE-3 zeigten ein einheitlicheres Bild. Die mittleren AG-Titer bei **B**, **C** und **K** lagen bei 46,9, 74,1 und 62,8 (EE-1) bzw. bei 32,2, 40,3 und 45,3 (EE-3). Die VK lagen zwischen 18,2 und 25,3% (EE-1) bzw. zwischen 9,2 und 24,6% (EE-3). Weitere Proben des Tieres **C** (n=7 bzw. 8) wurden mit Triton X100 (1%) und Digitonin (0,5% und 2%) solubilisiert und in den NS3-ELISAs Ep80-1 und Ep80-2 getestet. Tabelle 12 gibt einen Überblick der Ergebnisse.

Tab. 12: Proben des PI Tieres C im NS3-ELISA unter der Verwendung verschiedener Detergentien (Darstellung der AG-Titer, n=7 bzw. 8 je Detergens)

ELISA	Detergens	AG-Titer				
		Min.	Mittel	Max.	STD	VK
Ep80-1	Triton X100 1%	0,8	12,4	45,6	17,5	141,5%
	Digitonin 0,5%	<0,5	4,4	14,6	5,1	116,3%
	Digitonin 2%	<0,5	4,2	16,8	5,9	139,3%
Ep80-2	Triton X100 1%	0,8	11,5	44,5	16,8	146,8%
	Digitonin 0,5%	0,7	4,1	14,1	4,8	115,7%
	Digitonin 2%	<0,5	4,4	20,7	6,9	156,3%

Die mittleren AG-Titer lagen zwischen 4,2 und 12,4 (Ep80-1) bzw. zwischen 4,1 und 11,5 (Ep80-2). Im ELISA Ep80-1 lagen drei Proben unter dem *cut off* (je Detergens eine Probe), bei Ep80-2 lag zusätzlich eine weitere Probe (Digitonin 2%) unter der positiven Freigabegrenze. Zwischen den einzelnen Seifen innerhalb eines Tests gab es keine signifikanten Unterschiede. Bei der Verwendung aller Detergentien waren hohe VK zu beobachten: Triton X100 (1%) 141,5 und 146,8%, Digitonin (0,5%) 116,3 und 115,7%, Digitonin (2%) 139,3 und 156,3%.

Für den weiteren Vergleich der Sensitivität der Testsysteme wurden Ohrstanzen eines PI Tieres (I) verwendet, bei dem zuvor bereits eine geringe Streuung bei der Detektion beider Antigene beobachtet wurde. Jeweils 7 Proben wurden mit den 1%igen Detergentien Triton X100, Digitonin und CHAPS inkubiert und mit sechs ELISAs getestet. In Tabelle 13 werden die Resultate dargestellt. Bei den NS3-ELISAs lagen die mittleren AG-Titer in Bereichen von 1,8 bis 3,0 (Ep80-1), 1,4 bis 3,7 (Ep80-2) und 2,2 bis 3,3 (Ep80-3). In den ELISAs Ep80-1 und -2 wurde jeweils eine Probe als negativ bzw. fraglich gewertet. Beim Vergleich der Detergentien erzielte CHAPS in allen NS3-ELISAs signifikant und höchst signifikant niedrigere Resultate als Triton X100 und Digitonin (Ep80-1: $p=0,003$ und $0,005$; Ep80-2: $p=0,012$ und $0,041$; Ep80-3: $p=0,006$ und $0,014$). Die VK lagen im Vergleich zu den zuvor dargestellten Ergebnissen bei allen NS3-Tests und bei allen Detergentien auf niedrigem Niveau (Ep80-1: 17,9-46,8%; Ep80-2: 30,1-31,8%; Ep80-3: 13,7-27,1%).

Die E^{ms}-nachweisenden Testsysteme zeigten mittlere AG-Titer von 40,0 bis 46,1 (EE-1), 51,4 bis 67,0 (EE-2) und 32,7 bis 42,9 (EE-3). Signifikante Unterschiede bezüglich der Verwendung verschiedener Detergentien lagen nur im Test EE-2 vor. Hier erzielte CHAPS signifikant höhere Ergebnisse als Triton X100 ($p=0,046$). Die niedrigsten VK zeigten sich bei den CHAPS-behandelten Proben (VK=4,4%, 22,8% und 10,4%), gefolgt von Triton X100 (25,6%, 16,7% und 18,8%) und Digitonin (40,7%, 52,2% und 40,0%).

Tab. 13: Vergleich der Sensitivität verschiedener AG-ELISAs anhand von Proben eines PI Tieres unter Verwendung unterschiedlicher Detergentien (Darstellung der AG-Titer, n=7 je Detergens)

ELISA	Detergens (1%)	AG-Titer				
		Min.	Mittel	Max.	STD	VK
Ep80-1	Triton X100	1,9	3,0	3,6	0,5	17,9%
	Digitonin	1,7	2,8	3,8	0,7	24,3%
	CHAPS	<0,5	1,8	2,9	0,9	46,8%
Ep80-2	Triton X100	1,2	2,5	3,5	0,8	30,5%
	Digitonin	1,4	2,3	3,7	0,7	31,8%
	CHAPS	0,7	1,4	2,0	0,4	30,1%
Ep80-3	Triton X100	2,5	3,3	3,7	0,4	13,7%
	Digitonin	2,3	3,2	3,8	0,5	14,9%
	CHAPS	1,2	2,2	3,0	0,6	27,1%
EE-1	Triton X100	26,5	40,0	57,8	10,3	25,6%
	Digitonin	23,0	42,2	76,7	17,2	40,7%
	CHAPS	43,7	46,1	48,8	2,0	4,4%
EE-2	Triton X100	38,7	51,4	62,1	8,6	16,7%
	Digitonin	23,4	54,3	109,0	28,3	52,2%
	CHAPS	46,2	67,0	89,2	15,3	22,8%
EE-3	Triton X100	29,0	37,3	48,3	7,0	18,8%
	Digitonin	15,6	32,7	53,2	13,1	40,0%
	CHAPS	36,5	42,9	48,6	4,5	10,4%

4.1.3 Einfluss probenintrinsischer BVDV-Antikörper

Maternale Antikörper, die mit dem Kolostrum aufgenommen werden, stellen allgemein das größte Problem bei der Diagnostik neugeborener PI Kälber dar. Naturgemäß betrifft dies insbesondere die AG-Detektion. Um zu untersuchen, inwieweit dies auch für die Ohrstanzdiagnostik zutrifft, wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt.

Auswirkungen zugesetzter kolostraler Antikörper auf den AG-Nachweis

Kolostrale Antikörper, die in Blut und Lymphe des Ohrgewebes enthalten sind, könnten für den AG-Nachweis im ELISA kritisch sein. Um den prinzipiellen Effekt maternaler Antikörper auf die verschiedenen BVDV-Antigene darzustellen, wurden frische Ohrstanzen (n=7 bzw. 8) eines adulten PI Tieres (**I**) in Antikörper (AK)-haltigem Serum eines neugeborenen PI Tieres (**E**) in der kolostralen Phase inkubiert (Serum-Aufnahme etwa 10% des Ausgangsgewichtes), getrocknet und mit den ELISAs getestet (vgl. 3.3.4). Die Abbildungen 4 und 5 zeigen den Vergleich von AK-haltigen und AK-freien Stanzen in einem NS3-ELISA und in einem E^{ms}-Test.

In den beiden NS3-ELISAs Ep80-1 und -2 wurden bei Anwesenheit von Antikörpern ausschließlich negative Ergebnisse erzielt. Die Kontrollstanzen ohne AK-Zusatz erbrachten einen mittleren AG-Titer von 2,1 (Ep80-1) und 1,1 (Ep80-2) mit einem VK von 40,4% und 35,5%. Beim E^{ms}-Nachweis war der neutralisierende Effekt der Antikörper geringer ausgeprägt. In den Tests EE-1 bis -3 lagen die mittleren AG-Titer der AK-freien Proben bei 44,5, 83,2 und 55,1, die der belasteten Stanzen bei 17,7, 41,6 und 23,7. Die Antikörper führten im Vergleich somit im Mittel zu einer Reduktion des AG-Titers um das 2,5fache, 2fache und 2,3fache. Die VK lagen zwischen 31,5 und 39,8% (AK-frei) bzw. zwischen 51,6 und 92,7% (AK-haltig).

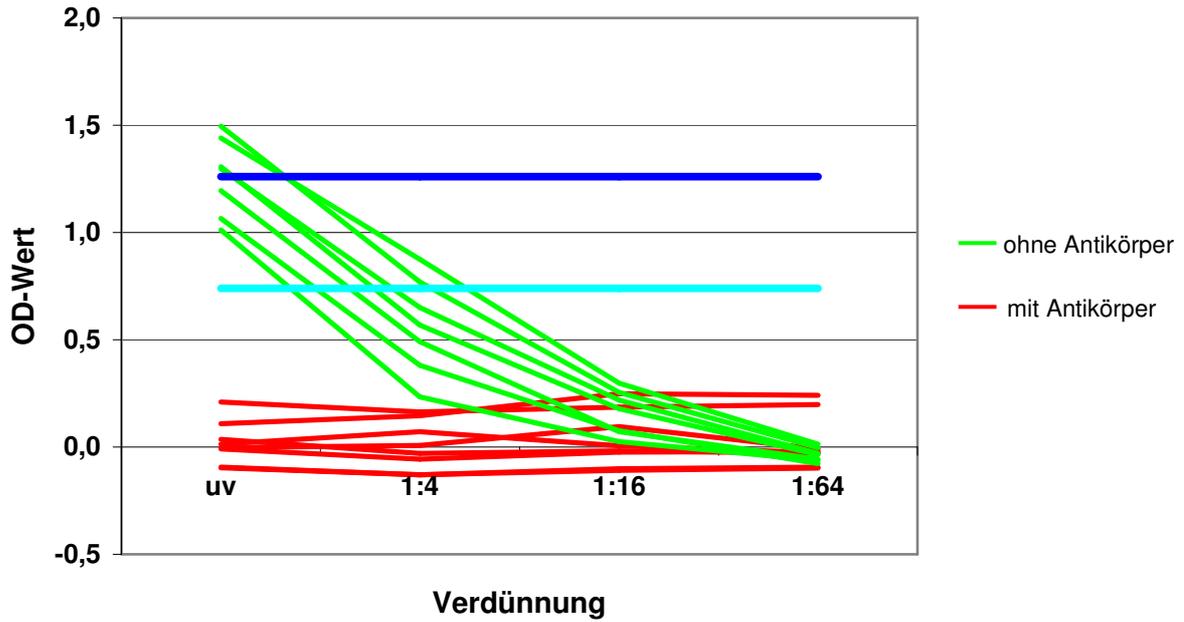


Abb. 4: Einfluss zugesetzter kolostraler Antikörper (1-2 μ l Serum) auf den NS3-Nachweis in Ohrstanzen im ELISA Ep80-2 (Darstellung der Titrationskurven, n=7 bzw. 8)

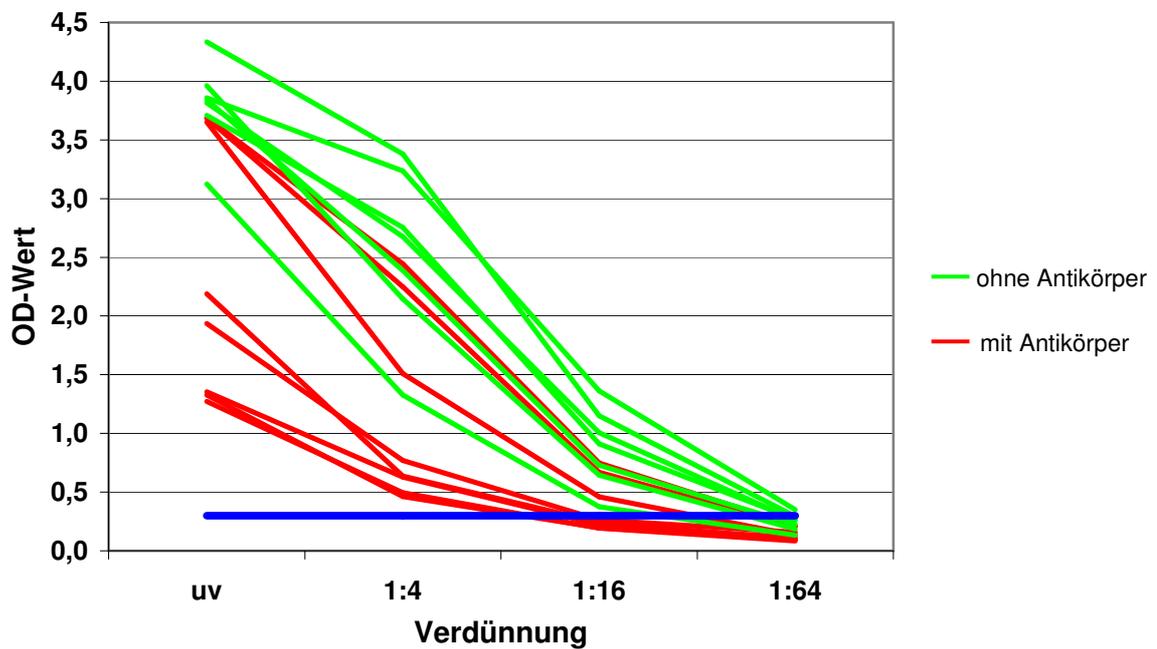


Abb. 5: Einfluss zugesetzter kolostraler Antikörper (1-2 μ l Serum) auf den E^{ms}-Nachweis in Ohrstanzen im ELISA EE-3 (Darstellung der Titrationskurven, n=7 bzw. 8)

Um den Einfluss kolostraler Antikörper näher zu quantifizieren, wurden zu den Stanzen (n=4) eines PI Tieres (I) verschiedene Mengen eines BVDV-Antikörper enthaltenden Serums zugegeben (vgl. 3.3.1). Als maximaler Gehalt an Serum in einer Mikroohrstanze wurden dabei 2µl angenommen, was etwa 1/8 des Stanzgewichts entspricht (vgl. 3.2.2). Die Ansätze wurden in den E^{rms}-ELISAs EE-1 bis -3 getestet. Abbildung 6 zeigt die gemittelten Titrationskurven im Test EE-1, Tabelle 14 stellt die Ergebnisse aller Tests dar.

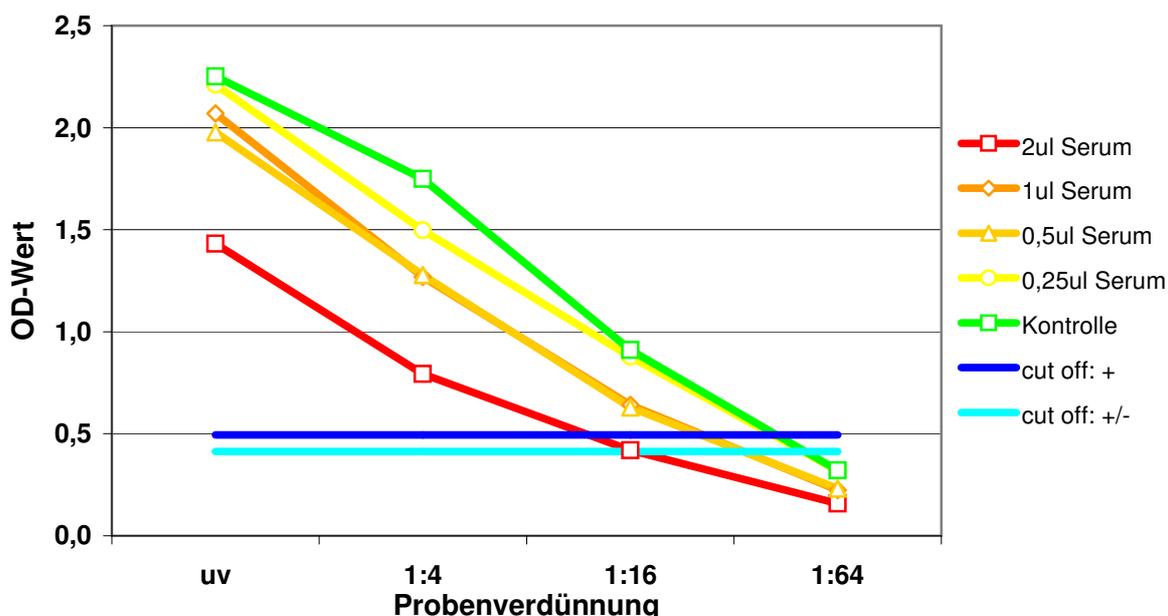


Abb. 6: Einfluss verschiedener Mengen AK-haltigen Serums auf den E^{rms}-Nachweis in Ohrstanzen im ELISA EE-1 (Darstellung der gemittelten Titrationskurven, n=4)

Tab. 14: Einfluss verschiedener Mengen AK-haltigen Serums auf die E^{rms}-Detektion in Ohrstanzen (Darstellung der AG-Titer, n=4)

ELISA	zugegebenes Serum	AG-Titer				
		Min.	Mittel	Max.	STD	VK
EE-1	2µl	3,5	8,1	10,5	3,2	38,6%
	1µl	10,0	19,7	31,3	10,3	52,3%
	0,5µl	9,1	19,4	31,3	10,6	54,3%
	0,25µl	10,0	31,7	44,0	15,2	47,9%
	Kontrolle	22,0	33,7	44,6	9,4	27,7%
EE-2	2µl	70,0	88,5	99,4	14,0	15,8%
	1µl	75,2	90,4	104,2	13,3	14,8%
	0,5µl	83,5	92,9	104,2	10,1	10,9%
	0,25µl	75,2	104,9	124,0	20,9	19,9%
	Kontrolle	73,8	102,0	123,8	20,7	20,3%
EE-3	2µl	11,3	14,4	15,9	2,1	14,4%
	1µl	14,2	22,5	35,6	10,4	46,1%
	0,5µl	14,2	22,6	35,6	10,2	44,9%
	0,25µl	14,2	34,8	44,4	14,2	40,7%
	Kontrolle	18,8	36,3	51,3	13,6	37,4%

In jedem ELISA war ein Abfall des mittleren AG-Titers entsprechend der Zugabe von Antikörpern zu erkennen. Die Reduktion des AG-Titers bei Vergleich zwischen Kontrolle und der maximalen Zugabe von 2µl Serum erfolgte im Mittel um einen Faktor von 6,3 (EE-1), 1,2 (EE-2) und 2,5 (EE-3). Bei maximaler AK-Belastung lagen die niedrigsten AG-Titer von Einzelproben noch 3,5fach (EE-1), 70fach (EE-2) und 11,4fach über dem *cut off*. Die VK betragen zwischen 27,7 und 54,3% (EE-1), zwischen 10,9 und 20,3% (EE-2) und zwischen 14,4 und 46,1% (EE-3).

Ergänzend erfolgte aus den Überständen der AG-Solubilisierung der AK-Nachweis in einem AK-Blocking-ELISA. Die Korrelation zwischen zugesetzter Serummenge und ELISA-Ergebnis ist aus Abbildung 7 ersichtlich.

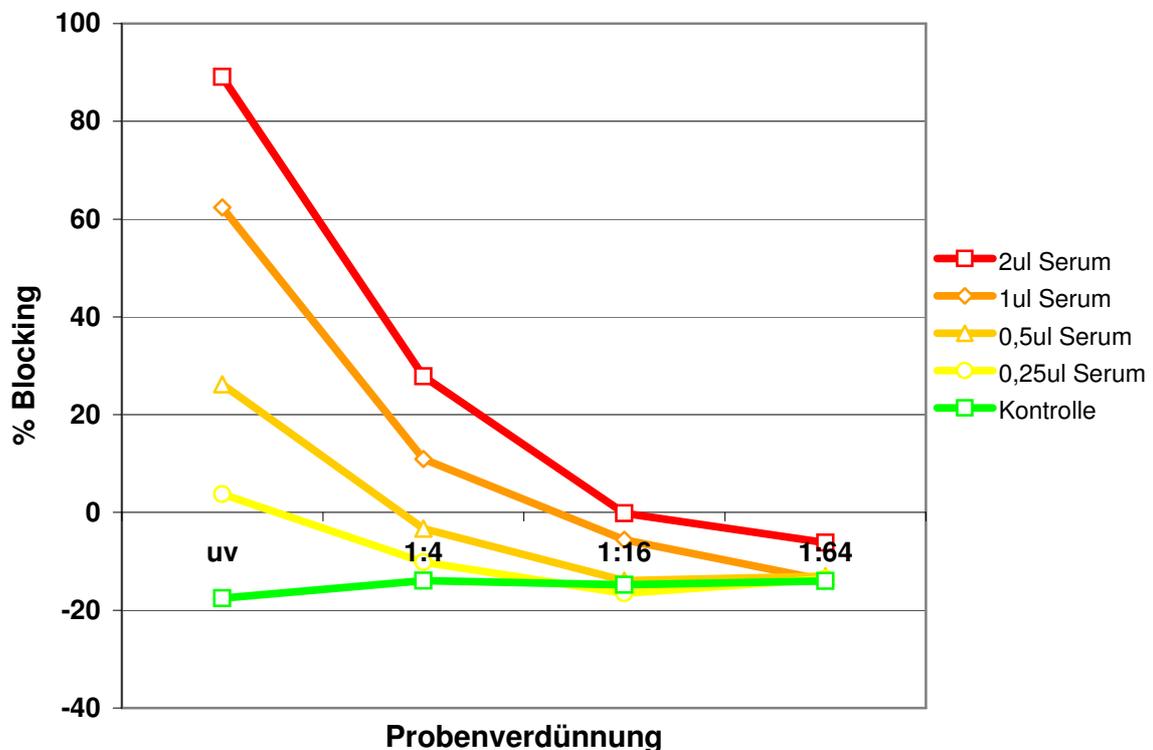


Abb. 7: Nachweis von BVDV-Antikörpern aus den Ohrstanzlysaten nach Zugabe verschiedener Mengen Serums eines PI Tieres in der kolostralen Phase in einem AK-Blocking-ELISA (Darstellung der gemittelten Titrationskurven, n=4)

AG-Nachweis in Ohrstanzproben verschiedener Kälber in der kolostralen Phase

Die Auswirkungen *in vivo*, die maternale Antikörper auf die Ohrstanzdiagnostik während der kolostralen Phase haben, können nur durch Untersuchungen von Kälbern innerhalb der ersten Lebenswochen ausreichend aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit standen Proben von zwölf PI Kälbern mit definierter kolostraler Belastung zur Verfügung (vgl. 3.1.2). Aufgrund der SNT-Titer im Serum zum Zeitpunkt der Probengewinnung bei diesen Tieren, wurden diese für den Vergleich in Gruppen mit hoher (SNT-Titer: >2900), mäßiger (SNT-Titer: 2900 bis 10) und niedriger (SNT-Titer: <10) Antikörperbelastung aufgeteilt.

In Tabelle 15 sind die Resultate aufgeführt, die bei der Untersuchung eines Teils der Tiere in den NS3-ELISAs Ep80-1 und 2 erzielt wurden.

Tab.15: Nachweisbarkeit des NS3 in Ohrgewebeproben verschiedener PI Tiere in der kolostralen Phase (Darstellung der AG-Titer, n=4 bzw. 5)

ELISA	AK-Titer	PI Tier	AG-Titer				
			Min.	Mittel	Max.	STD	VK
Ep80-1	>2900	KB6	0	0	0	-	-
		KB11	0	0	0	-	-
		KB12	0	0	0	-	-
		KB18	0	0	0	-	-
	<10	KB8	12,4	41,3	95,4	36,4	88,2%
Ep80-2	>2900	KB6	0	0	0	-	-
		KB11	0	0	0	-	-
		KB12	0	0	0	-	-
		KB18	0	0	0	-	-
	<10	KB8	6,4	25,3	73,0	27,8	109,9%

Bei keiner Probe eines PI Tieres mit hohem SNT-Titer (**KB6**, **KB11**, **KB12** und **KB18**) konnte in einem NS3-ELISA eine spezifische Reaktion beobachtet werden. Dahingegen konnte das NS3 bei PI Tier **KB8** (ohne relevante AK-Belastung) mit einem mittleren AG-Titer von 41,3 (Ep80-1) und 25,3 (Ep80-2) und einem VK von 88,2 und 109,9% nachgewiesen werden.

Mittels E^{ms} -Nachweis wurden alle zur Verfügung stehenden Tiere getestet. Abbildung 8 zeigt die Darstellung der gemessenen AG-Titer im ELISA EE-2.

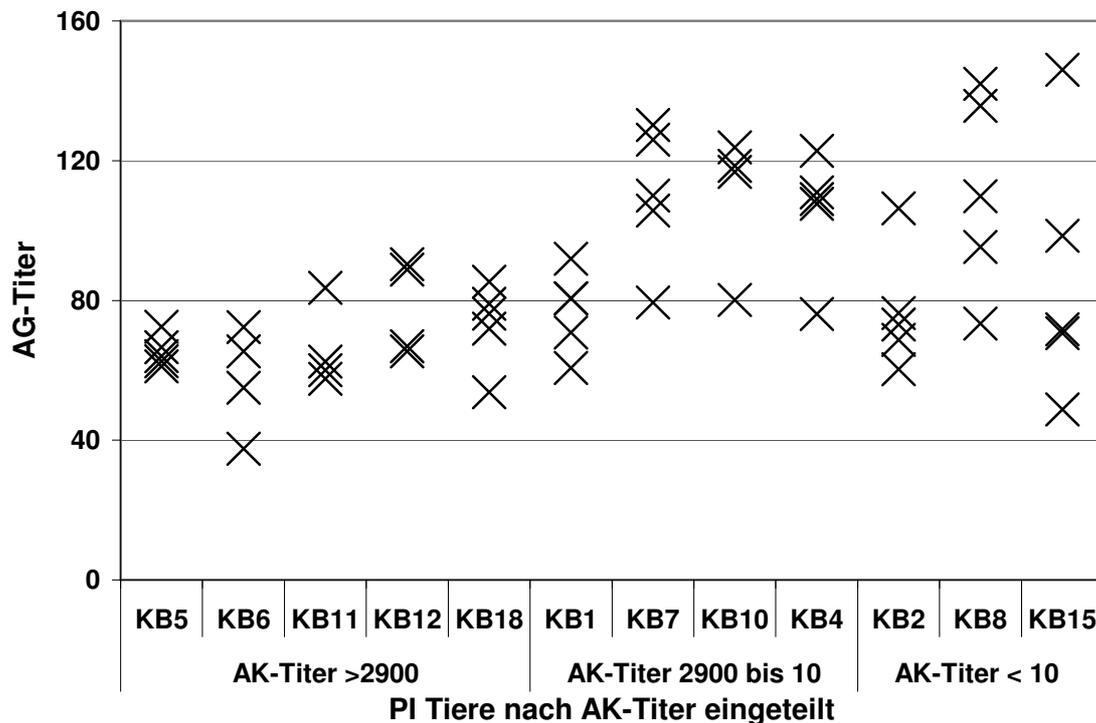


Abb. 8: Nachweis des E^{ms} in Ohrstanzen verschiedener PI Tiere in der kolostralen Phase mittels ELISA EE-2 (Darstellung der AG-Titer, n=4 bzw. 5)

Die Gesamtübersicht der Resultate der E^{ms} -Tests ist in Tabelle 16 wiedergegeben. Jede einzelne Probe wurde in jedem E^{ms} -ELISA sicher als BVDV-positiv erkannt. Die niedrigsten AG-Titer lagen dabei 46,2fach (EE-1), 37,6fach (EE-2) und 13fach (EE-3) über der positiven Freigabegrenze. Die VK lagen zwischen 9,7 und 32,9% (EE-1), zwischen 6,8 und 42,9% (EE-2) sowie zwischen 11,6 und 60,1% (EE-3). Die gemittelten AG-Titer aller Tiere einer Gruppe betragen in den Tests EE-1 bis -3: 76,8, 76,1 und 74,8 (SNT: >2900, n=5); 110,5, 108,8 und 107,9 (SNT: 2900 bis 10, n=4); 100,6, 97,8 und 95,7 (SNT: <10, n=3). Die Unterschiede zwischen den Tieren mit hohem SNT-Titer im Vergleich zu Kälbern mit mäßiger oder niedriger AK-Belastung sind höchst signifikant ($p=0,000$ bis $0,002$ in allen Tests). Zwischen den beiden Gruppen mit SNT-Titer von 2900 bis 10 und <10 gibt es keine signifikanten Unterschiede. Tiere mit mäßiger oder niedriger AK-Belastung erzielten im Vergleich zu hochbelasteten Kälbern in allen Tests im Mittel um 1,4fach oder 1,3fach höhere AG-Titer.

Ergebnisse

Tab. 16: Nachweisbarkeit des E^{tns} in Ohrgewebeproben verschiedener PI Tiere in der kolostralen Phase (Darstellung der AG-Titer, n=4 bzw. 5)

ELISA	AK-Titer	PI Tier	AG-Titer					
			Min.	Mittel	Max.	STD	VK	
EE-1	>2900	KB5	65,9	85,1	96,3	11,5	13,6%	
		KB6	50,8	72,9	107,0	24,0	32,9%	
		KB11	55,4	67,7	82,6	12,8	18,9%	
		KB12	72,4	91,0	113,2	17,4	19,1%	
		KB18	47,3	67,7	89,6	19,3	29,6%	
	2900 - 10	KB1	62,5	84,8	101,2	15,5	18,3%	
		KB7	89,3	112,3	127,8	16,0	14,2%	
		KB10	62,7	116,4	>128	37,1	31,9%	
		KB4	115,3	>128	>128	*	*	
	<10	KB2	87,4	99,3	113,2	9,6	9,7%	
		KB8	91,9	116,9	>128	17,4	14,9%	
		KB15	46,2	85,7	>128	35,6	41,5%	
	EE-2	>2900	KB5	61,1	65,4	72,5	4,5	6,8%
			KB6	37,6	57,6	72,4	15,1	26,3%
			KB11	57,6	65,9	83,6	12,0	18,1%
KB12			65,4	77,9	90,4	13,6	17,4%	
KB18			53,7	70,2	85,3	12,0	17,0%	
2900 - 10		KB1	60,7	76,9	91,9	11,8	15,3%	
		KB7	79,4	110,3	>128	20,1	18,2%	
		KB10	80,1	109,8	123,8	20,0	18,2%	
		KB4	76,1	105,3	122,8	17,4	16,5%	
<10		KB2	60,3	77,0	106,4	17,5	22,8%	
		KB8	73,4	120,7	>128	28,4	23,6%	
		KB15	48,8	87,1	>128	37,3	42,9%	
EE-3		>2900	KB5	23,0	27,9	36,8	5,5	19,6%
			KB6	13,0	30,8	44,8	13,8	44,8%
			KB11	15,9	26,7	50,4	16,0	59,8%
	KB12		47,4	61,7	83,6	15,7	25,5%	
	KB18		15,5	28,1	44,8	12,8	45,6%	
	2900 - 10	KB1	36,7	41,6	47,7	4,8	11,6%	
		KB7	50,9	76,5	98,8	20,9	27,3%	
		KB10	32,4	60,2	77,5	19,4	32,2%	
		KB4	53,2	84,0	96,4	18,5	22,0%	
	<10	KB2	40,8	49,6	57,4	7,1	14,3%	
		KB8	83,1	>128	>128	*	*	
		KB15	39,1	80,3	>128	48,2	60,1%	

*: wegen mehrerer nicht austitrierter Proben keine Angaben zur Streuung

Mit den Überständen der Ohrgewebslysate der verschiedenen PI Tiere wurde zudem der Nachweis BVDV-spezifischer NS3-Antikörper mittels AK-Blocking-ELISA durchgeführt. Abbildung 9 zeigt die gemittelten Titrationskurven (n=4 bzw. 5) für die verschiedenen PI Kälber. Bei den Tieren, die hierbei den höchsten Blocking-Anteil erzielten, wurden auch die höchsten SNT-Titer im Serum gemessen (SNT 2299 und höher). Bei Beibehaltung des vom Hersteller angegebenen *cut off*-Wertes für Serumproben (50%) würden drei der hoch mit Antikörpern belasteten Tiere als negativ gewertet.

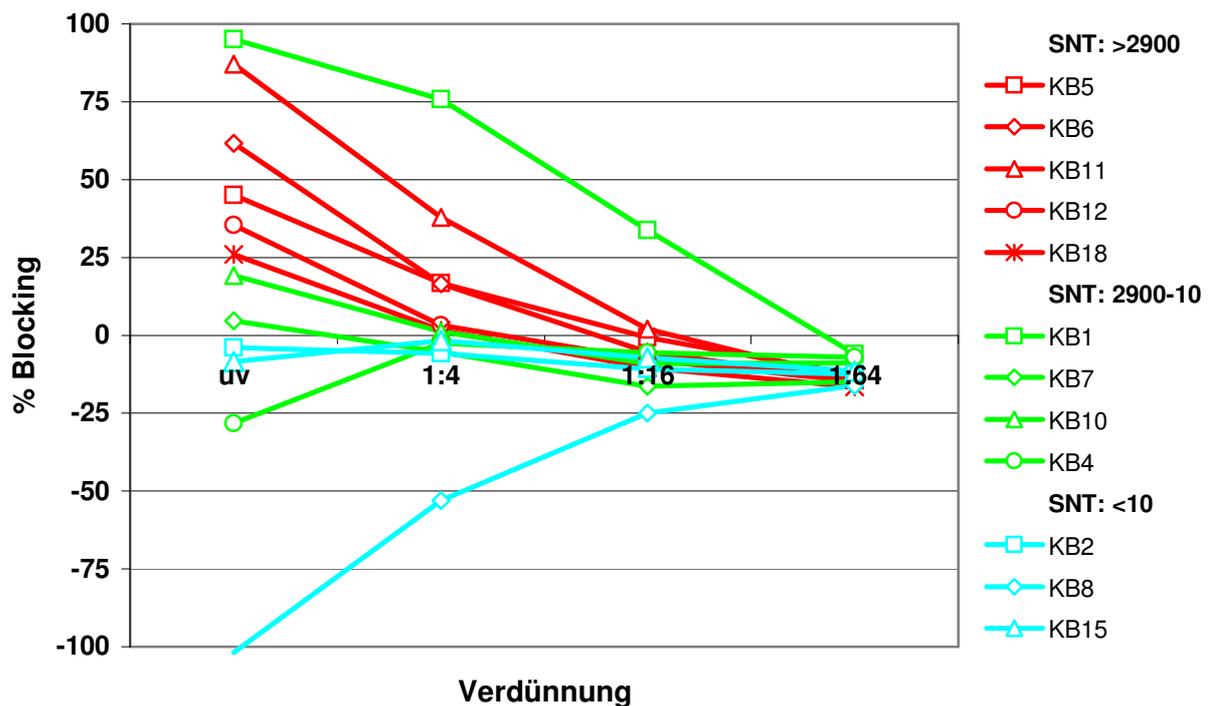


Abb. 9: Nachweis von anti-NS3-Antikörpern in Ohrstanzen verschiedener PI Tiere in der kolostralen Phase im AK-Blocking-ELISA (Darstellung der gemittelten Titrationskurven, n=4 bzw. 5)

Um den Zusammenhang zwischen den im Ohrgewebe nachgewiesenen Antikörpern und den gemessenen AG-Titern der Einzelproben darzustellen, wurde ein einfaches lineares Regressionsmodell angewandt (vgl. Abbildung 10). Bei den verschiedenen ELISAs lauteten die Funktionen: $-0,25 \cdot x + 99,1$ (EE-1), $-0,25 \cdot x + 89,6$ (EE-2) und $-0,45 \cdot x + 68,9$ (EE-3). Das Bestimmtheitsmaß R^2 betrug 0,24 (EE-1), 0,28 (EE-2) und 0,42 (EE-3). Damit lagen in keinem der Tests strenge Korrelationen vor.

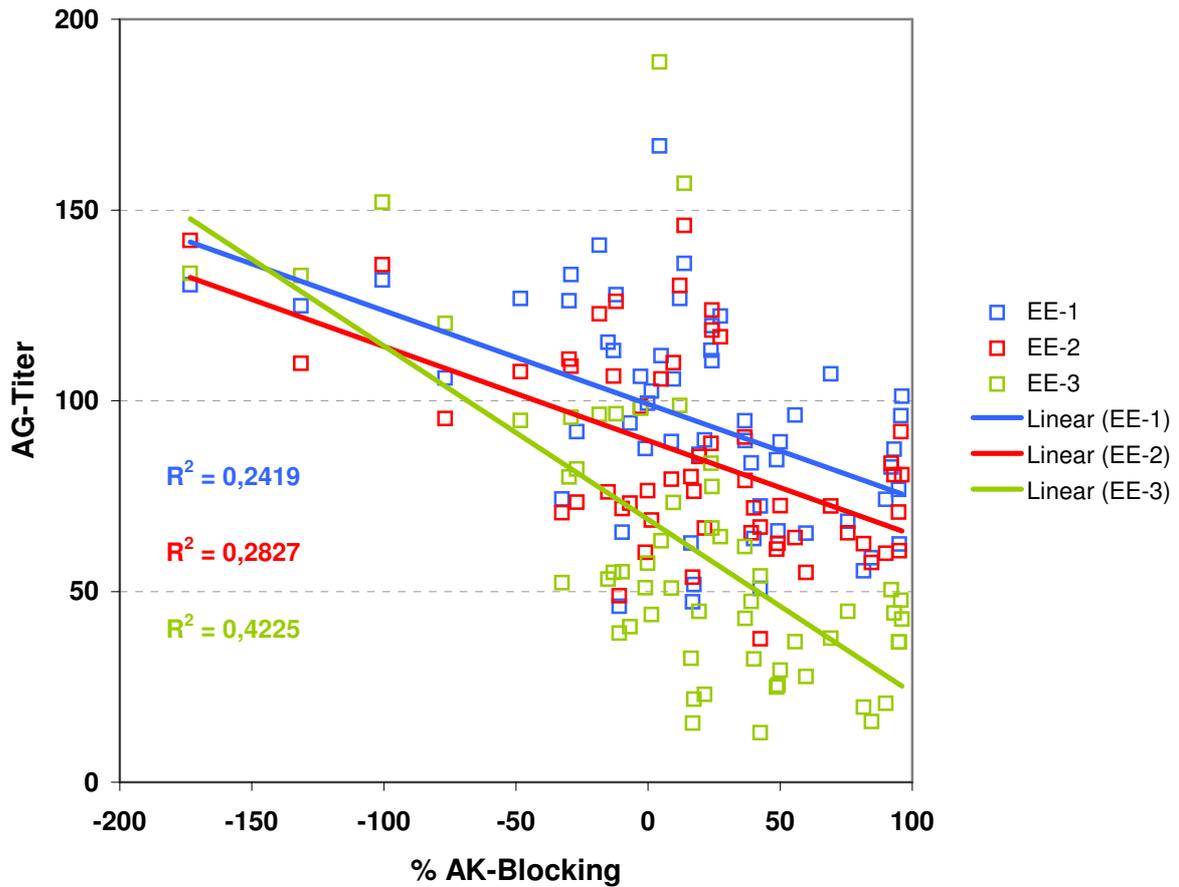


Abb. 10: Lineares Regressionsmodell zur Abhängigkeit des AG-Titers von der nachgewiesenen Antikörpermenge im Ohrgewebe (Darstellung der einzelnen Wertepaare und der linearen Regressionsgerade für die verschiedenen ELISAs)

4.1.4 Auswirkungen ausgewählter Umwelteinflüsse auf den AG-Nachweis im ELISA

Bei der Gewinnung von Ohrstanzen unter Feldbedingungen treten bestimmte Umweltfaktoren auf, die die Nachweisbarkeit der Antigene beeinträchtigen könnten. Für die Detektion der BVDV-Antigene im ELISA wurden der Einfluss verschiedener Lagerungstemperaturen und die Kontamination mit Bakterien an frisch gewonnenen Stanzen untersucht.

Einfluss verschiedener Temperaturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzen auf den AG-Nachweis

Hohe Temperaturen könnten die BVDV-Proteine in frisch entnommenen Ohrstanzproben schädigen und dadurch den Nachweis im ELISA stören. Um dies zu untersuchen, wurden homologe Probenserien des PI Tieres I hergestellt und über einen bestimmten Zeitraum unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt (vgl. 3.3.1). Die Testung der Proben (n=8 je Temperatur) wurde mit den ELISAs Ep80-1 und -2, sowie EE-1 bis -3 durchgeführt. Abbildung 11 zeigt den Vergleich der gemittelten Titrationskurven in den ELISAs Ep80-2 und EE-1, Tabelle 17 zeigt die Gesamtheit der Ergebnisse.

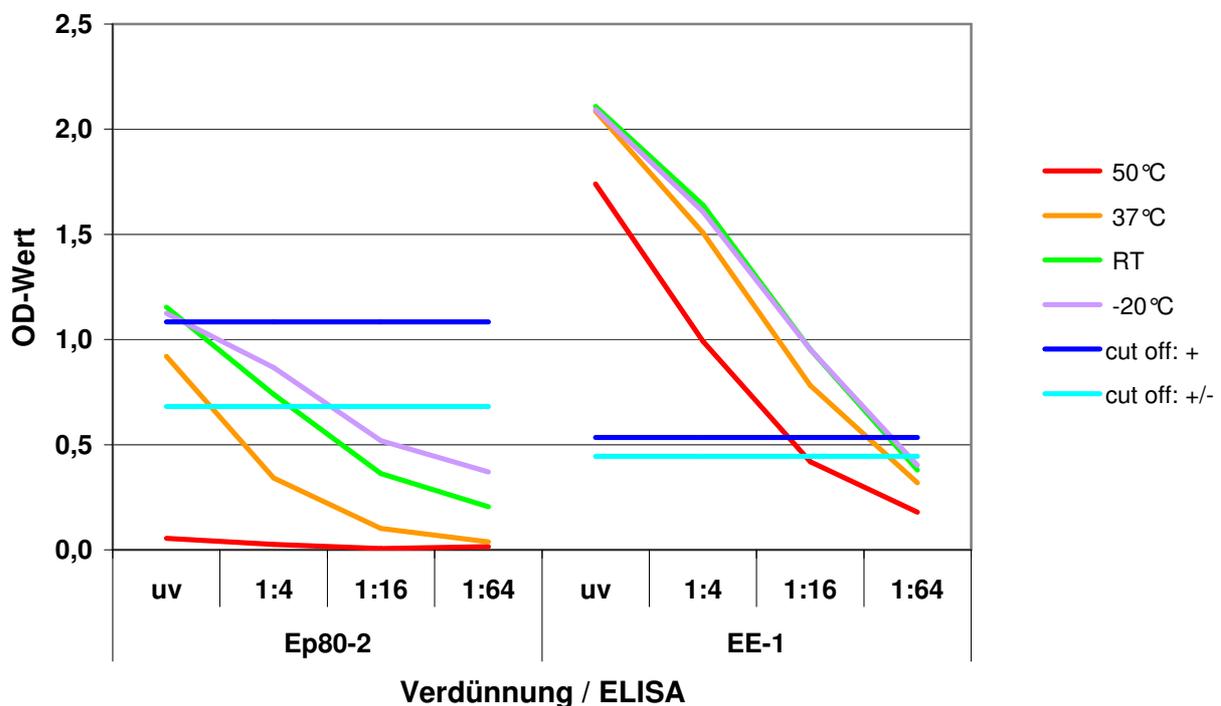


Abb. 11: Einfluss verschiedener Temperaturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzproben auf den AG-Nachweis in den ELISAs Ep80-2 und EE-1 (Darstellung der gemittelten Titrationskurven, n=8)

Tab. 17: Einfluss verschiedener Temperaturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzproben auf die AG-Nachweisbarkeit mittels ELISA (Darstellung der AG-Titer, n=8 je Temperatur)

ELISA	Temperatur	AG-Titer				
		Min.	Mittel	Max.	STD	VK
Ep80-1	50 °C	0	0	0	-	-
	37 °C	<0,5	0,7	1,2	0,4	58,2%
	23 °C	<0,5	3,3	13,2	4,4	131,8%
	-20 °C	0,5	3,6	10,3	2,9	81,0%
Ep80-2	50 °C	0	0	0	-	-
	37 °C	<0,5	0,7	1,1	0,3	45,8%
	23 °C	<0,5	2,0	7,8	2,6	131,5%
	-20 °C	<0,5	2,3	6,2	2,1	91,4%
EE-1	50 °C	7,0	10,6	14,2	2,5	23,6%
	37 °C	14,0	28,4	44,4	10,2	36,0%
	23 °C	32,9	42,8	50,0	7,0	16,3%
	-20 °C	15,1	39,8	60,1	13,3	33,4%
EE-2	50 °C	9,7	15,1	22,2	3,9	25,7%
	37 °C	20,4	42,8	61,4	13,9	32,6%
	23 °C	50,9	64,6	76,6	11,6	18,0%
	-20 °C	48,7	71,8	105,7	18,7	26,1%
EE-3	50 °C	8,8	13,0	15,6	2,4	18,6%
	37 °C	13,1	28,6	46,3	11,9	41,5%
	23 °C	17,0	38,3	55,2	13,0	34,0%
	-20 °C	19,0	36,9	58,3	11,1	30,0%

Bei allen ELISA-Systemen konnte ein negativer Einfluss hoher Temperaturen beobachtet werden. Mit den NS3-ELISAs konnte das BVDV bei einer Lagerung der Stanzen bei 50°C nicht mehr nachgewiesen werden. Auch bei 37°C lagen die meisten Proben mit mittleren AG-Titern von je 0,7 im fraglichen oder negativen Bereich (jeweils fünf von acht Proben). Bei Ep80-1 war der Unterschied zwischen 37°C-Proben und -20°C-Proben signifikant ($p=0,021$). Zwischen den bei Raumtemperatur gelagerten (mittlerer AG-Titer 3,3 und 2,0) und den gefrorenen Proben (mittlerer AG-Titer 3,6 und 2,3) gab es keine signifikanten Unterschiede. Die VK lagen zwischen 58,2 und 131,8% (Ep80-1) und zwischen 45,8 und 131,5% (Ep80-2).

Im Vergleich dazu lies sich das BVDV mittels E^{ms} -Tests in allen bei 50°C gelagerten Proben nachweisen. Die niedrigsten AG-Titer lagen 7fach (EE-1), 9,7fach (EE-2) und 8,8fach (EE-3) über der Nachweisgrenze. Die mittleren AG-Titer betragen 10,6 (EE-1), 15,1 (EE-2) und 13,0 (EE-3). In allen E^{ms} -ELISAs waren die Unterschiede der 50°C-Proben zu den übrigen höchst signifikant ($p=0,000$ bis $0,006$). Bei 37°C-Proben lagen niedrigster und mittlerer AG-Titer bei 14,0 und 28,4 (EE-1), bei 20,4 und 42,8 (EE-2) und bei 13,1 und 28,6 (EE-3).

Höchst signifikante Unterschiede waren bei den Tests EE-1 (37°C/23°C, p=0,008) und EE-2 (37°C/23°C, p=0,006; 37°C/-20°C, p=0,003) zu beobachten. Zwischen den bei 23°C gelagerten und den gefrorenen Proben gab es keine signifikanten Unterschiede.

Einfluss bakterieller Kontamination frischer Ohrstanzen auf den AG-Nachweis

Frische Ohrstanzen eines PI Tieres wurden mit ausgewählten Keimen kontaminiert, im Brutschrank inkubiert und anschließend eingetrocknet (vgl. 3.3.2). Zur Kontrolle dienten nach Standardprotokoll (vgl. 3.2.2) hergestellte Proben desselben Tieres. Die Proben wurden in den ELISAs Ep80-1 und -2, sowie EE-1 bis -3 getestet. Tabelle 18 zeigt die Resultate.

In den NS3-Tests lagen die mittleren AG-Titer der kontaminierten Stanzen zwischen 3,1 und 4,7 (Ep80-1) und zwischen 1,8 und 4,3 (Ep80-2). Bei den Kontrollen ergaben sich Werte von 2,3 und 3,4. Signifikante Unterschiede waren in keinem Test zu beobachten, wobei die keimbelasteten Proben (VK zwischen 60,0 und 191,4% und zwischen 71,4 und 126,3%) eine größere Streuung zeigten als die Kontrollen (VK von 41,3 und 50,6%). Bei den E^{ms}-Tests lagen die mittleren Titer der kontaminierten Proben zwischen 25,3 und 34,2 (EE-1), zwischen 38,3 und 64,0 (EE-2) und zwischen 16,7 und 34,6 (EE-3). Bei den Kontrollen lagen sie bei 44,7, 89,3 und 51,8. Die niedrigsten Einzelwerte (11,7, 18,3 und 11,1) wurden bei Proben mit *A. pyogenes* als Kontaminant festgestellt. Die Streuung lag mit VK-Werten von maximal 40,1, 41,2 und 37,1% auf niedrigem Niveau. Die Unterschiede zwischen kontaminierten Stanzen und der Kontrolle waren in den meisten Fällen signifikant oder höchst signifikant: EE-1: *A. pyogenes*, p=0,030; *P. aeruginosa*, p=0,037; EE-2: *S. aureus*, p=0,007; *E. coli*, p=0,047; *A. pyogenes*, p=0,002; *P. aeruginosa*, p=0,009; EE-3: *S. aureus*, p=0,002; *E. coli*, p=0,001; *A. pyogenes*, p=0,001; *P. aeruginosa*, p=0,029; fäkale Keimflora, p=0,039. Signifikante Unterschiede zwischen den Keimen lagen in den Tests EE-2 (*A. pyogenes*/Keimflora, p=0,037) und EE-3 (*S. aureus*/*P.aeruginosa* und Keimflora, p=0,025 und 0,000; *A. pyogenes*/*P. aeruginosa* und Keimflora, p=0,008 und 0,000) vor.

Tab. 18: Einfluss bakterieller Kontamination frisch gewonnener Ohrgewebeproben auf den AG-Nachweis (Darstellung der AG-Titer, n=6)

ELISA	Keim	AG-Titer				
		Min.	Mittel	Max.	STD	VK
Ep80-1	<i>S. aureus</i>	<0,5	4,7	9,2	4,0	86,9%
	<i>E. coli</i>	0,6	4,0	12,6	4,4	109,2%
	<i>A. pyogenes</i>	1,3	3,7	6,9	2,2	60,0%
	<i>P. aeruginosa</i>	<0,5	3,2	10,0	4,0	124,8%
	fäkale Keimflora	<0,5	3,1	15,3	6,0	191,4%
	Kontrolle	0,8	2,3	3,1	0,9	41,3%
Ep80-2	<i>S. aureus</i>	<0,5	2,0	4,5	1,6	79,5%
	<i>E. coli</i>	0,7	2,3	6,9	2,3	99,6%
	<i>A. pyogenes</i>	<0,5	1,8	3,5	1,3	71,4%
	<i>P. aeruginosa</i>	<0,5	3,1	10,5	3,9	124,8%
	fäkale Keimflora	1,0	4,3	15,1	5,4	126,3%
	Kontrolle	1,5	3,4	6,2	1,7	50,6%
EE-1	<i>S. aureus</i>	22,3	30,6	43,3	8,5	27,6%
	<i>E. coli</i>	13,9	34,2	49,1	11,6	34,0%
	<i>A. pyogenes</i>	11,7	25,3	40,2	10,1	40,1%
	<i>P. aeruginosa</i>	23,5	28,7	33,0	3,64	12,7%
	fäkale Keimflora	20,3	29,7	51,6	11,3	38,0%
	Kontrolle	25,9	44,7	66,1	15,9	35,5%
EE-2	<i>S. aureus</i>	38,1	50,7	73,7	12,6	24,9%
	<i>E. coli</i>	22,4	58,8	85,6	21,5	36,6%
	<i>A. pyogenes</i>	18,1	38,3	61,8	15,8	41,2%
	<i>P. aeruginosa</i>	41,9	53,9	67,6	9,5	17,7%
	fäkale Keimflora	51,4	64,0	106,0	20,9	32,7%
	Kontrolle	57,4	89,3	125,5	25,1	28,1%
EE-3	<i>S. aureus</i>	15,1	20,2	24,9	5,0	24,5%
	<i>E. coli</i>	12,3	26,1	37,7	9,7	37,1%
	<i>A. pyogenes</i>	11,1	16,7	27,6	5,8	34,7%
	<i>P. aeruginosa</i>	21,2	31,4	46,4	9,2	29,2%
	fäkale Keimflora	27,7	34,6	38,1	3,9	11,3%
	Kontrolle	32,2	51,8	80,4	17,3	33,4%

4.2 Real time RT-PCR

Der Nachweis des BVDV-Genoms erfolgte mittels *real time* RT-PCR in einem *one step* Assay. Als Zielstruktur diente dabei die bei allen Pestiviren hochkonservierte 5'UTR. Verwendete Primer und Sonden wurden der Literatur entnommen bzw. durch das Friedrich-Loeffler-Institut, Riems zur Verfügung gestellt (vgl. 3.5.3).

4.2.1 Freisetzung und Isolierung der BVDV-RNA aus den Ohrgebewebeproben

Die konstante und möglichst umfangreiche Freisetzung der BVDV-RNA aus den getrockneten Ohrstanzproben bildet die Grundlage für eine ausreichende Ausbeute in der anschließenden RNA-Isolierung und damit für die Sensitivität des PCR-Verfahrens an sich. Um möglichst viel BVDV-RNA zu gewinnen, wurden verschiedene Techniken zur Freisetzung und unterschiedliche RNA-Isolierungskits für die Aufreinigung getestet und verglichen.

Freisetzung der RNA durch enzymatischen Verdau bzw. mechanische Bearbeitung

Um eine einfache und massentaugliche Freisetzung der BVDV-RNA zu ermöglichen wurden zwei verschiedene Techniken verglichen. Zum einen ein enzymatischer Verdau der Ohrgebewebeproben durch eine Proteinase K (PK)-Lösung und zum anderen eine mechanische Zerkleinerung und Homogenisierung des Trockengewebes in einer Laborschwingmühle (vgl. 3.5.1). Die anschließende RNA-Aufreinigung erfolgte wie unter 3.5.1 beschrieben. Acht bzw. vier Proben der PI Tiere **B**, **C**, **D**, **E** und **K** wurden auf diese Weise bearbeitet und mit dem Standard-PCR-Assay (vgl. 3.5.3) getestet (vgl. Tabelle 19).

Tab. 19: Vergleich zweier Methoden zur RNA-Freisetzung: Proteinase K-Verdau (n=8 je PI Tier) und Gewebehomogenisierung in der Laborschwingmühle (n=4 je PI Tier)

RNA-Freisetzung	PI Tier	Ct-Wert				
		Min.	Mittel	Max.	STD	Spanne
PK-Verdau	B	28,1	30,3	32,7	1,4	4,6
	C	32,3	33,7	36,9	1,4	4,6
	D	30,2	32,0	36,3	2,1	6,1
	E	32,4	36,3*	>42	3,2*	9,6*
	K	30,8	33,2	34,7	1,2	3,9
Labor - schwing- mühle	B	21,2	22,3	22,8	0,8	1,6
	C	23,2	25,2	26,9	1,5	3,7
	D	22,3	24,8	27,2	2,5	4,9
	E	26,1	26,5	27,6	0,7	1,5
	K	27,2	27,8	28,4	0,5	1,2

*: Das negative Ergebnis einer Probe (Ct>42) wurde bei der Statistik als Ct 42 gewertet.

Beim PK-Verdau lagen die mittleren Ct-Werte zwischen 30,3 und 36,3. Eine Probe des Tieres **E** wurde nicht als BVDV-positiv erkannt (Ct >42). Die Spannen lagen dadurch zwischen 3,9 und 9,6 Zyklen. Im Vergleich dazu lagen die gemittelten Ct-Werte nach Nutzung der Laborschwingmühle zwischen 22,3 und 27,8. Die höchsten Ct-Werte der einzelnen Tiere betragen zwischen 22,8 und 28,4. Die Spannen lagen zwischen 1,2 und 4,9 Zyklen. Im Schnitt lagen die mittleren Ct-Werte nach mechanischer Bearbeitung in der Laborschwingmühle 7,74 Zyklen niedriger als nach Enzymverdau.

Vergleich verschiedener kommerzieller Kits für die RNA-Aufreinigung nach mechanischer Probenbearbeitung

Für die Isolierung der BVDV-RNA nach der mechanischen Zerkleinerung der Ohrstanzen in der Laborschwingmühle wurden verschiedene kommerzielle Produkte getestet und verglichen. Als Puffer für die Homogenisierung wurde dabei der jeweilige im Kit enthaltene Binde- oder Lysispuffer verwendet (vgl. 3.5.2). Abbildung 12 und Tabelle 20 geben die erzielten Ergebnisse wieder.

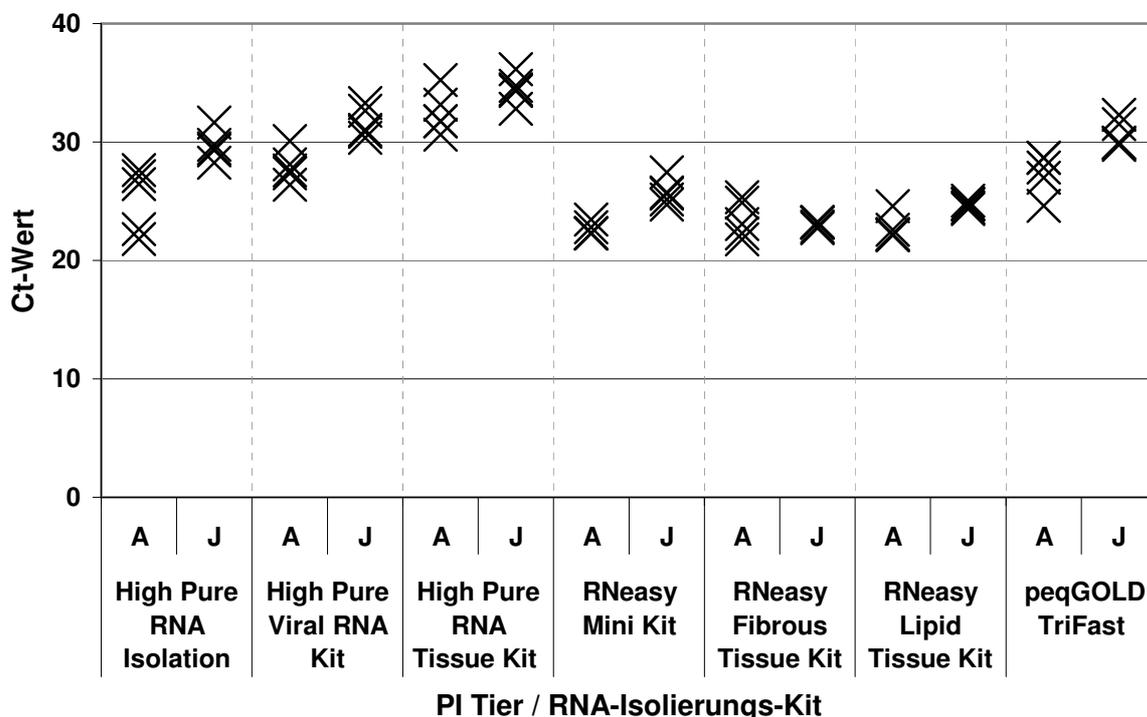


Abb. 12: Vergleich verschiedener RNA-Isolierungskits anhand von Probenhomogenaten zweier PI Tiere (**A** und **J**) aus der Laborschwingmühle (Darstellung der Ct-Werte, n=5)

Tab. 20: Vergleich verschiedener RNA-Isolierungskits anhand von Probenhomogenaten zweier PI Tiere (A und J) aus der Laborschwingmühle (Darstellung der Ct-Werte, n=5)

RNA-Kit	PI Tier	Ct-Wert				
		Min.	Mittel	Max.	STD	Spanne
High Pure RNA Isolation Kit (Roche)	A	21,8	25,1	27,6	2,7	5,8
	J	28,3	29,7	31,7	1,2	3,4
High Pure Viral RNA Kit (Roche)	A	26,4	27,9	30,1	1,4	3,7
	J	30,3	31,6	33,3	1,3	3
Pure RNA Tissue Kit (Roche)	A	30,6	32,5	35,2	1,8	4,6
	J	32,8	34,5	36,1	1,2	3,3
RNeasy® Mini Kit (Qiagen)	A	22,3	22,6	23,4	0,5	1,1
	J	24,7	25,7	27,4	1,0	2,7
RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen)	A	21,8	23,5	25,3	1,6	3,5
	J	22,7	23,0	23,3	0,2	0,6
RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)	A	22,1	22,7	24,6	1,1	2,5
	J	24,3	24,7	25,0	0,3	0,7
peqGOLD Trifast™ (peqLab)	A	24,6	27,4	28,7	1,7	4,1
	J	29,8	30,7	32,3	1,1	2,5

Die höchste Ausbeute an RNA lies sich mit den RNeasy® Kits (Qiagen) erreichen. Die mittleren Ct-Werte für die beiden PI Tiere lagen bei 22,6 und 25,7 (Mini Kit), 23,5 und 23,0 (Fibrous Tissue Mini Kit) und 22,7 und 24,7 (Lipid Tissue Mini Kit). Die Spannen betragen hierbei 1,1 und 2,7, 3,5 und 0,6 sowie 2,5 und 0,7 Zyklen. Bei den Puffern der Roche-Kits sind Detergentien enthalten, die bei der Gewebezerkleinerung in der Laborschwingmühle zur Schaumbildung führten. Alle getesteten Roche-Produkte lieferten weniger RNA und zeigten eine größere Streuung.

4.2.2 Vergleich der Sensitivität unterschiedlicher *real time* RT-PCR-Assays

Für den Nachweis der isolierten BVDV-RNA wurden zwei verschiedene in der Literatur beschriebene PCR-Systeme verwendet und verglichen (vgl. 3.5.3). Bei beiden handelt es sich um „panpesti“-reaktive TaqMan-Assays für die Detektion der 5'UTR.

Aus je vier Stanzproben von sechs PI Tieren wurde nach Standardprotokoll (vgl. 3.5.2) die RNA isoliert und die Eluate mit den beiden Assays „Pesti“-PCR und „Panpesti-System 1.1“ (PP1.1) getestet (vgl. 3.5.3). In Tabelle 21 sind die Ergebnisse des Vergleichs dargestellt.

Tab. 21: Vergleich zweier PCR-Systeme (PP1.1 und „Pesti“-PCR) anhand isolierter BVDV-RNA aus Ohrgewebeproben verschiedener PI Tiere (Darstellung der Ct-Werte, n=4 je PI Tier)

PCR-Assay	PI Tier	Ct-Wert				
		Min	Mittel	Max.	STD	Spanne
PP1.1	B	21,2	22,3	22,8	0,8	1,6
	C	23,2	25,2	26,9	1,5	3,7
	D	22,3	24,8	27,2	2,5	4,9
	E	26,1	26,5	27,6	0,7	1,5
	I	26,8	27,4	28,2	0,6	1,4
	K	27,2	27,8	28,4	0,5	1,2
„Pesti“-PCR	B	24,6	25,5	27,2	1,2	2,6
	C	27,0	27,8	28,8	0,8	1,8
	D	23,9*	26,4	27,5	1,7	3,6
	E	27,4	28,9	29,9	1,2	2,5
	I	27,2	28,2	30,3	1,4	3,1
	K	28,3	29,4	31,2	1,3	2,9

*: atypischer Verlauf der Amplifikationskurve

Beim PP1.1 lagen die gemittelten Ct-Werte der einzelnen Tiere zwischen 22,3 und 27,8, bei der „Pesti“-PCR hingegen zwischen 25,5 und 29,4. Bei allen Tieren erreichte das PP1.1 niedrigere Ct-Werte, im Schnitt lagen sie um 2,0 Zyklen tiefer. Die Spannen zwischen minimalem und maximalem Wert eines Tieres lagen zwischen 1,2 und 4,9 (PP1.1) bzw. 1,8 und 3,6 („Pesti“) Zyklen.

4.2.3 Einfluss kolostraler Antikörper und verschiedener Umweltfaktoren auf den BVDV-Nachweis in Ohrgewebeproben mittels *real time* RT-PCR

Sowohl der Einfluss maternaler Antikörper auf die infizierten Zellen im Gewebe als auch bestimmte Umweltfaktoren, die auf die gewonnenen Ohrstanzen einwirken, könnten den Nachweis des BVDV-Genoms mittels RT-PCR stören.

RNA-Nachweis in Ohrstanzproben verschiedener Kälbern in der kolostralen Phase

Unter dem Einfluss kolostraler Antikörper könnte es zu einem Rückgang von BVDV-infizierten Zellen im Ohrgewebe und damit zu einer Verminderung der nachweisbaren Virus-RNA kommen. Um dies zu untersuchen, wurden jeweils sechs Proben von zwölf verschiedenen PI Tieren mit definierter kolostraler Belastung (vgl. 3.1.2) getestet und verglichen. Aufgrund der bei diesen Tieren gemessenen SNT-Titer, wurden diese in Gruppen mit hoher (SNT: >2900, n=5), mäßiger (SNT: 2900 bis 10, n=4) und niedriger (SNT: <10, n=3) Antikörperbelastung aufgeteilt. Abbildung 13 zeigt die Gesamtheit der einzelnen Ergebnisse, Tabelle 22 zeigt die ausgewerteten Daten.

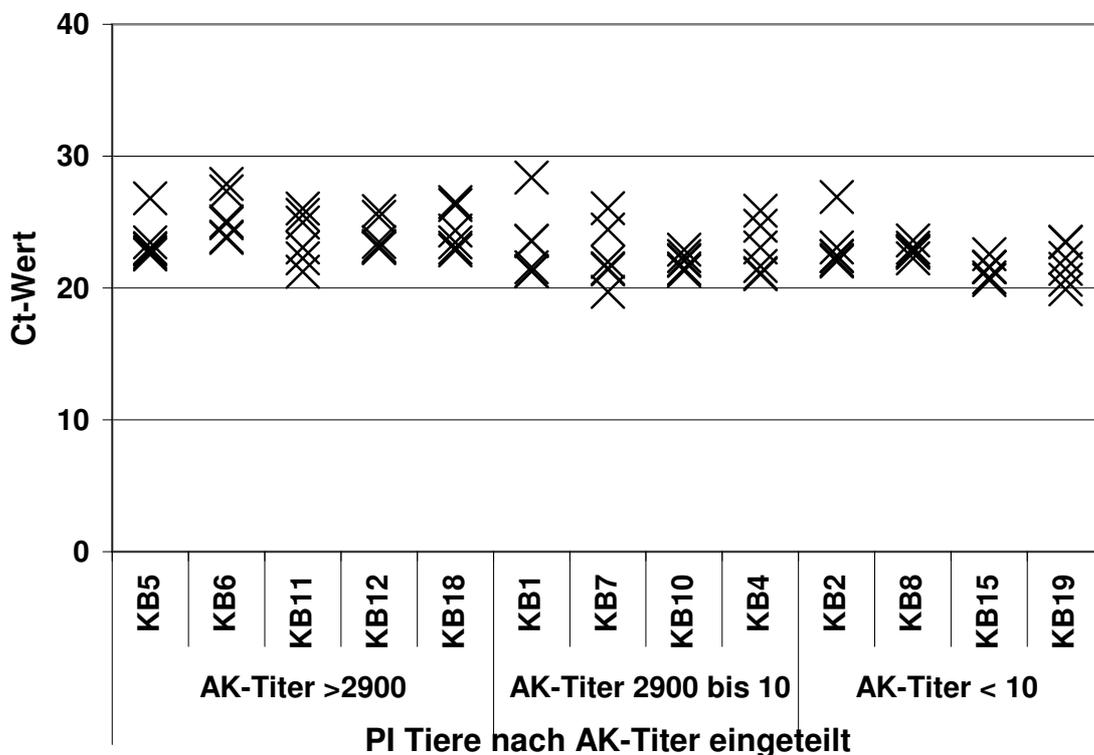


Abb. 13: Nachweis der BVDV-RNA in Ohrstanzen verschiedener PI Tiere in der kolostralen Phase mittels *real time* RT-PCR (Darstellung der Ct-Werte, n=6)

Tab. 22: Nachweis der BVDV-RNA in Ohrstanzen verschiedener PI Tiere in der kolostralen Phase mittels *real time* RT-PCR (Darstellung der Ct-Werte, n=6)

PI Tier	AK-Titer	Ct-Werte				
		Min.	Mittel	Max.	STD	Spanne
KB5	>2900	22,5	23,6	26,8	1,6	4,3
KB6		23,8	25,5	27,9	1,7	4,1
KB11		21,2	23,9	26,0	1,9	4,8
KB12		23,0	24,0	25,8	1,3	2,8
KB18		22,9	24,4	26,5	1,6	3,6
KB1	2299	21,3	23,3	28,4	2,7	7,1
KN7	724	19,7	22,5	26,1	2,3	6,4
KB10	72	21,3	22,1	22,9	0,6	1,6
KB4	45	21,0	22,9	25,9	2,0	4,9
KB2	<10	22,0	23,2	26,9	1,9	4,9
KB8		22,3	22,9	23,6	0,5	1,3
KB15		20,6	21,5	22,6	0,7	2,0

Jede einzelne Probe wurde sicher als BVDV-positiv erkannt. Die höchsten Ct-Werte bei Einzelproben lagen zwischen 22,6 und 28,4. Die gemittelten Ct-Werte der einzelnen Tiere innerhalb der Gruppen lagen zwischen 23,6 und 25,5 (SNT: >2900), zwischen 22,1 und 23,3 (SNT: 2900 bis 10) und zwischen 21,5 und 23,2 (SNT: <10). Die mittlere Differenz zwischen den hoch AK-belasteten Kälbern und den beiden anderen Gruppen betrug 1,6 und 1,8 Zyklen, dieser Unterschied ist höchst signifikant ($p=0,003$ und $0,000$). Die Spannen betragen zwischen 2,8 und 4,8 (SNT: >2900), zwischen 1,6 und 7,1 (SNT: 2900 bis 10) und zwischen 1,3 und 4,9 (SNT: <10) Zyklen.

Einfluss verschiedener Temperaturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzen auf den RNA-Nachweis

Hohe Temperaturen in Verbindung mit noch nicht ausgetrockneten Ohrstanzproben könnten die Stabilität der BVDV-RNA im Gewebe beeinträchtigen. Um dies zu untersuchen, wurden homologe Probenserien des PI Tieres **G2** hergestellt, über einen bestimmten Zeitraum unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt (vgl. 3.3.1) und in der *real time* RT-PCR getestet. Abbildung 14 zeigt die erzielten Einzelwerte, in Tabelle 23 sind die ausgewerteten Daten ersichtlich.

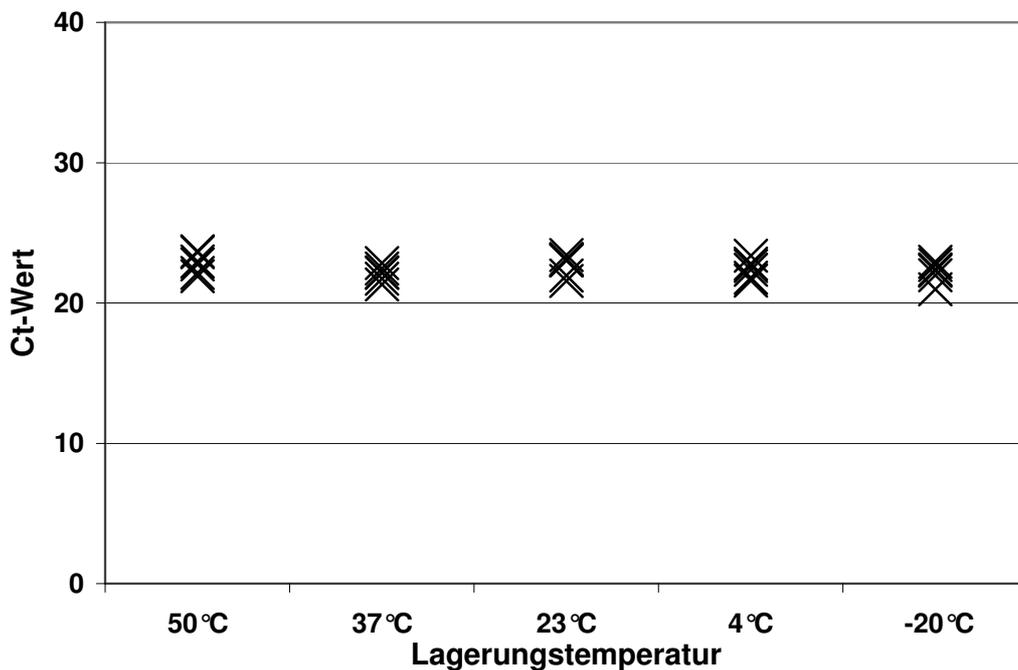


Abb. 14: Einfluss verschiedener Temperaturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzproben auf den RNA-Nachweis (Darstellung der Ct-Werte, n=6)

Die gemittelten Ct-Werte der Proben verschiedener Lagerungsbedingungen lagen zwischen 22,1 und 22,8. Die Maximalwerte einzelner Stanzen betragen 22,8 bis 23,7. Die Spannen lagen zwischen 1,5 und 1,8 Zyklen. Die Lagerungstemperatur hat keinen signifikanten Einfluss auf den RNA-Nachweis.

Tab. 23: Einfluss verschiedener Temperaturen bei der Lagerung frisch gewonnener Ohrstanzproben auf den RNA-Nachweis (Darstellung der Ct-Werte, n=6)

Temperatur	Ct-Wert				
	Min.	Mittel	Max.	STD	Spanne
50°C	21,9	22,8	23,7	0,7	1,8
37°C	21,3	22,1	22,8	0,5	1,5
23°C	21,6	22,7	23,4	0,7	1,8
4°C	21,6	22,4	23,4	0,7	1,8
-20°C	21,0	22,2	22,9	0,7	1,9

Einfluss bakterieller Kontamination frischer Ohrstanzen auf den RNA-Nachweis

Die bakterielle Fermentation könnte in den noch nicht ausgetrockneten Ohrstanzen zu einer Zersetzung der enthaltenen BVDV-RNA führen. Dadurch würde der BVDV- Nachweis mittels *real time* RT-PCR deutlich an Sensitivität verlieren.

Frische Ohrstanzen eines PI Tieres wurden mit ausgewählten Keimen kontaminiert, im Brutschrank inkubiert, eingetrocknet (vgl. 3.3.2) und mittels *real time* RT-PCR getestet. Zur Kontrolle dienten nach Standardprotokoll (vgl. 3.2.2) hergestellte Proben desselben Tieres. Abbildung 15 zeigt die erzielten Einzelwerte, in Tabelle 24 sind die ausgewerteten Daten dargestellt.

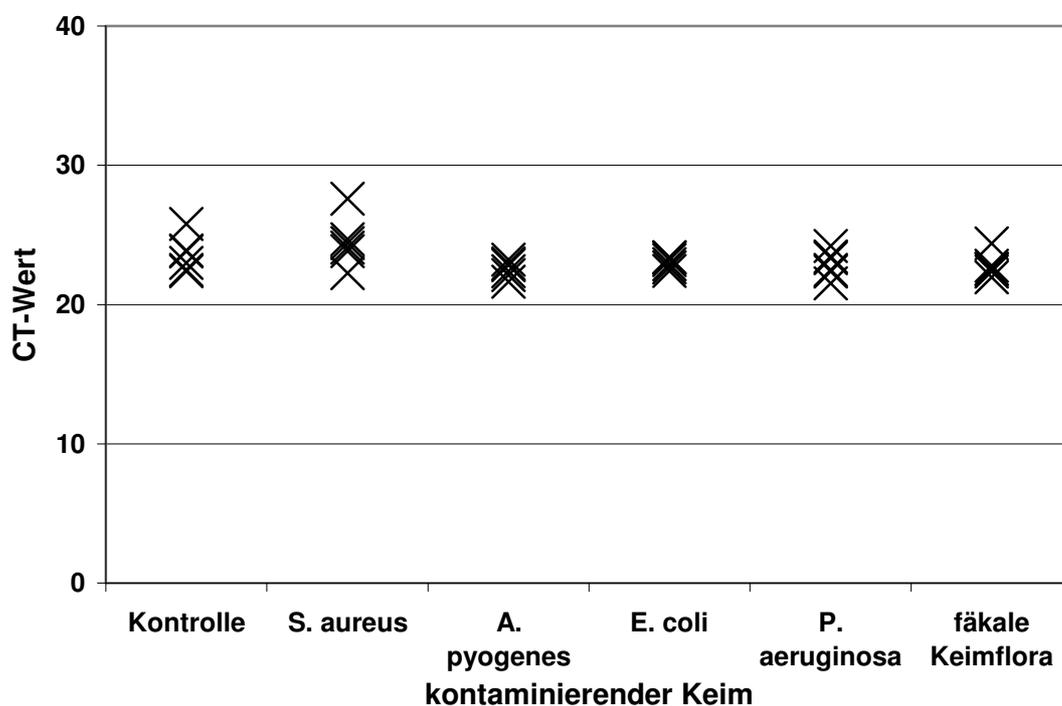


Abb. 15: Einfluss bakterieller Kontamination frisch gewonnener Ohrgewebeproben auf den RNA-Nachweis (Darstellung der Ct-Werte, n=6 je Keim)

Die mittleren Ct-Werte der kontaminierten Proben lagen zwischen 22,5 und 24,5, die Spanne lag zwischen 1,0 und 5,3 Zyklen. Die Kontrolle wurde im Mittel mit Ct 23,6 mit einer Spanne von 3,4 detektiert. Die höchsten Einzelwerte bei den kontaminierten Proben lagen zwischen 23,2 und 27,6, der höchste Kontrollwert betrug 25,8. Zwischen den keimbelasteten Proben und der Kontrolle gab es keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 24: Einfluss bakterieller Kontamination frisch gewonnener Ohrgewebeproben auf den RNA-Nachweis (Darstellung der Ct-Werte, n=6 je Keim)

Keim	Ct-Wert			STD	Spanne
	Min.	Mittel	Max.		
<i>S. aureus</i>	22,3	24,5	27,6	1,8	5,3
<i>E. coli</i>	22,4	23,0	23,4	0,4	1,0
<i>A. pyogenes</i>	21,6	22,5	23,2	0,6	1,6
<i>P. aeruginosa</i>	21,5	22,9	24,2	1,0	2,7
fäkale Keimflora	22,0	22,8	24,4	0,8	2,4
Kontrolle	22,4	23,6	25,8	1,3	3,4

Inhibitorischer Effekt von Kotkontaminationen auf den RNA-Nachweis

Eine wichtige Fehlerquelle in der Diagnostik mittels RT-PCR sind Inhibitoren, die die Reverse Transkription oder die PCR-Reaktion an sich stören oder zum Erliegen bringen. Im Rahmen der Ohrstanzgewinnung könnten solche Hemmstoffe durch die Kontamination mit Rinderkot in die Probenansätze gelangen.

Um zu überprüfen, inwieweit dies Relevanz für das etablierte PCR-System (RNA-Freisetzung, RNA-Isolierung und PCR-Assay) hat, wurden vier Proben des PI Tieres **G2** in der Laborschwingmühle homogenisiert und in jeweils vier Aliquots aufgeteilt. Diese Probenanteile wurden mit verschiedenen Mengen Rinderkot kontaminiert (vgl. 3.3.4). Abbildung 16 zeigt die Abhängigkeit der erzielten Ct-Werte von der Kotkontamination der einzelnen Probenanteile.

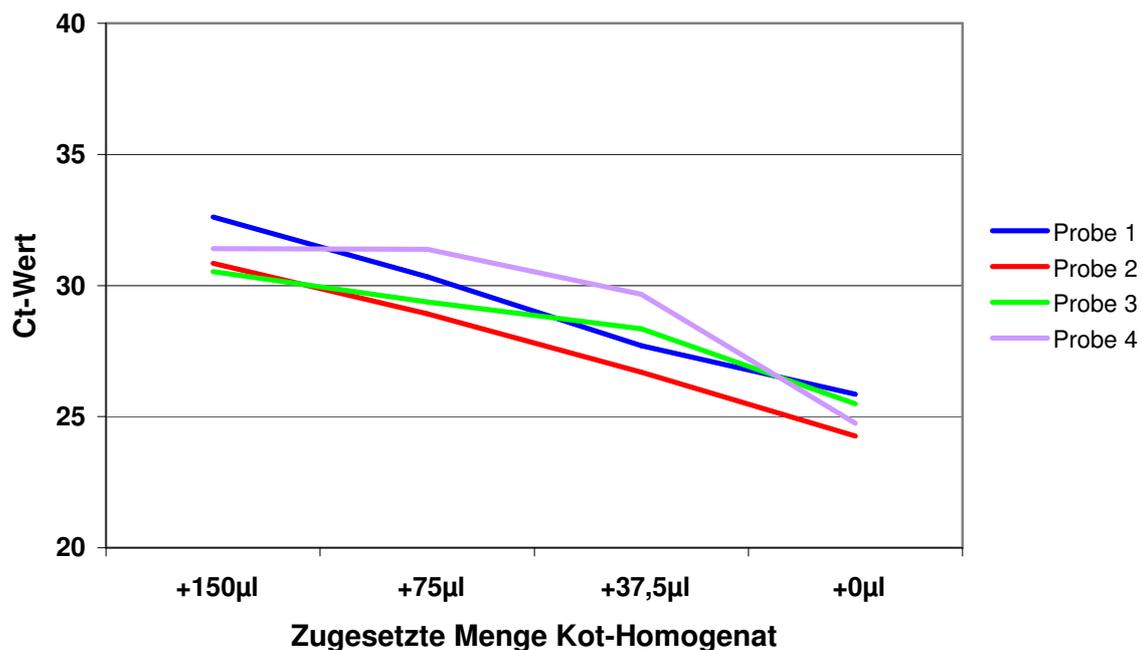


Abb. 16: Einfluss zugesetzter Mengen an Kothomogenat zu aliquotierten Probenansätzen auf die Nachweisbarkeit der BVDV-RNA mittels *real time* RT-PCR

Deutlich ist der negative Effekt der Kotkontamination zu ersehen. Bei der Mittelung der Proben steigt der Ct-Wert von 25,1 (0µl Zusatz) über 28,1 (37,5µl) und 30,0 (75µl) auf 31,4 (150µl) an. Die Spannen innerhalb einer Kontaminationsgruppe lagen zwischen 1,6 und 3,0 Zyklen.

Um die Auswirkungen der Kotkontamination auf die Effizienz der PCR zu demonstrieren, wurden die RNA-Eluate der Proben mit hoher Belastung (75µl und 150µl Kothomogenat) 1:10 im Elutionspuffer verdünnt und getestet. Tabelle 25 zeigt den Vergleich der Ergebnisse der unverdünnten und der verdünnten RNA-Eluate.

Tab. 25: Vergleich von unverdünnten und verdünnten RNA-Eluaten aus kotkontaminierten Ohrstanzproben (Darstellung der Ct-Werte, n=4)

Kot-Kontamination	Verdünnung RNA-Eluat	Ct-Wert				
		Min.	Mittel	Max.	STD	Spanne
+150µl	uv	30,5	31,5	32,6	0,9	2,1
	1:10	30,1	30,8	32,2	1,0	2,1
+75µl	uv	28,9	30,0	31,4	1,1	2,5
	1:10	28,3	29,2	29,8	0,6	1,5

Bei beiden Probengruppen erreichten die Verdünnungen im Mittel um 0,7 bzw. 0,8 Zyklen niedrigere Ct-Werte als die unverdünnten Ansätze. Die mittleren Ct-Werte lagen bei 30,8 und 29,2 (verdünnt) bzw. bei 31,5 und 30,0 (unverdünnt). Die Spannen lagen bei allen Ansätzen in einem Bereich von 1,5 bis 2,5 Zyklen. Der Sensitivitätsverlust lässt sich somit auf eine reduzierte Effizienz der RT-PCR zurückführen.

4.2.4 Potential des etablierten *real time* RT-PCR-Verfahrens für die Untersuchung von Ohrstanzen als Poolproben

Die Untersuchung von Einzelproben mittels *real time* RT-PCR ist relativ kosten- und zeitintensiv und damit kaum für die Massendiagnostik geeignet. Die hohe Sensitivität dieser Nachweismethode sollte es jedoch ermöglichen, einzelne PI Tiere auch in Poolproben sicher zu erkennen. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Verfahren könnte die Poolung der Proben auf Ebene der Homogenate aus der Laborschwingmühle schnell und einfach erfolgen. Dies würde zu einer erheblichen Kostenreduktion bei der RNA-Isolierung und den PCR-Reagenzien führen.

Nachweis von BVDV-RNA in gepoolten Proben

Um die Eignung der Gewebekomogenate aus der Laborschwingmühle für die Poolung zu überprüfen, wurden Ohrstanzen von acht PI Tieren homogenisiert und in je zwei Aliquote aufgeteilt. Aus einem Anteil wurde die RNA direkt isoliert und getestet. Mit dem jeweiligen zweiten Aliquot wurde ein 10er Pool (1+9) mit Homogenaten aus BVDV-freien Ohrgewebeproben gebildet und getestet. Tabelle 26 zeigt den Vergleich der gepoolt und der einzeln getesteten Proben.

Tab. 26: Poolprobenbildung auf Ebene der Gewebekomogenate aus der Laborschwingmühle: Vergleich von gepoolt (1 PI + 9 BVDV-freie Tiere) und einzeln getesteten Proben verschiedener PI Tiere (Darstellung der Ct-Werte)

PI Tier	Ct-Wert		
	gepoolt (a)	einzeln (b)	Differenz (a-b)
B	26,2	24,8	1,4
C	26,0	25,4	0,6
D	26,2	24,7	1,5
E	28,6	27,7	0,9
G2	25,7	24,5	1,2
I	26,2	25,4	0,8
K	28,5	26,9	1,6
KB11	25,1	23,1	2,0
KB18	26,0	24,9	1,1

Die einzeln getesteten Ansätze erreichten Ct-Werte zwischen 23,1 und 27,7, die gepoolten Proben lagen zwischen 25,1 und 28,6. Im Mittel benötigten die Poolproben 1,2 Zyklen mehr zum Erreichen des *threshold*. Maximal wurden 2,0 Zyklen mehr benötigt. Die Poolung führte somit nur zu einem geringen Verlust an Sensitivität.

Stabilität der BVDV-RNA im Gewebehomogenat aus der Laborschwingmühle

Für den Fall, dass ein Pool positiv getestet wird, muss dessen Auflösung und die Testung der enthaltenen Einzelproben erfolgen. Hierfür muss sich die BVDV-RNA ausreichende Zeit im Gewebehomogenat stabil verhalten.

Um dies zu überprüfen, wurden Ohrstanzen von acht PI Tieren homogenisiert und in je zwei Aliquots aufgeteilt. Aus einem Anteil wurde die RNA direkt isoliert und getestet, das zweite wurde nach 24stündiger Lagerung bei 4°C bearbeitet und getestet. Tabelle 27 stellt den Vergleich dieser Proben dar.

Tab. 27: Stabilität der BVDV-RNA im Gewebehomogenat aus der Laborschwingmühle: Vergleich von Proben ohne Lagerung und nach einer Lagerung für 24h bei 4°C (Darstellung der Ct-Werte)

PI Tier	Ct-Wert		
	ohne Lagerung (a)	nach 24h bei 4°C (b)	Differenz (a-b)
B	23,3	25,0	-1,7
C	25,9	25,2	0,7
D	25,4	25,3	0,1
E	25,9	26,7	-0,8
G	25,0	25,1	-0,1
I	25,7	25,8	-0,1
K	26,0	25,9	0,1
KB11	26,1	26,5	-0,4
KB18	25,9	26,4	-0,5

Die direkt getesteten Proben erreichten Ct-Werte von 23,3 bis 26,1, nach der Lagerung wurden Werten zwischen 25,0 und 26,7 erzielt. Im Mittel lagen die aufbewahrten Proben um 0,3 Zyklen höher, die maximale Abweichung betrug 1,7 Zyklen. Die RNA im Probenhomogenat zeigte sich somit über 24h bei 4°C als sehr stabil.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Nachweisverfahren etabliert werden, mit dem die frühzeitige und sichere Detektion von PI Tieren anhand von trockenkonservierten Ohrstanzproben möglich ist. Die Gewinnung dieser Ohrstanzen könnte leicht und kostengünstig bei der gesetzlich vorgeschriebenen Tiermarkierung erfolgen und somit einen neuen Ansatzpunkt für die BVDV-Bekämpfung darstellen. Diese frühzeitige Probennahme und Diagnostik könnte zu einer BVDV-Statusvergabe für jedes neugeborene Kalb führen und somit verhindern, dass junge PI Tiere über Transport und Handel die weitere Verbreitung des Erregers verursachen.

Die BVDV-Detektion im Ohrgewebe erfolgte durch AG-Nachweis mittels ELISA bzw. RNA-Nachweis in der *real time* RT-PCR. Für beide Verfahren wurden Methoden etabliert, um möglichst viel des jeweiligen Analyten aus dem Gewebe freizusetzen und nachzuweisen. Die analytische Sensitivität der einzelnen Systeme wurde ebenso untersucht wie die Bedeutung kolostraler BVDV-Antikörper und der Einfluss ausgewählter Umweltfaktoren.

5.1 Freisetzung der nachzuweisenden BVDV-Strukturen aus den trockenkonservierten Ohrstanzproben

5.1.1 Solubilisierung der Antigene mittels Detergentien

Zum BVDV-Nachweis wurden ELISAs verwendet, die ausschließlich das NS3 oder das E^{ms}, allein oder in Kombination mit anderen Antigenen, nachweisen. Um ein Tensid zu finden, das für die Freisetzung beider Antigene geeignet ist und das die Nachweisbarkeit dieser nicht negativ beeinflusst, wurden Seifen mit unterschiedlichem chemischen Aufbau getestet und verglichen. Zur Prüfung der prinzipiellen Kompatibilität der Detergentien mit dem AG-Nachweis wurden Leukozytenpellets eines PI Tieres mit den Tensiden inkubiert und der Überstand getestet. Infizierte Leukozyten enthalten in großen Mengen BVDV-Antigene, die sich vergleichsweise leicht und homogen freisetzen lassen sollten (Bielefeldt *et al.*, 1987; Sopp *et al.*, 1994). In den NS3-ELISAs führten einige Seifen jedoch zu negativen Ergebnissen oder vergleichsweise niedrigen AG-Titern. Hierzu zählten SDS, Deoxycholat oder EMPIGEN. Auch in den E^{ms}-Tests konnte bei Verwendung der ionischen Detergentien teilweise eine konzentrationsabhängige Inhibition des AG-Nachweises beobachtet werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ionische Seifen durch Interaktion mit einem Protein zu dessen Konformationsänderung führen können. Dies betrifft vor allem membranassoziierte Proteine (Rehm, 1996), wie das NS3.

Durch strukturelle Änderungen an den Epitopen eines Antigens kann unter Umständen keine ausreichende Bindung durch spezifische Antikörper mehr stattfinden. Für das NS3 konnten solche konformationsabhängigen Epitope im Bereich der Helikase-Domäne nachgewiesen werden (Deregt *et al.*, 2005). Beim E^{rms} ist dies, vermutlich aufgrund seiner hydrophilen Natur (Rümenapf *et al.*, 1993; Thiel *et al.*, 1991), weniger von Bedeutung. Bei CHAPS und allen getesteten nicht ionischen Detergentien konnten keine negativen Auswirkungen festgestellt werden. Die allgemein schonende Protein-Solubilisierung durch diese Seifen ist bekannt (Hjelmeland, 1990).

Für die Prüfung des Potentials der Detergentien zur Solubilisierung der Antigene aus getrockneten Ohrstanzen (PI Tier **A2**) wurden fünf Seifen gewählt, die alle getesteten Tensid-Klassen, mit Ausnahme der ionischen Detergentien, abdeckten. Beim NS3-ELISA lag eine Probe (Inkubation mit CHAPS) im negativen Bereich, vier weitere lagen nur knapp über dem *cut off*. Die mittleren AG-Titer lagen zwischen 7,0 und 10,3. Signifikante Unterschiede bezüglich der verwendeten Seifen waren nicht zu beobachten. Allerdings war bei allen Detergentien, mit Ausnahme des Digitonins, eine große Streuung der Ergebnisse (VK zwischen 138,3 und 212,8%) erkennbar. Auch in den E^{rms}-ELISAs konnten bei der Verwendung verschiedener Seifen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, die sich in allen Tests gezeigt hätten. Die mittleren AG-Titer lagen zwischen 77,9 und >128. Hier waren jedoch deutlich geringere Streuungswerte (VK 12,1 bis 33,5%) zu beobachten. Für das E^{rms} lässt sich daraus schlussfolgern, dass das verwendete Detergens zweitrangig für die Solubilisierung ist. Die hydrophile Natur des E^{rms} und der fehlende hydrophobe Anker (Rümenapf *et al.*, 1993) erklären die leichte Freisetzbarkeit. Zudem konnte unter anderem in Solubilisierungsversuchen mit Triton X114, Triton X100 und Harnstoff gezeigt werden, dass das E^{rms} nur schwach über seinen C-terminalen Anteil an Membranen gebunden ist (Fetzer *et al.*, 2005). Das ausschließlich intrazelluläre Vorkommen des NS3 (Sopp *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2003), führte auch bei der Testung anderer Probenmaterialien (z. B. Blutleukozyten) zur Notwendigkeit einer geeigneten Probenbearbeitung, um eine maximale Sensitivität im NS3-ELISA zu erreichen (Greiser-Wilke *et al.*, 1993; Saliki und Dubovi, 2004; Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Die große Streuung der Ergebnisse in diesem Versuch ließ keine konkreten Aussagen über das Solubilisierungspotenzial einzelner Seifen für das NS3 zu.

5.1.2 Freisetzung und Isolierung der RNA

Die möglichst umfangreiche Freisetzung der Virus-RNA aus den Ohrgewebeproben stellt die Basis für eine ausreichende Ausbeute bei der Isolierung und damit für die Sensitivität des PCR-Verfahrens an sich dar. Dabei soll das Freisetzungsverfahren so einfach wie möglich sein, um auch eine Massendiagnostik zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde ein enzymatischer Verdau mittels Proteinase K-Lösung mit einer mechanischen Probenzerkleinerung in einer Laborschwingmühle anhand von Proben mehrerer PI Tiere verglichen. Die mittleren Ct-Werte nach PK-Verdau lagen zwischen 30,3 und 36,3. Die Spannen lagen zwischen 3,9 und 9,6 Zyklen, wobei eine Probe eines PI Tieres nicht als BVDV-positiv erkannt wurde. Nach Bearbeitung in der Laborschwingmühle wurden bei Proben desselben Tieren mittlere Werte von 22,3 bis 27,8 erreicht. Die Spannen betragen zwischen 1,2 und 4,9. Das mechanische Verfahren zeigte sich daher als wesentlich geeigneter für die RNA-Freisetzung. Im Schnitt lagen die Resultate der einzelnen Tiere um 7,7 Zyklen niedriger. Die höheren Ct-Werte und die stärkere Streuung der Ergebnisse nach PK-Verdau lassen sich vermutlich auf einen nicht ausreichenden Gewebeaufschluss und einen mangelnden Schutz vor RNasen zurückführen.

Für die Isolierung der RNA nach der mechanischen Homogenisierung wurden verschiedene kommerziell erhältliche Produkte getestet und verglichen. Als Puffer für die Gewebezzerkleinerung wurde der jeweilige im Kit enthaltene Binde- oder Lysispuffer verwendet. Bei Verwendung der Produkte der Firma Roche wurden vergleichsweise hohe Ct-Werte ermittelt. Die verwendeten Puffer enthielten Detergentien, die in der Laborschwingmühle zum Aufschäumen führten. Dadurch wurde vermutlich die Gewebezzerkleinerung behindert und die RNA-Freisetzung konnte somit nur unzureichend erfolgen. Die größte Ausbeute wurde mit den Kits der Firma Qiagen erzielt. Der RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit kombiniert die Guanidiniumthiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi, 1987) mit einem Säulensystem zur RNA-Bindung. Der RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit basiert auf dem Säulensystem des RNeasy[®] Mini Kits, beinhaltet aber zusätzlich einen Proteinase K- und einen DNase-Schritt. Dieser PK-Verdau des bereits zerkleinerten Gewebes, führte zu einer deutlichen Klärung des Homogenats, so dass ein weiterer Gewebeaufschluss angenommen werden kann. Weitere Versuche (Daten nicht dargestellt) bestätigten dies. Der RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit erzielte die gleiche Ausbeute an RNA, war jedoch bei der Durchführung aufwendiger. Vorteile könnte dieser Kit bei der automatischen RNA-Aufreinigung bieten, da hierfür fertige Protokolle und Automaten zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurde im Weiteren für die manuelle RNA-Isolierung der RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit verwendet.

5.2 Sensitivität und Varianzen

5.2.1 Sensitivität und Varianzen beim AG-Nachweis

Beim Nachweis der Antigene aus Ohrstanzen wurden vor allem beim NS3 erhebliche Varianzen zwischen den Proben eines PI Tieres beobachtet. Diese Variabilität könnte AG-bezogen, tierindividuell oder in Abhängigkeit vom verwendeten Detergens bzw. ELISA auftreten. Proben von PI Tieren wurden einheitlich solubilisiert und getestet. Im NS3-ELISA zeigte das Tier **K** eine niedrige Streuung (VK=15,6%) und einen mittleren AG-Titer von 1,7. Bei Tier **C** lag hingegen eine hohe Varianz (VK=130,2%) und ein mittlerer AG-Titer von 10,3 vor. Die Streuung der Proben des Tieres **B** lagen dazwischen (VK=84,5%). In den E^{ms}-ELISAs lagen die VK zwischen 9,2% und 45,3%. Bei der wiederholten Testung des Tieres **C** in verschiedenen NS3-Tests und unter Verwendung unterschiedlicher Detergentien konnte in beiden NS3-ELISAs und bei allen Seifen wiederum eine hohe Streuung (VK zwischen 115,7% und 156,3%) beobachtet werden. Die großen Schwankungen beim Nachweis des NS3 dürften daher auf eine, tierindividuell verschieden ausgeprägte, ungleichmäßige Verteilung des Analyten im Probenmaterial oder auf eine probenabhängige ungleichmäßige AG-Freisetzung zurückzuführen sein. Die hohen Varianzen bei Tier **A2** und **C** traten bei der Verwendung verschiedener Detergentien und in verschiedenen Tests auf. Daher kann die große Streuung nicht auf einer Störung eines einzelnen ELISAs beruhen. Die Gewebeproben wurden manuell mit Hilfe von Lineal und Skalpell hergestellt, so dass von einem makroskopisch einheitlichen Probenmaterial ausgegangen werden kann. Beim Nachweis des E^{ms} lagen stets relativ geringe Varianzen vor. Daraus lässt sich auf eine gleichmäßige Verteilung des Antigens im Gewebe und auf eine leichte Freisetzbarkeit des Analyten schließen. Dies dürfte wiederum in den Eigenschaften dieses Proteins begründet sein. Das E^{ms} wird im Gegensatz zum NS3 von infizierten Zellen freigesetzt und ist nur schwach an Membranen gebunden (Fetzer *et al.*, 2005; Rügenapf *et al.*, 1993).

Für einen weiteren Vergleich der Sensitivität zwischen NS3- und E^{ms}-ELISAs wurden drei Detergentien (CHAPS, Triton X100 und Digitonin) und die Proben eines Tieres (**I**) verwendet, das auch im NS3-Test geringe Varianzen zeigte. Beim Nachweis des Nichtstrukturproteins wurden mittlere AG-Titer zwischen 1,4 und 3,0 erzielt, wobei bei der Verwendung von CHAPS signifikant niedrigere Resultate erzielt wurden. In den E^{ms}-Tests ergaben sich durchschnittliche Werte zwischen 32,7 und 67,0.

Damit zeigte sich nochmals, dass alle getesteten NS3-ELISAs eine, im Vergleich zu den E^{ns}-ELISAs, geringe analytische Sensitivität besaßen. Immer wieder ergaben Proben von PI Tieren beim NS3-Nachweis negative, fragliche oder schwach positive Ergebnisse. Im Gegensatz dazu zeigten alle Tests, die E^{ns}-spezifische Antikörper enthielten, eine hohe analytische Sensitivität. Die Versuche waren dabei nicht dazu angelegt, um diesbezüglich eine Reihenfolge unter den verschiedenen Tests aufzustellen. Kein Detergens zeigte zwingend bessere Eigenschaften bei der Solubilisierung beider Antigene. Tendenziell waren bei der Verwendung von Triton X100 und Digitonin die höchsten Ergebnisse zu erzielen. Digitonin ist jedoch vergleichsweise teuer, lässt sich in den erforderlichen Konzentrationen nur schlecht lösen und fällt binnen 24h wieder aus. Deshalb wurde 1%iges Triton X100 für die weiteren Versuche als Standard-Detergens verwendet.

5.2.2 Sensitivität und Varianzen beim RNA-Nachweis

Neben den angewandten Techniken zur RNA-Freisetzung und RNA-Isolierung hat auch der verwendete *real time* RT-PCR-Assay Einfluss auf die Sensitivität der Methode. In dieser Arbeit wurden zwei in der Literatur beschriebene PCR-Systeme verglichen. Die „Pesti“-PCR (Gaede *et al.*, 2005) erzielte bei der Untersuchung verschiedener PI Tiere mittlere Ct-Werte zwischen 25,5 und 29,4. Beim „Panpesti-System 1.1“ (Hoffmann *et al.*, 2006) lagen diese Werte zwischen 22,3 und 27,8. Im Schnitt lagen die Ct-Werte beim zweiten System um 2,0 Zyklen niedriger. Die Spannen die hierbei beobachtet wurden lagen zwischen 1,2 und 4,9 Zyklen. Dies entspricht etwa einem Unterschied in der RNA-Menge um den Faktor 2 bis 30. In Bezug zum Nachweisbereich der Methode (> Faktor 10⁷), ist diese Streuung relativ gering.

5.3 Einfluss kolostraler Antikörper auf die Nachweisbarkeit des BVDV in Ohrstanzproben

In verschiedenen Studien wurde aufgezeigt, dass maternale Antikörper einen störenden Einfluss auf den Nachweis von PI Kälbern in der kolostralen Phase haben. Selbst ansonsten hoch sensitive Nachweismethoden, wie zum Beispiel die Virusisolierung aus Blutleukozyten, weisen eine deutliche Diagnostische Lücke auf (Brock *et al.*, 1998; Palfi *et al.*, 1993; Zimmer *et al.*, 2004). In dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit kolostrale Antikörper den BVDV-Nachweis in Ohrstanzproben von PI Tieren stören.

5.3.1 Einfluss kolostraler Antikörper auf den AG-Nachweis

Um prinzipielle Unterschiede bezüglich des AK-Einflusses zwischen den verschiedenen ELISA-Systemen bzw. den nachgewiesenen BVDV-Antigenen zu erkennen, wurden Stenzen eines adulten PI Tieres in AK-haltigem Serum (SNT-Titer 1:32000) eines PI Kalbes in der kolostralen Phase inkubiert. Die Ohrstanzen nahmen dabei etwa 10% ihres Gewichts an Serum auf. Mit keinem der NS3-ELISAs konnte das BVDV-Antigen bei Anwesenheit von Antikörpern nachgewiesen werden. Bei den E^{ms} nachweisenden Tests führten die Antikörper zu einer Reduktion der mittleren AG-Titer um das 2- bis 2,5fache. Jede Stanzprobe wurde jedoch als BVDV-positiv erkannt. Somit wird der Nachweis des Nichtstrukturproteins deutlich stärker inhibiert als die Detektion des Hüllproteins. Das NS3 führt im Wirtsorganismus, ebenso wie das immundominante Hüllprotein E2, zu einer starken Bildung von Antikörpern (Brown *et al.*, 2002; Deregt *et al.*, 2005; Potgieter, 1995). Diese NS3-Antikörper können das Virus jedoch nicht neutralisieren (Bolin und Ridpath, 1989; Collett, 1992; Potgieter, 1995). Der Nachweis NS3-spezifischer Antikörper in Blut- oder Milchproben, wird daher als serologisches Verfahren bei der BVD-Diagnostik eingesetzt (Beaudeau *et al.*, 2001; Greiser-Wilke *et al.*, 1999; Niskanen *et al.*, 1991; Niskanen, 1993; Paton *et al.*, 1991a). Auch das E^{ms} induziert eine Antikörperbildung. Diese ist jedoch im Vergleich zum Hauptimmunogen E2 deutlich niedriger (Boulanger *et al.*, 1991; Weiland *et al.*, 1992). Der Unterschied zwischen NS3- und E^{ms}-Nachweis bei den AK-belasteten Stanzen dürfte daher zum einen auf der quantitativen Zusammensetzung des zugegebenen Serums hinsichtlich der spezifischen Antikörper beruhen. Zum anderen könnten Unterschiede in der Bindungsstärke bei der Antigen-Antikörper-Reaktion oder in der Menge des in den Ohrstanzen enthaltenen Antigens vorhanden sein. Verschiedene Autoren bestätigen, dass der Nachweis von E^{ms} im ELISA im Vergleich zum NS3 weniger durch maternale Antikörper gestört wird (Sandvik, 2005; Schelp und Greiser-Wilke, 2003).

Zur Quantifizierung des AK-Einflusses auf die E^{ms}-Detektion wurden in einem anderem Ansatz Stenzen eines adulten PI Tieres mit verschiedenen Mengen AK-haltigen Serum versetzt und getestet. Maximal wurden 2µl zugesetzt, was etwa 1/8 der Probenmasse entsprach. Hierbei konnte der Zusammenhang zwischen AK-Menge und AG-Titer deutlich beobachtet werden. Die Reduktion der mittleren AG-Titer bei Vergleich von maximal zugesetzter Serummenge mit der Kontrolle erfolgte, je nach Test, um einen Faktor zwischen 1,2 und 6,3. Die niedrigsten Einzelwerte in den ELISAs lagen 3,5fach bis 70fach über dem *cut off*. Große Mengen maternaler Antikörper können somit die Sensitivität der E^{ms}-ELISAs durchaus soweit reduzieren, dass einzelne Proben nahe an der Nachweisgrenze bestimmter Tests liegen. Die hierbei verwendete Serummenge dürfte mit 1/8 der Probenmasse deutlich höher liegen, als dies *in natura* in Ohrgewebsproben zu erwarten sein dürfte. Das Serum zeigte einen sehr hohen Gehalt an Antikörpern (SNT-Titer 1:45255), doch sind Seren mit einem über zehnfach höheren AK-Titer bekannt (Kühne *et al.*, 2005). Deshalb kann anhand dieser Ergebnisse die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass Proben eines PI Kalbes, bei sehr guter Versorgung mit BVDV-AK-reichem Kolostrum und der Verwendung eines Tests mit niedrigerer Sensitivität, unter die Nachweisgrenze fallen könnten.

Die tatsächlichen Auswirkungen der kolostralen Phase auf den AG-Nachweis mittels ELISA, können nur durch die Untersuchung von Kälbern innerhalb der ersten Lebenswochen ausreichend geklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit standen dafür Proben von zwölf PI Kälbern zur Verfügung, die unterschiedlich stark mit kolostralen Antikörpern belastet waren. Bei der Testung von Tieren mit hohem AK-Titer (SNT: >2900) in den NS3-ELISAs konnte das Antigen in keiner Probe detektiert werden. Bei einem PI Tier, das mit dem homologen BVDV infiziert war, bei dem jedoch keine relevanten Antikörpermengen vorhanden waren, wurden im Vergleich dazu alle Proben als BVDV-positiv erkannt. In Ohrgewebeproben können somit ausreichende Mengen NS3-spezifischer Antikörper vorhanden sein, um den Nachweis des Nichtstrukturproteins vollständig zu unterbinden. Mittels E^{ms}-ELISA wurden Stanzproben von allen zwölf Tieren untersucht. Tiere mit hoher AK-Belastung erzielten durchschnittlich einen 1,3 bis 1,4fach niedrigeren AG-Titer als Kälber mit mäßigem oder niedrigem AK-Titer. Die niedrigsten Einzelwerte lagen testabhängig 13fach bis 46fach über dem *cut off*. Kühne *et al.* (2005) bestätigen die Nachweisbarkeit des E^{ms} in Ohrstanzproben von PI Tieren mit definierter kolostraler Belastung.

Die gesamte Probenserie erzielte im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen sehr hohe AG-Titer. Dies könnte am infizierenden Virus-Isolat liegen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Freisetzung der Antigene durch den Gefrier- und Auftauprozess, dem diese Proben im Feuchtzustand als einzige in dieser Arbeit ausgesetzt waren, erleichtert wurde. In einem Versuch (Daten nicht dargestellt) konnte ermittelt werden, dass vor der Trockenkonservierung gefrorene Proben einen maximal 2fach höheren AG-Titer erzielten, als frisch bearbeitete Gewebestanzungen. Da die hochtitrigen Seren (SNT: >2900) nicht austitriert und nicht mehr verfügbar waren, kann über die tatsächlich vorhandene AK-Menge keine konkrete Aussage getroffen werden. Mit den Überständen der Ohrgewebslysate wurde jedoch der Nachweis BVDV-spezifischer Antikörper durchgeführt. Hierbei konnten bei den Tieren, die auch im SNT die höchsten Titer zeigten (2299 und darüber), die höchsten Ergebnisse im AK-Blocking-ELISA gemessen werden, wobei der vom Hersteller angegebene *cut off*-Wert für Serumproben jedoch nicht als Freigabegrenze verwendet werden könnte. Bei Tieren mit niedrigerer AK-Belastung (SNT: 724 und weniger) konnte kein relevantes Blocking-Ergebnis nachgewiesen werden. Außerdem ergab sich bei der Untersuchung der Abhängigkeit von ermitteltem AG-Titer und gemessenen AK-Blocking der einzelnen Proben anhand eines einfachen linearen Regressionsmodells keine strenge Korrelation. Der ermittelte AG-Titer einzelner Proben dürfte daher nicht nur auf die probenintrinsische AK-Menge zurückzuführen sein. Auch tierindividuelle Unterschiede, wie sie bereits zuvor beschrieben wurden, haben Einfluss auf die Ergebnisse im ELISA. Die Verwendung des AK-Nachweises aus den Stanzproben als Qualitätskontrolle für den AG-ELISA ist bei Tieren mit hohen Mengen spezifischer Antikörper sicher etablierbar. Im Rahmen eines Bekämpfungsprogramms ist dies jedoch nicht zielführend. Aufgrund der initial hohen Seroprävalenz in den meisten Rinderpopulationen (Brendel *et al.*, 2005; Houe, 1995; Houe, 1999) würde ein Großteil der beprobten, BVDV-freien Kälber AK-positive und AG-negative Ergebnisse erzielen. Würde der AG-Nachweis in all diesen Fällen als nicht valide angesehen, müsste jedes dieser Tiere einer Nachkontrolle unterzogen werden. Dies würde den Kostenrahmen und den Zeitaufwand eines Kontrollverfahrens erheblich steigern sowie den Bekämpfungsfortschritt und die Akzeptanz des Programms stark verringern. Von daher ist zu fordern, dass die angewandte Testmethode für sich alleine valide Ergebnisse liefert.

5.3.2 Einfluss kolostraler Antikörper auf den RNA-Nachweis

Kolostrale Antikörper können den RNA-Nachweis mittels *real time* RT-PCR nicht direkt stören. Doch könnte es in der kolostralen Phase zu einer Reduktion der Zahl infizierter Zellen im Ohrgewebe und somit zu einer Abnahme der nachweisbaren BVDV-RNA-Menge kommen. Dies wurde anhand von zwölf Kälbern mit definierter kolostraler Belastung untersucht. Proben von Tieren mit hohem SNT-Titer (>2900) erzielten im Schnitt 1,6 bis 1,8 Zyklen höhere Ct-Werte als Kälber mit mäßiger oder niedriger AK-Belastung. Dieser Unterschied ist signifikant, jedoch nicht relevant. Die Spannen, die bei einzelnen Tieren gemessen wurden (durchschnittlich 4,0 Zyklen), übertreffen diese Differenz weit. Alle hier erzielten Werte liegen in einem Bereich, in dem auch Proben von Tieren außerhalb der kolostralen Phase lagen (vgl. 5.2). Die niedrigsten nachgewiesenen RNA-Mengen in dieser Probenserie waren immer noch etwa um den Faktor 10^4 von der Nachweisgrenze entfernt. Somit dürften tierindividuelle Unterschiede, vor allem in Bezug auf das Replikationsverhalten des infizierenden Virus im einzelnen Tier, wesentlich stärkeren Einfluss auf das Einzelergebnis haben, als die Belastung mit kolostralen Antikörpern. Immunhistologische Studien zeigten zudem, dass sich infizierte Zellen auch in der kolostralen Phase sicher in Hautgeweben nachweisen ließen (Braun *et al.*, 1999; Grooms und Keilen, 2002).

5.4 Einfluss ausgewählter Umweltfaktoren auf die Qualität der Ohrstanzproben

Bei der Gewinnung von Ohrstanzen unter Feldbedingungen könnten bestimmte Umweltfaktoren auftreten, die den Nachweis des BVDV im Probenmaterial beeinträchtigen. Der Einfluss ausgewählter Faktoren auf die BVDV-Detektion mittels ELISA bzw. *real time* RT-PCR wurde untersucht.

5.4.1 Auswirkungen ausgewählter Umwelteinflüsse auf den AG-Nachweis

Hohe Temperaturen, die eventuell bei der Lagerung oder dem Transport frisch gewonnener Ohrstanzproben auftreten, könnten die Antigene schädigen und deren Nachweis im ELISA stören. Homologe Probenserien eines PI Tieres wurden während der Eintrocknung verschiedenen Temperaturbedingungen ausgesetzt und nach der Konservierung getestet. In den NS3-ELISAs konnte das Antigen nach einer Lagerung bei 50°C nicht mehr nachgewiesen werden. Bei 37°C-Lagerung wurden vorwiegend fragliche und negative Resultate erzielt. Zwischen Proben, die bei Raumtemperatur bzw. die gefroren gelagert wurden, gab es keine signifikanten Unterschiede. Diese Proben erzielten mittlere AG-Titer von 2,0 bis 3,6. Im Gegensatz dazu konnte das E^{ms} in allen Proben nachgewiesen werden. Hohe Temperaturen hatten auch hier einen negativen Einfluss auf die Nachweisbarkeit. So lagen die mittleren AG-Titer bei 50°C-Lagerung zwischen 10,6 und 15,1, bei Raumtemperatur hingegen zwischen 38,3 und 64,6. Die Temperaturen bei der Lagerung wurden jedoch so extrem gewählt, dass sie so unter Feldbedingungen nur unter ungünstigsten Umständen auftreten sollten. Man kann daher davon ausgehen, dass die Epitope des E^{ms} unter normalen Bedingungen ausreichend stabil gegenüber thermischen Einflüssen sind. Anders ist dies beim NS3. Hier konnte wieder die labile Natur des Antigens beobachtet werden. Bei hohen Temperaturen dürfte es zur Denaturierung des Nichtstrukturproteins gekommen sein, wodurch die konformationsabhängigen Epitope zerstört wurden (Deregt *et al.*, 2005).

Bestimmte bakterielle Kontaminationen, die den Ohrstanzen anhaften, könnten zur Zerstörung der BVDV-Antigene führen, wenn vor der Eintrocknung des Gewebes genügend Zeit zur Fermentation gegeben ist. Frische Ohrstanzen wurden mit verschiedenen Keimen belastet, im Brutschrank inkubiert, eingetrocknet und getestet. In den NS3-ELISAs konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und kontaminierten Proben beobachtet werden, wobei die belasteten Stanzen eine deutlich größere Streuung der Ergebnisse zeigten. In den E^{ms}-Tests wiesen alle Proben nur eine geringe Varianz auf. Ein Großteil der belasteten Proben erreichte im Vergleich zur Kontrolle jedoch signifikant niedrigere Werte.

Die maximale Reduktion im mittleren AG-Titer erfolgte um den Faktor 3,1. Die hier beobachteten Unterschiede dürften nur zu einem Teil auf die Bakterien zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu den kontaminierten Stanzen wurden die Kontrollproben nämlich nicht im Brutschrank inkubiert. Wie zuvor dargestellt wurde, haben höhere Temperaturen jedoch negative Auswirkungen auf die Antigene. Die hier verwendeten Keimzahlen lagen in einem Bereich, der im Feld so nicht auftreten wird. Zudem muss vom verwendeten Probennahmesystem gefordert werden, dass das Ohrgewebe so schnell trockenkonserviert wird, dass eine nennenswerte Keimvermehrung, wie hier durch die Inkubation im Brutschrank, nicht stattfinden kann.

5.4.2 Auswirkungen ausgewählter Umwelteinflüsse auf den RNA-Nachweis

Bestimmte Temperaturbedingungen könnten durch die Aktivierung abbauender Enzyme dazu führen, dass die BVDV-RNA in den noch nicht getrockneten Stanzen geschädigt wird. Um den Temperatureinfluss zu prüfen, wurden homologe Probenserien eines PI Tieres vor der Eintrocknung verschiedenen Temperaturbedingungen ausgesetzt und nach der Konservierung getestet. Die mittleren Ct-Werte unter allen Lagerungsbedingungen lagen zwischen 22,1 und 22,8. Eine negative Beeinflussung konnte bei keiner Temperatur beobachtet werden.

Auch bei der Überprüfung des Einflusses bakterieller Kontaminationen konnten zwischen belasteten Proben und der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die kontaminierten Proben zeigten mittlere Ct-Werte zwischen 22,5 und 24,5, wobei die Kontrolle im Durchschnitt bei 23,6 lag.

Diese Ergebnisse sprechen für eine stabile Konservierung der nachgewiesenen BVDV-RNA im getrockneten Ohrgewebe. Diese Stabilität wäre bei einem RNA-Genom so eventuell nicht zu erwarten. Die mit den verwendeten PCR-Protokollen nachgewiesene 5'UTR zeigt jedoch besondere Eigenschaften. Konservierte Sequenzen dieses Genomabschnittes sind zueinander komplementär, binden aneinander und bilden haarnadelförmige Schleifen (Deng und Brock, 1993). Diese interagieren wiederum untereinander, so dass eine komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur entsteht (Le *et al.*, 1998). Diese dürfte ganz wesentlich an der stabilen Konservierung dieses Bereichs, der in der *real time* RT-PCR nachgewiesen wird, beteiligt sein.

Fäkale Kontaminationen sollten keinen negativen Einfluss auf die RNA haben, doch könnten sie Inhibitoren enthalten, die die Reverse Transkription bzw. die PCR stören. Um zu prüfen, inwieweit solche Hemmstoffe bei der RNA-Isolierung entfernt werden oder wie stark sie die RT-PCR inhibieren, wurden aliquotierte Probenhomogenate vor der RNA-Aufreinigung mit verschiedenen Mengen Kot belastet. Deutlich konnte der Anstieg der Ct-Werte in Abhängigkeit von der zugesetzten Kotmenge beobachtet werden. Maximal wurde bei einer Einzelprobe ein Ct-Wert von 32,6 erreicht. Die Waschschrte bei der RNA-Isolierung führten somit nicht zu einer vollständigen Entfernung der Inhibitoren. Zwischen maximaler Kontamination und Kontrolle lagen im Schnitt 6,3 Zyklen. Bei Verdünnung der RNA-Eluate von belasteten Proben konnten, trotz zehnfach geringerer RNA-Menge, um 0,7 Zyklen niedrigere Ct-Werte erreicht werden. Daraus lässt sich zum einen schließen, dass die RNA-Isolierung ohne Einbußen abgelaufen ist. Zum anderen zeigte sich, dass Inhibitoren bei verdünnten Proben, wie sie auch bei der Pooluntersuchung vorkommen (vgl. 5.5), weniger kritisch betrachtet werden müssen. Die hier eingesetzten Kotmengen entsprachen teilweise dem mehrfachen Volumen einer Ohrstanze und dürften deshalb in diesem Ausmaß als Kontamination im Feld nicht vorkommen. Aufgrund dieser Beobachtungen kann somit davon ausgegangen werden, dass Kotkontaminationen keinen entscheidenden Einfluss auf den RNA-Nachweis mittels *real time* RT-PCR haben. Zusätzlich könnte mit Hilfe von internen Kontrollen der Ablauf der RT-PCR überprüft werden, um die Ergebnisse diesbezüglich abzusichern.

5.5 Eignung für die Massendiagnostik

Die Einzeluntersuchung von Ohrstanzproben mittels *real time* RT-PCR ist relativ kosten- und zeitintensiv und damit für die Massendiagnostik weniger geeignet. Die Poolung von Proben wurde in der PCR-Diagnostik bereits mehrfach zur Kosten- und Arbeitsreduktion angewandt (Bendfeldt *et al.*, 2005; Gaede *et al.*, 2003; Weinstock *et al.*, 2001). Auch bei Ohrstanzproben wurde dies durchgeführt (Kennedy *et al.*, 2006). Die hohe Sensitivität des Verfahrens sollte es ermöglichen, einzelne PI Tiere auch in Poolproben sicher zu erkennen. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Verfahren könnte die Poolung der Proben auf Ebene der Homogenate aus der Laborschwingmühle schnell und einfach erfolgen. Dies würde zu einer erheblichen Kostenreduktion bei der RNA-Isolierung und den PCR-Reagenzien führen. Um dies zu untersuchen wurden 10er Pools mit Proben verschiedener PI Tieren gebildet (ein PI Tier auf neun BVDV-freie Tiere) und getestet. Im Mittel ergaben die gepoolten Proben um 1,2 Zyklen höhere Ct-Werte als die einzeln getesteten Proben. Dies könnte auf der begrenzten RNA-Bindekapazität der Silica-Membran des Isolierungskits beruhen. Bezogen auf die hohe Sensitivität des Gesamtverfahrens stellt dies jedoch einen nicht relevanten Verlust dar, da der Pool mit dem höchsten Ct-Wert etwa um den Faktor 10^4 von der Nachweisgrenze entfernt lag. Für den Fall der Auflösung eines positiven Pools, muss die Virus-RNA ausreichende Zeit im Gewebehomogenat stabil bleiben, um die Proben einzeln sicher zu diagnostizieren. Probenhomogenate verschiedener PI Tiere wurden sofort und nach 24stündiger Lagerung bei 4°C getestet. Die gelagerten Proben zeigten im Mittel 0,3 Zyklen höhere Ct-Werte. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Die RNA im Homogenat zeigte sich somit als ausreichend stabil. Dies dürfte einerseits auf einer Stabilisierung durch die komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur der 5'UTR beruhen (Deng und Brock, 1993; Le *et al.*, 1998), andererseits enthält der für die Homogenisierung verwendete Puffer das chaotrope Salz Guanidiniumthiozyanat, das durch Proteindenaturierung (inklusive RNasen) eine protektive Wirkung auf die RNA hat (Farrel, 1993).

Die Pooluntersuchung von Ohrstanzproben mittels *real time* RT-PCR stellt somit ein geeignetes Instrument zur kostengünstigen und sicheren Detektion von PI Tieren dar. Bei der Verwendung von E^{ms}-ELISAs kommt wegen der niedrigeren Sensitivität nur die Untersuchung einzelner Proben in Frage. Dies sollte aufgrund der geringeren Kosten und der einfachen Automatisierbarkeit dieses Verfahrens jedoch leicht durchzuführen sein.

5.6 Schlussfolgerungen

Die im Rahmen dieser Arbeit überprüften Verfahren sind für den BVDV-Nachweis in getrockneten Ohrstanzen von jungen PI Kälber unterschiedlich gut geeignet.

Für das NS3 konnte gezeigt werden, dass die verfügbaren ELISAs eine zu geringe Sensitivität besitzen, um das Antigen sicher nachzuweisen. Zudem konnte beobachtet werden, dass sich die konformationsabhängigen Epitope relativ instabil verhalten, wenn sie höheren Temperaturen oder bestimmten Detergentien ausgesetzt werden. In den Ohrgewebeproben von Tieren in der kolostralen Phase können ausreichend maternale Antikörper enthalten sein, um den NS3-Nachweis vollkommen zu unterbinden.

Im Gegensatz dazu zeigten E^{ms}-ELISAs eine hohe analytische Sensitivität. Dieses Antigen besitzt stabile Epitope und lässt sich leicht und konstant aus dem Probenmaterial freisetzen. Außerdem wird sein Nachweis im ELISA relativ wenig durch kolostrale Antikörper beeinträchtigt. Ob die Sensitivität des Systems beim Zusammentreffen ungünstiger Bedingungen (z. B. Aufnahme großer Mengen AK-reichen Kolostrums, ein sich wenig replizierendes Virus und unpassende Lagerung) genügt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht ausreichend beantwortet werden.

Der RNA-Nachweis mittels *real time* RT-PCR zeigte die höchste analytische Sensitivität. Die 5'UTR stellte sich dabei als stabiler Analyt dar, der durch ein mechanisches Verfahren in Kombination mit einem kommerziellen Isolierungskit leicht freizusetzen und aufzureinigen ist. Maternale Antikörper oder hohe Temperaturen haben keinen nennenswerten Einfluss auf die Nachweisbarkeit. Durch die hohe Sensitivität der Methode ist ein Poolen von Proben möglich. Bei dem hier etablierten Bearbeitungsverfahren ist dies leicht und sicher auf Ebene der Homogenate aus der Laborschwingmühle möglich. Dies führt zu einer erheblichen Reduktion der Kosten und der Arbeitszeit. Zudem verlieren Inhibitoren, die einzelnen Proben anhaften könnten, durch diese Verdünnung an Bedeutung. Die Poolgröße wird dabei nicht durch die Sensitivität der Methode bestimmt werden, sondern durch die Prävalenz der PI Tiere in der Rinderpopulation, die zum Auflösen der Pools führen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei Methoden (E^{ms}-ELISA und *real time* RT-PCR) mit ausreichender analytischer Sensitivität zur Verfügung stehen, um PI Tiere jeden Alters sicher anhand von Ohrstanzproben zu erkennen. Die Überprüfung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität der Ohrstanzdiagnostik im Rahmen eines Bekämpfungsprogrammes lässt sich indessen nur durch breit angelegte Feldstudien mit statistisch ausreichenden Probenzahlen und geeigneten Kontrollmaßnahmen erreichen.

6. Zusammenfassung

Die frühe Detektion von persistent BVDV infizierten (PI) Rindern stellt die Grundlage für die Ausrottung dieses Erregers aus den Nutztierbeständen dar. Trockenkonservierte Ohrstanzen, die im Rahmen der Tiermarkierung gewonnen werden können, stellen als Probenmaterial einen neuen Ansatzpunkt für die Diagnostik neugeborener PI Kälbern dar. Ziele dieser Arbeit waren die Etablierung von Methoden zur Antigen- und RNA-Freisetzung bzw. -Isolierung aus Ohrstanzen, der Vergleich der analytischen Sensitivität verschiedener Testsysteme und die Untersuchung der Stabilität der Analyten gegenüber Umwelteinflüssen. Kommerzielle NS3-, E^{ms}- und Antigen-Mix-ELISAs, ein AK-Blocking-ELISA und zwei *real time* RT-PCR-Systeme zum Nachweis der 5'UTR wurden zum BVDV-Nachweis verwendet. Als Untersuchungsmaterial dienten Ohrgewebeserien von neun BVDV-Antikörper-freien PI Tieren (BVDV-I CR4043) und zwölf neugeborenen PI Kälbern (BVDV-1 PT810) in der kolostralen Phase.

Zur Solubilisierung der BVDV-Antigene stellten sich SDS, Deoxycholat und EMPIGEN als unbrauchbar heraus. Von den geeigneten Tensiden (CHAPS, Triton X100, Nonidet P-40, Tween 20, OGP und Digitonin) wurde Triton X100 in 1%iger Konzentration als Standard-Detergens verwendet. Die höchste Ausbeute bei der RNA-Isolierung wurde bei der mechanischen Probenzerkleinerung in einer Laborschwingmühle, unter Verwendung eines Guanidiniumthiozyanat-haltigen Puffers und bestimmten Qiagen RNeasy[®] Kits (Fibrous Tissue Mini Kit und Lipid Tissue Mini Kit) zur RNA-Isolierung erzielt. Produkte der Firma Roche waren weniger geeignet.

NS3-ELISAs zeigten bei der Untersuchung von Ohrstanzen eine geringe analytische Sensitivität, maternale Antikörper führten zu negativen Ergebnissen. Zudem zeigten sich die NS3-Epitope instabil gegenüber höheren Temperaturen. Im Gegensatz dazu zeigten E^{ms}-ELISAs eine hohe analytische Sensitivität. Proben von Antikörper-freien PI Tiere erzielten mittlere AG-Titer von über 30. Kolostrale Antikörper hatten einen geringeren Einfluss auf E^{ms}-ELISAs. Der niedrigste AG-Titer bei PI Kälbern in der kolostralen Phase lag bei 13. Hohe Lagerungstemperaturen führten zu einer geringen Titer-Reduktion. Die Ergebnisse der *real time* RT-PCR lagen mehr als 10⁴mal über der Nachweisgrenze, auch bei PI Kälbern in der kolostralen Phase. Bakterielle und fäkale Kontaminationen hatten keinen relevanten Einfluss auf die Stabilität und Nachweisbarkeit des E^{ms} und der 5'UTR.

Der E^{ms}-Nachweis mittels ELISA und die *real time* RT-PCR scheinen aufgrund ihrer analytischen Sensitivität sehr gut für den Nachweis persistent BVDV infizierter Tiere jeden Alters geeignet zu sein. Die Überprüfung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität der Ohrstanz-Diagnostik im Rahmen eines BVDV-Bekämpfungsprogrammes kann indessen nur durch breit angelegte Feldstudien mit ausreichenden Probenzahlen und geeigneten Kontrollmaßnahmen erreicht werden.

Development and evaluation of diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus in dried ear biopsy samples using antigen-ELISAs and real time RT-PCR

Early detection and elimination of cattle persistently infected (PI) with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a key element for eradication programs. Testing dried skin biopsies derived from ear tagging might be useful for detection of BVDV in newborn calves. The aims of this study were the development of methods for antigen solubilization and RNA preparation, the investigation of the stability of these viral components and the comparison of the analytical sensitivity of different tests. Commercial antigen capture ELISAs for NS3, E^{ms} and mixed antigens, a blocking ELISA for BVDV antibodies and two real time RT-PCR assays for 5'UTR were used as BVDV specific tests. Ear biopsies were collected from nine BVDV antibody free PI animals (infected with BVDV-I CR4043) after slaughter and from twelve PI calves (fetal infection with BVDV-I PT810) after euthanasia at the age of 5-13 days in the time of colostral antibodies.

For solubilization of the BVDV antigens the detergents dodecyl sulfate, sodium deoxycholate and EMPIGEN were inappropriate. Out of the suitable detergents (CHAPS, Triton X100, Nonidet P-40, Tween 20, n-Octyl- β -D-glucopyranoside and Digitonin) Triton X100 in a concentration of 1% was chosen for antigen solubilization. Best RNA yield was obtained using a mixer mill and a guanidine thiocyanate containing buffer, followed by RNA isolation with Qiagen RNeasy[®] kits (Fibrous Tissue Mini Kit and Lipid Tissue Mini Kit). RNA isolation kits provided by Roche were less efficient.

NS3-ELISAs were of low analytical sensitivity for ear biopsies, maternal antibodies led to negative results. In addition NS3 epitopes are very heat sensitive. In contrast E^{ms}-ELISAs showed high analytical sensitivity. Samples of PI animals without maternal antibodies gave mean titers above 30. Maternal antibodies had limited effects. In samples of nine PI animals with colostral antibodies the lowest titer was 13. Relevant temperatures by sample drying and storage led to minor titer reductions. The real time RT-PCR resulted in a sensitivity more than 10⁴ fold over the detection limit, even in calves in the time of neutralizing antibodies. Bacterial or fecal contamination before sample drying had no relevant influence on the stability of E^{ms} and 5'UTR RNA.

E^{ms}-ELISAs and real time RT-PCR seem to be suitable for detecting BVDV in dried ear notch samples of PI animals. Before appliance in BVDV eradication programs, the diagnostic sensitivity and specificity of tests using ear biopsies have to be evaluated by studies in the field with an adequate number of samples and an appropriate monitoring.

7. Literatur

- Afshar, A., Dulac, G. C., Dubuc, C. und Howard, T. H., 1991:** Comparative evaluation of the fluorescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhoea virus from bull semen.
Can. J. Vet. Res. 55, 91-93.
- Ames, T. R., 1986:** The causative agent of BVD: Its epidemiology and pathogenesis.
Vet. Med. 81, 848-869.
- Archbald, L. F., Gibson, C. D., Schultz, R. H., Fahning, M. L. und Zemjanis, R., 1973:** Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows.
Am. J. Vet. Res. 34, 1133-1137.
- Arnal, M., Fernandez-de-Luco, D., Riba, L., Maley, M., Gilray, J., Willoughby, K., Vilcek, S. und Nettleton, P. F., 2004:** A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*).
J. Gen. Virol. 85, 3653-3657.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H. J. und Becher, P., 2001:** Evidence for the presence of two novel pestivirus species.
Virology 286, 456-465.
- Baker, J. C., 1987:** Bovine viral diarrhoea virus: a review.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 190, 1449-1458.
- Baker, J. C., 1995:** The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 425-445.
- Beaudeau, F., Belloc, C., Seegers, H., Assie, S., Sellal, E. und Joly, A., 2001:** Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk.
Vet. Microbiol. 80, 329-337.
- Becher, P., Meyers, G., Shannon, A. D. und Thiel, H. J., 1996:** Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome.
J. Virol. 70, 2992-2998.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A. D., Horner, G., König, M. und Thiel, H. J., 1997:** Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants.
J. Gen. Virol. 78, 1357-1366.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. und Thiel, H. J., 1999:** Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification.
Virology 262, 64-71.

- Becher, P., König, M. und Thiel, H.,** 2001: Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease: Molekularbiologie des Erregers, Pathogenese, Labordiagnostik und Bekämpfung. Tierärztl. Prax. 29, 266-275.
- Becher, P., Thiel, H. J., Collins, M., Brownlie, J. und Orlich, M.,** 2002: Cellular sequences in pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric acid (A) receptor-associated protein and Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. J. Virol. 76, 13069-13076.
- Becher, P., Avalos, Ramirez R., Orlich, M., Cedillo, Rosales S., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirmer, H. und Thiel, H. J.,** 2003: Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. Virology 311, 96-104.
- Beer, M. und Wolf, G.,** 1999: Selektion von BVDV-Genotyp-II-Isolaten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers und FACS-Analyse. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 112, 345-350.
- Beer, M., Wolf, G. und Kaaden, O. R.,** 2002: Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of german BVDV type II isolates. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 49, 43-47.
- Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H. J., Meyers, G. und Tautz, N.,** 1998: Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. J. Virol. 72, 2364-2372.
- Belak, S. und Ballagi-Pordany, A.,** 1991: Bovine viral diarrhea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. Arch. Virol. Suppl. 3, 181-190.
- Bendfeldt, S., Flebbe, U., Fritzemeier, J., Greiser-Wilke, I., Grummer, B., Haas, L., Orban, S., Peters, E., Timm, D. und Moening, V.,** 2005: Untersuchung von Sammelmilchproben mittels Polymerasekettenreaktion: Eine ergänzende Methode für die BVD-Überwachung. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 112, 130-135.
- Bhudevi, B. und Weinstock, D.,** 2001: Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. Vet. Microbiol. 83, 1-10.
- Bhudevi, B. und Weinstock, D.,** 2003: Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). J. Virol. Methods 109, 25-30.
- Bielefeldt Ohmann, H. und Bloch, B.,** 1982: Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. Arch. Virol. 71, 57-74.
- Bielefeldt Ohmann, H.,** 1983: Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease: distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves. Res. Vet. Sci. 34, 5-10.

- Bielefeldt Ohmann, H., Ronsholt, L. und Bloch, B.,** 1987: Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle.
J. Gen. Virol. 68, 1971-1982.
- Bielefeldt Ohmann, H.,** 1988: BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease.
Acta Vet. Scand. 29, 77-84.
- Bielefeldt Ohmann, H.,** 1990: Electron microscopy of bovine virus diarrhoea virus.
Rev. Sci. Tech. 9, 61-73.
- Bielefeldt Ohmann, H.,** 1995: The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection. A window on the pathogenesis.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 447-476.
- Bolin, S. R., McClurkin, A. W., Cutlip, R. C. und Coria, M. F.,** 1985: Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus.
Am. J. Vet. Res. 46, 573-576.
- Bolin, S. R.,** 1988: Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhoea virus.
Am. J. Vet. Res. 49, 1040-1044.
- Bolin, S., Moennig, V., Kelso Gourley, N. E. und Ridpath, J.,** 1988: Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhoea virus into groups.
Arch. Virol. 99, 117-123.
- Bolin, S. R. und Ridpath, J. F.,** 1989: Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines.
Am. J. Vet. Res. 50, 817-821.
- Bolin, S. R. und Ridpath, J. F.,** 1990: Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines.
Am. J. Vet. Res. 51, 703-707.
- Bolin, S. R.,** 1995: The pathogenesis of mucosal disease.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 489-500.
- Boulanger, D., Waxweiler, S., Karelle, L., Loncar, M., Mignon, B., Dubuisson, J., Thiry, E. und Pastoret, P. P.,** 1991: Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum.
J. Gen. Virol. 72, 1195-1198.

- Branza-Nichita, N., Durantel, D., Carrouee-Durantel, S., Dwek, R. A. und Zitzmann, N.,** 2001: Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhoea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers.
J. Virol. 75, 3527-3536.
- Branza-Nichita, N., Lazar, C., Durantel, D., Dwek, R. A. und Zitzmann, N.,** 2002: Role of disulfide bond formation in the folding and assembly of the envelope glycoproteins of a pestivirus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 296, 470-476.
- Branza-Nichita, N., Lazar, C., Dwek, R. A. und Zitzmann, N.,** 2004: Role of N-glycan trimming in the folding and secretion of the pestivirus protein E(rns).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 319, 655-662.
- Braun, U., Thür, B., Weiss, M. und Giger, T.,** 1996: Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease beim Rind - Klinische Befunde bei 103 Kälbern und Rindern.
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 138, 465-475.
- Braun, U., Schonmann, M., Ehrensperger, F., Hilbe, M. und Strasser, M.,** 1999: Intrauterine infection with bovine virus diarrhoea virus on alpine communal pastures in Switzerland.
Zentralbl. Veterinärmed. A 46, 13-17.
- Brendel, T., Gerbermann, H., Zenk, A., Forster, U., Kaaden, O.-R. und Wolf, G.,** 2005: Prävalenz und epidemiologische Gesichtspunkte der Bovinen Virusdiarrhö Virus (BVDV)-Infektion in bayrischen Rinderherden.
Tierärztl. Umschau 60, 250-258.
- Brinkhof, J., Zimmer, G. und Westenbrink, F.,** 1996: Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle.
Vet. Microbiol. 50, 1-6.
- Brock, K. V.,** 1991: Detection of persistent bovine viral diarrhoea virus infections by DNA hybridization and polymerase chain reaction assay.
Arch. Virol. Suppl. 3, 199-208.
- Brock, K. V., Redman, D. R., Vickers, M. L. und Irvine, N. E.,** 1991: Quantitation of bovine viral diarrhoea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer.
J. Vet. Diagn. Invest. 3, 99-100.
- Brock, K. V., Deng, R. und Riblet, S. M.,** 1992: Nucleotide sequencing of 5' and 3' termini of bovine viral diarrhoea virus by RNA ligation and PCR.
J. Virol. Methods 38, 39-46.
- Brock, K. V.,** 1995: Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 549-561.

- Brock, K. V., Grooms, D. L., Ridpath, J. und Bolin, S. R.,** 1998: Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 22-26.
- Brock, K. V.,** 2003: The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals* 31, 133-135.
- Brodersen, B. W.,** 2004: Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20, 85-93.
- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H. und Lemon, S. M.,** 1992: Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* 20, 5041-5045.
- Brown, L. M., Papa, R. A., Frost, M. J., Mackintosh, S. G., Gu, X., Dixon, R. J. und Shannon, A. D.,** 2002: A single amino acid is critical for the expression of B-cell epitopes on the helicase domain of the pestivirus NS3 protein. *Virus Res.* 84, 111-124.
- Brown, T. T., De Lahunte, A., Scott, F. W., Kahrs, R. F., McEntee, K. und Gillespie, J. H.,** 1973: Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. II. Histopathology of cerebellar degeneration (hypoplasia) induced by the virus of bovine viral diarrhoea-mucosal disease. *Cornell Vet.* 63, 561-578.
- Brownlie, J., Clarke, M. C. und Howard, C. J.,** 1984: Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 114, 535-536.
- Brownlie, J., Clarke, M. C., Howard, C. J. und Pocock, D. H.,** 1987: Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. *Ann. Rech. Vet.* 18, 157-166.
- Brownlie, J.,** 1990a: Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 23, 371-382.
- Brownlie, J.,** 1990b: The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech.* 9, 43-59.
- Brownlie, J.,** 1991: The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 79-96.
- Brownlie, J. und Clarke, M. C.,** 1993: Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis. *Intervirology* 35, 51-59.

- Brownlie, J., Hooper, L. B., Thompson, I. und Collins, M. E.,** 1998: Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) - the bovine pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.* 10, 141-150.
- Bruschke, C. J., Weerdmeester, K., Van Oirschot, J. T. und Van Rijn, P. A.,** 1998: Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet. Microbiol.* 64, 23-32.
- Callan, R. J. und Garry, F. B.,** 2002: Biosecurity und bovine respiratory disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 18, 57-77.
- Carlsson, U., Fredriksson, G., Alenius, S. und Kindahl, H.,** 1989: Bovine virus diarrhoea virus, a cause of early pregnancy failure in the cow. *Zentralbl. Veterinärmed. A* 36, 15-23.
- Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., Tremblay, R., Bolin, S., Godkin, A. und Anderson, N.,** 1998: Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 27-35.
- Castrucci, G., Frigeri, F., Osburn, B. I., Ferrari, M., Sawyer, M. M. und Aldrovandi, V.,** 1990: A study of some pathogenetic aspects of bovine viral diarrhoea virus infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 41-49.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.,** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Chon, S. K., Perez, D. R. und Donis, R. O.,** 1998: Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 251, 370-382.
- Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K. und Retzel, E.,** 1988a: Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208.
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. und Purchio, A. F.,** 1988b: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191-199.
- Collett, M. S., Moennig, V. und Horzinek, M. C.,** 1989: Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.* 70, 253-266.
- Collett, M. S., Wiskerchen, M., Welniak, E. und Belzer, S. K.,** 1991: Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 19-27.

- Collett, M. S.**, 1992: Molecular genetics of pestiviruses.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 15, 145-154.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. und Dubovi, E. J.**, 1990a: Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus.
Am. J. Vet. Res. 51, 1388-1394.
- Corapi, W. V., Elliott, R. D., French, T. W., Arthur, D. G., Bezek, D. M. und Dubovi, E. J.**, 1990b: Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 196, 590-596.
- Coria, M. F. und McClurkin, A. W.**, 1978: Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 172, 449-451.
- Cornish, T. E., van Olphen, A. L., Cavender, J. L., Edwards, J. M., Jaeger, P. T., Vieyra, L. L., Woodard, L. F., Miller, D. R. und O'Toole, D.**, 2005: Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.
J. Vet. Diagn. Invest. 17, 110-117.
- Da Silva, N., Zardoya, R., Santurde, G., Solana, A. und Castro, J. M.**, 1995: Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen.
J. Virol. Methods 55, 209-218.
- David, G. P., Crawshaw, T. R., Gunning, R. F., Hibberd, R. C., Lloyd, G. M. und Marsh, P. R.**, 1994: Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with BVD virus infection.
Vet. Rec. 134, 468-472.
- Deng, R. und Brock, K. V.**, 1992: Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1.
Virology 191, 867-879.
- Deng, R. und Brock, K. V.**, 1993: 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses.
Nucleic Acids Res. 21, 1949-1957.
- Deregt, D., Masri, S. A., Cho, H. J. und Bielefeldt Ohmann, H.**, 1990: Monoclonal antibodies to the p80/125 gp53 proteins of bovine viral diarrhoea virus: their potential use as diagnostic reagents.
Can. J. Vet. Res. 54, 343-348.
- Deregt, D., Carman, P. S., Clark, R. M., Burton, K. M., Olson, W. O. und Gilbert, S. A.**, 2002: A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young calves.
J. Vet. Diagn. Invest. 14, 433-437.

- Deregt, D., Dubovi, E. J., Jolley, M. E., Nguyen, P., Burton, K. M. und Gilbert, S. A.,** 2005: Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus.
Vet. Microbiol. 108, 13-22.
- Done, J. T., Terlecki, S., Richardson, C., Harkness, J. W., Sands, J. J., Patterson, D. S., Sweasey, D., Shaw, I. G., Winkler, C. E. und Duffell, S. J.,** 1980: Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection.
Vet. Rec. 106, 473-479.
- Donis, R. O. und Dubovi, E. J.,** 1987a: Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus.
Virology 158, 168-173.
- Donis, R. O. und Dubovi, E. J.,** 1987b: Glycoproteins of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in infected bovine cells.
J. Gen. Virol. 68, 1607-1616.
- Donis, R. O. und Dubovi, E. J.,** 1987c: Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes.
Am. J. Vet. Res. 48, 1549-1554.
- Donis, R. O., Corapi, W. und Dubovi, E. J.,** 1988: Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein.
J. Gen. Virol. 69, 77-86.
- Donis, R. O., Corapi, W. V. und Dubovi, E. J.,** 1991: Bovine viral diarrhoea virus proteins and their antigenic analyses.
Arch. Virol. Suppl. 3, 29-40.
- Donis, R. O.,** 1995: Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 393-423.
- Doyle, L. G. und Heuschele, W. P.,** 1983: Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 1257-1259.
- Drew, T. W., Yapp, F. und Paton, D. J.,** 1999: The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR.
Vet. Microbiol. 64, 145-154.
- DuBois, R., Cooper, V. L., Duffy, J. C., Dean, D. D., Ball, R. L. und Starr, B. D. Jr.,** 2000: A preliminary evaluation of the effect of vaccination with modified live Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) on detection of BVDV Antigen in skin biopsies using immunohistochemical methods.
The bovine practitioner 34, 98-100.

- Duffell, S. J. und Harkness, J. W.,** 1985: Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle.
Vet. Rec. 117, 240-245.
- Easton, L. A., Vilcek, S. und Nettleton, P. F.,** 1994: Evaluation of a 'one tube' reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of ruminant pestiviruses.
J. Virol. Methods 50, 343-348.
- Edwards, S., Sands, J. J. und Harkness, J. W.,** 1988: The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain.
Arch. Virol. 102, 197-206.
- Edwards, S.,** 1990: The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle.
Rev. Sci. Tech. 9, 115-130.
- Edwards, S., Moennig, V. und Wensvoort, G.,** 1991: The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses.
Vet. Microbiol. 29, 101-108.
- Edwards, S. und Paton, D.,** 1995: Antigenic differences among pestiviruses.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 563-577.
- Ellis, J. A., Martin, K., Norman, G. R. und Haines, D. M.,** 1995: Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death.
J. Vet. Diagn. Invest. 7, 433-436.
- Ellis, J. A., West, K. H., Cortese, V. S., Myers, S. L., Carman, S., Martin, K. M. und Haines, D. M.,** 1998: Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhoea virus-type II.
Can. J. Vet. Res. 62, 161-169.
- Entrican, G., Dand, A. und Nettleton, P. F.,** 1995: A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep.
Vet. Microbiol. 43, 65-74.
- Failla, C., Tomei, L. und De Francesco, R.,** 1994: Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins.
J. Virol. 68, 3753-3760.
- Farrel, R. E. Jr.,** 1993: Resilient Ribonucleases. In: RNA Methodologies. San Diego, Academic Press, 32-45.
- Fenton, A., Nettleton, P. F., Entrican, G., Herring, J. A., Malloy, C., Greig, A. und Low, J. C.,** 1991: Identification of cattle infected with bovine virus diarrhoea virus using a monoclonal antibody capture ELISA.
Arch. Virol. Suppl. 3, 169-174.

- Fernandez, A., Hewicker, M., Trautwein, G., Pohlenz, J. und Liess, B., 1989:** Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.
Vet. Pathol. 26, 26-32.
- Ferrari, M., 1985:** Susceptibility of various cell culture systems to bovine viral diarrhoea virus.
Microbiologica 8, 17-22.
- Fetzer, C., Tews, B. A. und Meyers, G., 2005:** The carboxy-terminal sequence of the pestivirus glycoprotein E(rns) represents an unusual type of membrane anchor.
J. Virol. 79, 11901-11913.
- Fletcher, S. R., Ali, I. K., Kaminski, A., Digard, P. und Jackson, R. J., 2002:** The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes.
RNA 8, 1558-1571.
- Flores, E. F., Ridpath, J. F., Weiblen, R., Vogel, F. S. und Gil, L. H., 2002:** Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2.
Virus Res. 87, 51-60.
- Fray, M. D., Mann, G. E., Clarke, M. C. und Charleston, B., 1999:** Bovine viral diarrhoea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow.
Theriogenology 51, 1533-1546.
- Fray, M. D., Mann, G. E., Clarke, M. C. und Charleston, B., 2000:** Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow.
Vet. Microbiol. 77, 185-194.
- Fray, M. D., Mann, G. E., Bleach, E. C., Knight, P. G., Clarke, M. C. und Charleston, B., 2002:** Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus.
Reproduction 123, 281-289.
- Fredriksen, B., Press, C. M., Loken, T. und Odegaard, S. A., 1999:** Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus.
Vet. Microbiol. 64, 109-122.
- Fritzemeier, J., Greiser-Wilke, I., Haas, L., Pituco, E., Moennig, V. und Liess, B., 1995:** Experimentally induced "late-onset" mucosal disease - characterization of the cytopathogenic viruses isolated.
Vet. Microbiol. 46, 285-294.
- Fritzemeier, J., Haas, L., Liebler, E., Moennig, V. und Greiser-Wilke, I., 1997.** The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms.
Arch. Virol. 142, 1335-1350.

- Fulton, R. W., Hessman, B., Johnson, B. J., Ridpath, J. F., Saliki, J. T., Burge, L. J., Sjeklocha, D., Confer, A. W., Funk, R. A. und Payton, M. E., 2006:** Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 578-584.
- Gaede, W., Gehrman, B. und Korber, R., 2003:** BVD-Virämikereliminierung: Effektives Herdensingreening durch Kombination von RT-PCR und Antigen-ELISA in Blut- und Milchproben. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 116, 234-239.
- Gaede, W., Reiting, R., Schirrmeier, H., Depner, K. R. und Beer, M., 2005:** Nachweis und Spezies-spezifische Differenzierung von Pestiviren mit der real time RT-PCR. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 118, 113-120.
- Gillespie, J. H., BAKER, J. A. und McEntee, K., 1960:** A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.* 50, 73-79.
- Givens, M. D., Heath, A. M., Carson, R. L., Brock, K. V., Edens, M. S., Wenzel, J. G. und Stringfellow, D. A., 2003:** Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in semen samples from the Southeastern United States. *Vet. Microbiol.* 96, 145-155.
- Gottschalk, E. E., Greiser-Wilke, I., Frey, H. R., Liess, B. und Moennig, V., 1992:** An antigen capture test for the detection of cattle viremic with bovine viral diarrhoea virus - a comparison with BVD virus isolation from buffy coat cells in bovine kidney cells. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 39, 467-472.
- Goyal, S. M., Bouljihad, M., Haugerud, S. und Ridpath, J. F., 2002:** Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 523-525.
- Goyal, S. M., 2005:** Diagnosis. In: *Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control*, Goyal, S. M. und Ridpath, J. F., eds., Iowa, Blackwell Publishing, 197-208.
- Graham, D. A., McLaren, I. E. und German, A., 1998:** Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing. *Vet. J.* 156, 149-154.
- Grassmann, C. W., Isken, O. und Behrens, S. E., 1999:** Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J. Virol.* 73, 9196-9205.
- Gray, E. W. und Nettleton, P. F., 1987:** The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J. Gen. Virol.* 68, 2339-2346.

- Greiser-Wilke, I., Frey, H. R., Bottcher, J., Liess, B. und Moennig, V.,** 1993: Anwendung eines modifizierten "Antigen-Capture"-Enzym-Immuntests zur Identifizierung persistent mit dem Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVD) infizierter Rinder. *Tierärztl. Prax.* 21, 302-305.
- Greiser-Wilke, I., Frey, H.-R. und Moennig, V.,** 1999: Erfahrungen mit einem Antikörper-ELISA für die Untersuchung von Tankmilch als Möglichkeit zur Kontrolle von BVD-Virusinfektionen. *Tierärztl. Umschau* 54, 582-585.
- Grooms, D. L., Brock, K. V. und Ward, L. A.,** 1998: Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 125-129.
- Grooms, D. L. und Keilen, E. D.,** 2002: Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 898-900.
- Grooms, D. L.,** 2004: Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20, 5-19.
- Gu, B., Liu, C., Lin-Goerke, J., Maley, D. R., Gutshall, L. L., Feltenberger, C. A. und Del Vecchio, A. M.,** 2000: The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J. Virol.* 74, 1794-1800.
- Haines, D. M., Clark, E. G. und Dubovi, E. J.,** 1992: Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet. Pathol.* 29, 27-32.
- Harasawa, R.,** 1996: Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5'-untranslated region. *Acta Virol.* 40, 49-54.
- Harasawa, R. und Giangaspero, M.,** 1998: A novel method for pestivirus genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods* 70, 225-230.
- Harkness, J. W., Sands, J. J. und Richards, M. S.,** 1978: Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res. Vet. Sci.* 24, 98-103.
- Heath, G. S., King, D. P., Turner, J. L., Wakeley, P. R. und Banks, M.,** 2003: Use of an internal standard in a TaqMan nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 96, 357-366.
- Hibberd, R. C., Turkington, A. und Brownlie, J.,** 1993: Fatal bovine viral diarrhoea virus infection of adult cattle. *Vet. Rec.* 132, 227-228

- Hjelmeland, L. M.**, 1990: Solubilization of native membrane proteins.
Methods Enzymol. 182, 253-264.
- Hoffmann, B., Depner, K., Schirrmeyer, H. und Beer, M.**, 2006: A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses.
J. Virol. Methods 136, 200-209.
- Horner, G. W., Tham, K. M., Orr, D., Ralston, J., Rowe, S. und Houghton, T.**, 1995: Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections.
Vet. Microbiol. 43, 75-84.
- Houe, H.**, 1995: Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 521-547.
- Houe, H., Baker, J. C., Maes, R. K., Ruegg, P. L. und Lloyd, J. W.**, 1995: Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV.
J. Vet. Diagn. Invest. 7, 327-332.
- Houe, H.**, 1999: Epidemiological features und economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections.
Vet. Microbiol. 64, 89-107.
- Huchzermeier, R., Leterme, S. und Guillosoy, S.**, 2004: Testing of cattle ear notch samples using a Bovine Virus Diarrhoea antigen ELISA kit.
Suppl. Second European Symposium on: BVDV Control, 4-5.
- Hulst, M. M. und Moormann, R. J.**, 1997: Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors.
J. Gen. Virol. 78, 2779-2787.
- Hyndman, L., Vilcek, S., Conner, J. und Nettleton, P. F.**, 1998: A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses.
J. Virol. Methods 71, 69-76.
- Iqbal, M., Flick-Smith, H. und McCauley, J. W.**, 2000: Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans.
J. Gen. Virol. 81, 451-459.
- Iqbal, M. und McCauley, J. W.**, 2002: Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E(rns) of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis.
J. Gen. Virol. 83, 2153-2159.

- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S. und McCauley, J. W.,** 2004: Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA.
J. Virol. 78, 136-145.
- Johnson, C. M., Perez, D. R., French, R., Merrick, W. C. und Donis, R. O.,** 2001: The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1.
J. Gen. Virol. 82, 2935-2943.
- Kennedy, J. A., Mortimer, R. G. und Powers, B.,** 2006: Reverse transcription-polymerase chain reaction on pooled samples to detect bovine viral diarrhoea virus by using fresh ear-notch-sample supernatants.
J. Vet. Diagn. Invest. 18, 89-93.
- Kim, S. G. und Dubovi, E. J.,** 2003: A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples.
Biologicals 31, 103-106.
- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R. und Thiel, H. J.,** 1995: Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins.
J. Virol. 69, 6479-6486.
- Kozasa, T., Tajima, M., Yasutomi, I., Sano, K., Ohashi, K. und Onuma, M.,** 2005: Relationship of bovine viral diarrhoea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR.
Vet. Microbiol. 106, 41-47.
- Kühne, S., Schroeder, C., Holmquist, G., Wolf, G., Horner, S., Brem, G. und Ballagi, A.,** 2005: Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle - testing tissue samples derived from ear tagging using an Erns capture ELISA.
J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 52, 272-277.
- Kümmerer, B. M. und Meyers, G.,** 2000: Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone.
J. Virol. 74, 390-400.
- Kümmerer, B. M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. und Meyers, G.,** 2000: The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses.
Vet. Microbiol. 77, 117-128.
- Kupfermann, H., Thiel, H. J., Dubovi, E. J. und Meyers, G.,** 1996: Bovine viral diarrhoea virus: characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions.
J. Virol. 70, 8175-8181.

- Lackner, T., Muller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H. J., Gorbalenya, A. E. und Tautz, N.,** 2004: Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus.
J. Virol. 78, 10765-10775.
- Lackner, T., Muller, A., König, M., Thiel, H. J. und Tautz, N.,** 2005: Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease.
J. Virol. 79, 9746-9755.
- Lackner, T., Thiel, H. J. und Tautz, N.,** 2006: Dissection of a viral autoprotease elucidates a function of a cellular chaperone in proteolysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 1510-1515.
- Langedijk, J. P.,** 2002: Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop.
J. Biol. Chem. 277, 5308-5314.
- Le, S. Y., Liu, W. M. und Maizel, J. V., Jr.,** 1998: Phylogenetic evidence for the improved RNA higher-order structure in internal ribosome entry sequences of HCV and pestiviruses.
Virus Genes 17, 279-295.
- Lee, K. M. und Gillespie, J. H.,** 1957: Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture.
Am. J. Vet. Res. 18, 952-953.
- Letellier, C., Kerkhofs, P., Wellemans, G. und Vanopdenbosch, E.,** 1999: Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region.
Vet. Microbiol. 64, 155-167.
- Letellier, C. und Kerkhofs, P.,** 2003: Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus.
J. Virol. Methods 114, 21-27.
- Letellier, C., De Meulemeester, L., Lomba, M., Mijten, E. und Kerkhofs, P.,** 2005: Detection of BVDV persistently infected animals in Belgium: evaluation of the strategy implemented.
Prev. Vet. Med. 72, 121-125.
- Liang, D., Sainz, I. F., Ansari, I. H., Gil, L. H., Vassilev, V. und Donis, R. O.,** 2003: The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses.
J. Gen. Virol. 84, 1269-1274.
- Liebler, E., Johannsen, U. und Pohlenz, J.,** 1995: Die hämorrhagische Verlaufsform der akuten Bovinen Virusdiarrhö: Literaturübersicht und Fallbericht.
Tierärztl. Prax. 23, 18-25.

- Liebler-Tenorio, E. M., Lanwehr, A., Greiser-Wilke, I., Loehr, B. I. und Pohlenz, J.,** 2000: Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet. Microbiol.* 77, 163-174.
- Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. E. und Neill, J. D.,** 2002: Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhoea virus type 2 in calves. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1575-1584.
- Liebler-Tenorio, E.,** 2005: Pathogenesis. In: *Bovine Viral Diarrhoea Virus - Diagnosis, Management and Control*, Goyal, S. M. und Ridpath, J. F., eds., Iowa, Blackwell Publishing, 121-143.
- Liess, B., Frey, H. R., Kittsteiner, H., Baumann, F. und Neumann, W.,** 1974: Beobachtungen und Untersuchungen über die "Mucosal Disease" des Rindes - einer immunbiologisch erkläraren Spätform der BVD-MD-Virusinfektion mit Kriterien einer "slow virus infection"? *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 81, 481-487.
- Liess, B.,** 1985: Bedeutung der Immuntoleranz für die Pathogenese der bovine Virusdiarrhoe (BVD). *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 98, 420-423.
- Lindberg, A. und Houe, H.,** 2005: Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* 72, 55-73.
- Mackay, I. M., Arden, K. E. und Nitsche, A.,** 2002: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292-1305.
- Mahlum, C. E., Haugerud, S., Shivers, J. L., Rossow, K. D., Goyal, S. M., Collins, J. E. und Faaberg, K. S.,** 2002: Detection of bovine viral diarrhoea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 120-125.
- Mars, M. H. und Van Maanen, C.,** 2005: Diagnostic assays applied in BVDV control in The Netherlands. *Prev. Vet. Med.* 72, 43-48.
- McClurkin, A. W., Coria, M. F. und Cutlip, R. C.,** 1979: Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 1116-1119.
- McClurkin, A. W., Littledike, E. T., Cutlip, R. C., Frank, G. H., Coria, M. F. und Bolin, S. R.,** 1984: Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Comp. Med.* 48, 156-161.

- McGoldrick, A., Lowings, J. P., Ibata, G., Sands, J. J., Belak, S. und Paton, D. J., 1998:** A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan).
J. Virol. Methods 72, 125-135.
- McGoldrick, A., Bensaude, E., Ibata, G., Sharp, G. und Paton, D. J., 1999:** Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes.
J. Virol. Methods 79, 85-95.
- McGowan, M. R., Kirkland, P. D., Richards, S. G. und Littlejohns, I. R., 1993:** Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination.
Vet. Rec. 133, 39-43.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M. S. und Rice, C. M., 1998:** Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity.
J. Virol. 72, 4737-4745.
- Meyers, G., Rügenapf, T., Tautz, N., Dubovi, E. J. und Thiel, H. J., 1991:** Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhea virus.
Arch. Virol. Suppl. 3, 133-142.
- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E. J., Collett, M. S. und Thiel, H. J., 1992:** Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses.
Virology 191, 368-386.
- Meyers, G. und Thiel, H. J., 1996:** Molecular characterization of pestiviruses.
Adv. Virus Res. 47, 53-118.
- Meyers, G., Stoll, D. und Gunn, M., 1998:** Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle.
J. Virol. 72, 4139-4148.
- Meyers, G., Saalmüller, A. und Buttner, M., 1999:** Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation.
J. Virol. 73, 10224-10235.
- Meyling, A. und Jensen, A. M., 1988:** Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull.
Vet. Microbiol. 17, 97-105.
- Meyling, A., Houe, H. und Jensen, A. M., 1990:** Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus.
Rev. Sci. Tech. 9, 75-93.

- Mignon, B., Dubuisson, J., Baranowski, E., Koromyslov, I., Ernst, E., Boulanger, D., Waxweiler, S. und Pastoret, P. P.,** 1991: A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Methods* 35, 177-188.
- Mignon, B., Waxweiler, S., Thiry, E., Boulanger, D., Dubuisson, J. und Pastoret, P. P.,** 1992: Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting bovine viral diarrhoea pestivirus antigens in field blood samples of persistently infected cattle. *J. Virol. Methods* 40, 85-93.
- Moennig, V., Bolin, S. R., Coulibaly, C. O., Gourley, N. E., Liess, B., Mateo, A., Peters, W. und Greiser-Wilke, I.,** 1987: Untersuchungen zur Antigenstruktur von Pestiviren mit Hilfe monoklonaler Antikörper. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 94, 572-576.
- Moennig, V. und Liess, B.,** 1995: Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11, 477-487.
- Moerman, A., Straver, P. J., de Jong, M. C., Quak, J., Baanvinger, T. und Van Oirschot, J. T.,** 1994: Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Vet. Q.* 16, 115-119.
- Müller, A., Rinck, G., Thiel, H. J. und Tautz, N.,** 2003: Cell-derived sequences in the N-terminal region of the polyprotein of a cytopathogenic pestivirus. *J. Virol.* 77, 10663-10669.
- Munoz-Zanzi, C. A., Hietala, S. K., Thurmond, M. C. und Johnson, W. O.,** 2003: Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. *Am. J. Vet. Res.* 64, 358-365.
- Murray, R. D.,** 1991: Lesions in aborted bovine fetuses and placenta associated with bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 217-224.
- Muyldermans, G., San Gabriel, M. C., Hamers, R. und Wyns, L.,** 1996: Expression in *E. coli* and purification of the active autoprotease P20 of classical swine fever virus. *Virus Genes* 13, 135-142.
- Nagai, M., Sakoda, Y., Mori, M., Hayashi, M., Kida, H. und Akashi, H.,** 2003: Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* 84, 447-452.
- Niskanen, R., Alenius, S., Larsson, B. und Jacobsson, S. O.,** 1991: Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 245-251.

- Niskanen, R.**, 1993: Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus.
Vet. Rec. 133, 341-344.
- Niskanen, R. und Lindberg, A.**, 2003: Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens.
Vet. J. 165, 125-130.
- Njaa, B. L., Clark, E. G., Janzen, E., Ellis, J. A. und Haines, D. M.**, 2000: Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens.
J. Vet. Diagn. Invest. 12, 393-399.
- Olafson, P., MaCallum, A. und Fox, F.**, 1946: An apparently new transmissible disease of cattle.
Cornell Vet. 36, 205-213.
- Onyekaba, C., Fahrman, J., Bueon, L., King, P. und Goyal, S. M.**, 1987: Comparison of five cell lines for the propagation of bovine viral diarrhoea and infectious bovine rhinotracheitis viruses.
Microbiologica 10, 311-315.
- Palfi, V., Houe, H. und Philipsen, J.**, 1993: Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves.
Acta Vet. Scand. 34, 105-107.
- Paton, D. J., Ibata, G., Edwards, S. und Wensvoort, G.**, 1991a: An ELISA detecting antibody to conserved pestivirus epitopes.
J. Virol. Methods 31, 315-324.
- Paton, D. J., Sands, J. J. und Roehle, P. M.**, 1991b: BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity.
Arch. Virol. Suppl. 3, 47-54.
- Paton, D. J., Sands, J. J., Lowings, J. P., Smith, J. E., Ibata, G. und Edwards, S.**, 1995: A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing.
Vet. Res. 26, 92-109.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J. und Tussen, P.**, 1994: Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities.
Virology 203, 260-268.
- Pestova, T. V. und Hellen, C. U.**, 1999: Internal initiation of translation of bovine viral diarrhoea virus RNA.
Virology 258, 249-256.

- Pfeffer, M., Freyburg, M. V., Kaaden, O. R. und Beer, M.,** 2000: A universal 'one-tube' RT-PCR protocol for amplifying isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Res. Commun.* 24, 491-503.
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A. und Collett, M. S.,** 1995: Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206, 750-754.
- Potgieter, L. N.,** 1995: Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11, 501-520.
- Qi, F., Ridpath, J. F. und Berry, E. S.,** 1998: Insertion of a bovine SMT3B gene in NS4B and duplication of NS3 in a bovine viral diarrhoea virus genome correlate with the cytopathogenicity of the virus. *Virus Res.* 57, 1-9.
- Qu, L., McMullan, L. K. und Rice, C. M.,** 2001: Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 75, 10651-10662.
- Qvist, P., Aasted, B., Bloch, B., Meyling, A., Ronsholt, L. und Houe, H.,** 1990: Flow cytometric detection of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle. *Can. J. Vet. Res.* 54, 469-472.
- Qvist, P., Houe, H., Aasted, B. und Meyling, A.,** 1991: Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Clin. Microbiol.* 29, 660-661.
- Radostits, O. M. und Townsend, H. G.,** 1989: The controversy surrounding the role of the bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis in cattle. *Proc. Am. Assoc. Bov. Pract.* 111-114.
- Radwan, G. S., Brock, K. V., Hogan, J. S. und Smith, K. L.,** 1995: Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 44, 77-91.
- Rebhun, W. C., French, T. W., Perdrizet, J. A., Dubovi, E. J., Dill, S. G. und Karcher, L. F.,** 1989: Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 3, 42-46.
- Rehm, H.,** 1996: Membranproteine solubilisieren. In: *Der Experimentator: Proteinbiochemie*, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 88-102.
- Reggiardo, C.,** 1979: Role of BVD virus in shipping fever of feedlot cattle. Case studies and diagnostic considerations. *Proc. 22nd Ann. Meeting of the Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, 315-320.

- Renshaw, R. W., Ray, R. und Dubovi, E. J., 2000:** Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples.
Vet. Diagn. Invest. 12, 184-186.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R. und Dubovi, E. J., 1994:** Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes.
Virology 205, 66-74.
- Ridpath, J. F. und Bolin, S. R., 1995:** Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV.
Virology 212, 259-262.
- Ridpath, J. F. und Bolin, S. R., 1998:** Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR.
Mol. Cell Probes 12, 101-106.
- Ridpath, J. F., Hietala, S. K., Sorden, S. und Neill, J. D., 2002:** Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhoea infections.
J. Vet. Diagn. Invest. 14, 303-307.
- Rijnbrand, R., van der, Straaten T., Van Rijn, P. A., Spaan, W. J. und Bredenbeek, P. J., 1997:** Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon.
J. Virol. 71, 451-457.
- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H. J. und Tautz, N., 2001:** A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus.
J. Virol. 75, 9470-9482.
- Rossmann, W., Vilcek, S., Wenzl, H., Rossmann, E., Loitsch, A., Durkovic, B., Strojny, L. und Paton, D. J., 2001:** Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program.
Vet. Microbiol. 81, 207-218.
- Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G. und Thiel, H. J., 1991:** Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity.
J. Virol. 65, 589-597.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H. und Thiel, H. J., 1993:** Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses.
J. Virol. 67, 3288-3294.
- Rümenapf, T., Stark, R., Heimann, M. und Thiel, H. J., 1998:** N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis.
J. Virol. 72, 2544-2547.

- Saliki, J. T., Fulton, R. W., Hull, S. R. und Dubovi, E. J., 1997:** Microtiter virus isolation and enzyme immunoassays for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle serum. *J. Clin. Microbiol.* 35, 803-807.
- Saliki, J. T., 2000:** The role of diagnostic laboratories in disease control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 134-138.
- Saliki, J. T., Huchzermeier, R. und Dubovi, E. J., 2000:** Evaluation of a new sandwich ELISA kit that uses serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 358-363.
- Saliki, J. T. und Dubovi, E. J., 2004:** Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20, 69-83.
- Sanderbrand, S. A., Tautz, N., Thiel, H. J., Ochs, K., Beck, E. und Niepmann, M., 2000:** Translation from the internal ribosome entry site of bovine viral diarrhoea virus is independent of the interaction with polypyrimidine tract-binding protein. *Vet. Microbiol.* 77, 215-227.
- Sandvik, T. und Krogsrud, J., 1995:** Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 65-71.
- Sandvik, T., 1999:** Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 64, 123-134.
- Sandvik, T., 2005:** Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev. Vet. Med.* 72, 3-16.
- Scheibner, H., Frey, H. R., Eicken, K., Meyer, H. und Greiser-Wilke, I., 2000:** Nachweis des Genoms des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) mittels Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR): Vergleich von Methoden zur Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) aus klinischen Probenmaterialien. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 107, 431-437.
- Schelp, C. und Greiser-Wilke, I., 2003:** BVD-Diagnostik: Ein Überblick. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 116, 227-233.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. und Thiel, H. J., 1993:** Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 261, 1169-1171.
- Scott, F. W., Kahrs, R. F., De Lahunte, A., Brown, T. T., McEntee, K. und Gillespie, J. H., 1973:** Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infection with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Cornell Vet.* 63, 536-560.

- Shannon, A. D., Richards, S. G., Kirkland, P. D. und Moyle, A.,** 1991: An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J. Virol. Methods* 34, 1-12.
- Shin, T. und Acland, H.,** 2001: Tissue distribution of bovine viral diarrhoea virus antigens in persistently infected cattle. *J. Vet. Sci.* 2, 81-84.
- Sizova, D. V., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Shatsky, I. N. und Hellen, C. U.,** 1998: Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J. Virol.* 72, 4775-4782.
- Sopp, P., Hooper, L. B., Clarke, M. C., Howard, C. J. und Brownlie, J.,** 1994: Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. *J. Gen. Virol.* 75, 1189-1194.
- Spagnuolo-Weaver, M., Allan, G. M., Kennedy, S., Foster, J. C. und Adair, B. M.,** 1997: Distribution of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus antigens in tissues of calves following acute experimental infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 287-297.
- Ssentongo, Y. K., Johnson, R. H. und Smith, J. R.,** 1980: Association of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus with ovaritis in cattle. *Aust. Vet. J.* 56, 272-273.
- Stark, R., Meyers, G., Rumenapf, T. und Thiel, H. J.,** 1993: Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* 67, 7088-7095.
- Sullivan, D. G. und Akkina, R. K.,** 1995: A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses. *Virus Res.* 38, 231-239.
- Tamura, J. K., Warrenner, P. und Collett, M. S.,** 1993: RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 193, 1-10.
- Tautz, N., Meyers, G. und Thiel, H. J.,** 1993: Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology* 197, 74-85.
- Tautz, N., Thiel, H. J., Dubovi, E. J. und Meyers, G.,** 1994: Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.* 68, 3289-3297.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. und Thiel, H. J.,** 1997: Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* 71, 5415-5422.

- Tautz, N., Kaiser, A. und Thiel, H. J.**, 2000: NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions.
Virology 273, 351-363.
- Thiel, H. J., Stark, R., Weiland, E., Rügenapf, T. und Meyers, G.**, 1991: Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus.
J. Virol. 65, 4705-4712.
- Thiel, H. J., Stark, R., Meyers, G., Weiland, E. und Rügenapf, T.**, 1992: Proteins encoded in the 5' region of the pestivirus genome - considerations concerning taxonomy.
Vet. Microbiol. 33, 213-219.
- Thiel, H. J., Meyers, G., Stark, R., Tautz, N., Rügenapf, T., Unger, G. und Conzelmann, K. K.**, 1993: Molecular characterization of positive-strand RNA viruses: pestiviruses and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV).
Arch. Virol. Suppl. 7, 41-52.
- Thierauf, P.**, 1993: Untersuchungen zur Epidemiologie, Diagnose und Immunprophylaxe von BVD/MD-Virusinfektionen in Milchviehzuchtbeständen.
Diss. Vet. Med., LMU München.
- Thür, B., Zlinszky, K. und Ehrensperger, F.**, 1996a: Immunhistologie als zuverlässige und effiziente Methode für die Diagnose von BVDV-Infektionen.
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 138, 476-482.
- Thür, B., Zlinszky, K. und Ehrensperger, F.**, 1996b: Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool.
Zentralbl. Veterinärmed. B 43, 163-166.
- Thür, B., Hilbe, M., Strasser, M. und Ehrensperger, F.**, 1997: Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death.
Am. J. Vet. Res. 58, 1371-1375.
- Torgerson, P. R., Dagleish, R. und Gibbs, H. A.**, 1989. Mucosal disease in a cow and her suckled calf.
Vet. Rec. 125, 530-531.
- Tratschin, J. D., Moser, C., Ruggli, N. und Hofmann, M. A.**, 1998: Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture.
J. Virol. 72, 7681-7684.
- Uttenthal, A., Grondahl, C., Hoyer, M. J., Houe, H., Van Maanen, C., Rasmussen, T. B. und Larsen, L. E.**, 2005: Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves. Do we know the reservoirs for BVDV?
Prev. Vet. Med. 72, 87-91.
- van Regenmortel, M. H. V., Bishop, D. H. L. und Fauquet, C. M.**, 2000: Genus Pestivirus. In: *Virus taxonomy: Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses.* Orlando, Academic Press, 867-872.

- Van Rijn, P. A., van Gennip, H. G., Leendertse, C. H., Brusckhe, C. J., Paton, D. J., Moormann, R. J. und Van Oirschot, J. T., 1997:** Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2.
Virology 237, 337-348.
Prev. Vet. Med. 72, 31-35.
- Vilcek, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P. und Paton, D. J., 1994:** Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis.
Arch. Virol. 136, 309-323.
- Vilcek, S., Nettleton, P. F., Paton, D. J. und Belak, S., 1997:** Molecular characterization of ovine pestiviruses.
J. Gen. Virol. 78, 725-735.
- Vilcek, S., Paton, D. J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmanith, W., Vega, S., Scicluna, M. T. und Paifi, V., 2001:** Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups.
Arch. Virol. 146, 99-115.
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., Greiser-Wilke, I. und Paton, D., 2004:** Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group.
Vet. Res. 35, 609-615.
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M. und Paton, D. J., 2005a:** Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology.
Prev. Vet. Med. 72, 31-35.
- Vilcek, S., Ridpath, J. F., Van Campen, H., Cavender, J. L. und Warg, J., 2005b:** Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope.
Virus Res. 108, 187-193.
- Virakul, P., Fahning, M. L., Joo, H. S. und Zemjanis, R., 1988:** Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of Bovine Viral Diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain.
Theriogenology 29, 441-449.
- Ward, A. C. und Kaeberle, M. L., 1984:** Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies.
Am. J. Vet. Res. 45, 165-170.
- Ward, G. M., Roberts, S. J., McEntee, K. und Gillespie, J. H., 1969:** A study of experimentally induced bovine viral diarrhoea-mucosal disease in pregnant cows and their progeny.
Cornell Vet. 59, 525-538.
- Warrener, P. und Collett, M. S., 1995:** Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity.
J. Virol. 69, 1720-1726.

- Weiland, E., Thiel, H. J., Hess, G. und Weiland, F., 1989:** Development of monoclonal neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea virus after pretreatment of mice with normal bovine cells and cyclophosphamide.
J. Virol. Methods 24, 237-243.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rümnapf, T., Meyers, G. und Thiel, H. J., 1990:** Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer.
J. Virol. 64, 3563-3569.
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. und Thiel, H. J., 1992:** A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus.
J. Virol. 66, 3677-3682.
- Weiland, F., Weiland, E., Unger, G., Saalmüller, A. und Thiel, H. J., 1999:** Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles.
J. Gen. Virol. 80, 1157-1165.
- Weinstock, D., Bhudevi, B. und Castro, A. E., 2001:** Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum.
J. Clin. Microbiol. 39, 343-346.
- Wensvoort, G., Terpstra, C. und de Kluyver, E. P., 1989:** Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization.
Vet. Microbiol. 20, 291-306.
- Wilhelmsen, C. L., Bolin, S. R., Ridpath, J. F., Cheville, N. F. und Kluge, J. P., 1991:** Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea.
Am. J. Vet. Res. 52, 269-275.
- Wiskerchen, M., Belzer, S. K. und Collett, M. S., 1991:** Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity.
J. Virol. 65, 4508-4514.
- Wiskerchen, M. und Collett, M. S., 1991:** Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing.
Virology 184, 341-350.
- Wolf, G., 2005:** Diagnostik des BVDV-PI-Kalbes mit Blutproben und mit Ohrstanzen.
Proc. 2. Riemser Diagnostiktage
- Wolfmeyer, A., Wolf, G., Beer, M., Strube, W., Hehnen, H. R., Schmeer, N. und Kaaden, O. R., 1997:** Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates.
Arch. Virol. 142, 2049-2057.

- Xu, J., Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S. und Rice, C. M.,** 1997: Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication.
J. Virol. 71, 5312-5322.
- Xue, W. und Minocha, H. C.,** 1993: Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies.
J. Gen. Virol. 74, 73-79.
- Xue, W. und Minocha, H. C.,** 1996: Identification of bovine viral diarrhoea virus receptor in different cell types.
Vet. Microbiol. 49, 67-79.
- Yu, H., Grassmann, C. W. und Behrens, S. E.,** 1999: Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication.
J. Virol. 73, 3638-3648.
- Yu, H., Isken, O., Grassmann, C. W. und Behrens, S. E.,** 2000: A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA.
J. Virol. 74, 5825-5835.
- Yu, M., Wang, L. F., Shiell, B. J., Morrissy, C. J. und Westbury, H. A.,** 1996: Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses.
Virology 222, 289-292.
- Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M. C. und McCauley, J. W.,** 1996: Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis.
J. Gen. Virol. 77, 1677-1681.
- Zhang, G., Flick-Smith, H. und McCauley, J. W.,** 2003: Differences in membrane association and sub-cellular distribution between NS2-3 and NS3 of bovine viral diarrhoea virus.
Virus Res. 97, 89-102.
- Zhong, W., Gutshall, L. L. und Del Vecchio, A. M.,** 1998: Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhoea virus.
J. Virol. 72, 9365-9369.
- Zimmer, G. M., Van Maanen, C., De, Goey, I., Brinkhof, J. und Wentink, G. H.,** 2004: The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples.
Vet. Microbiol. 100, 145-149.

8. Anhang

8.1 Materialliste

8.1.1 Geräte und Laborhilfsmittel

- Analysenwaage, elektronisch, Typ 1219 MP, Sartorius GmbH, Göttingen;
- Analysenwaage, elektronisch, Typ R160P, Sartorius GmbH, Göttingen;
- Brutschrank Memmert Universalschrank, Typ BVM 50, Memmert, Schwabach;
- Cell DYN 3500 Analysegerät, Abbott Laboratories, Illinois, USA;
- Einmalskalpell, steril, Aesculap AG&Co. KG, Tuttlingen;
- Einwegkanülen Neolus (Nr. 1 Luer 0,9x40mm) Terumo[®], Leuven, Belgien;
- GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems, Weiterstadt;
- GeneAmp[®]-Software, PE Applied Biosystems, Weiterstadt;
- Laborglaswaren, Schott Glas, Mainz;
- Latex Untersuchungshandschuhe Multi-Perfect, Multi-Com Goods, Ahrensburg;
- Labor-Schwingmühle MM300, Retsch GmbH & Co. KG, Haan;
- Messpipetten aus Glas (1ml, 5ml und 10ml), Brand, Wertheim;
- MikroAmp[®] Optical Tubes, Applied Biosystems, Forster City, USA;
- MikroAmp[®] Optical Caps, Applied Biosystems, Forster City, USA;
- Mikro-Schraubröhre (2ml), Sarstedt, Nümbrecht;
- Mikrotiterplatte, Rundboden, Sarstedt, Nümbrecht;
- Pipetten:
 - pipetman (100-1000µl), Abimed, Langenfeld;
 - Research (0,5-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 100-1000µl), Eppendorf, Köln;
 - SL-Pette (25-200µl), Mehrkanalpipette, Süd-Laborbedarf, Gauting;
- Pipettenspitzen:
 - Pipettenspitzen (200µl, 1000µl), Sarstedt, Nümbrecht;
 - Biosphere[®] Filter Tips (20µl, 100µl, 1000µl), Sarstedt, Nümbrecht;
- Pipettierhilfe: Accu-Jet[®], Brand, Wertheim;
- pH-Meter Piccolo plus, Hanna instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rein;
- Photometer: Sunrise Touchscreen, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim;
- Photometer-Software: Magellan-Software, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim;
- Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml), Nunc, Roskilde, Dänemark;
- Reagent Reservoir, 50ml, Corning Inc., Corning, USA;

- Reagiergefäß, 1,5ml, Sarstedt, Nümbrecht;
- Reagiergefäß, 2ml, PP, Sarstedt, Nümbrecht;
- Stahlkugeln, 5mm, Qiagen, Hilden;
- Vortex-Genie, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz;
- Zentrifugen: - Capsulefuge PMC-060, Poly Labo, Straßburg, Frankreich;
- Centrifuge 5417R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf;
- Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Osterode;
- UEC-Force I, Uniequip Laborgerätebau + Vertrieb GmbH, Martinsried;

8.1.2 Kommerzielle Kits

ELISA-Kits

- Ceditest[®] BVDV, Cedi Diagnostics B. V., Lelystad, NL;
- Ceditest[®] BVDV-Ag, Cedi Diagnostics B. V., Lelystad, NL;
- CheKit BVD-Virus-III, Bommeli Diagnostics, Liebefeld-Bern, CH;
- ELISA BVD/MD Antigen Mix, Institut Pourquier, Montpellier, F;
- ELISA BVD/MD P80 Antigen, Institut Pourquier, Montpellier, F;
- HerdChek BVDV Antigen/Leukozyten, Idexx Laboratories, Wörrstadt;
- HerdChek BVDV Antigen/Serum Plus, Idexx Laboratories, Wörrstadt;
- Serelisa[™] BVD p80 Ag Mono Indirect, Synbiotics Corporation, Lyon, F;

RNA-Isolierungskits

- High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics, Penzberg;
- High Pure RNA Tissue Kit, Roche Diagnostics, Penzberg;
- High Pure Viral RNA Kit, Roche Diagnostics, Penzberg;
- RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit, Qiagen, Hilden;
- RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, Hilden;
- RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen, Hilden;
- peqGold TriFast, PEGLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen;

RT-PCR-Kit

- QuantiTect[™] Probe RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden;

8.1.3 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

- CHAPS, Sigma-Aldrich, Steinheim;
- Deoxycholat, Sigma-Aldrich, Steinheim;
- Digitonin, Fluka, Buchs, CH;
- EMPIGEN BB[®] Detergent, Fluka, Buchs, CH;
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Merck, Darmstadt;
- KCl (Kaliumchlorid), Sigma, Deisenhofen;
- KHCO₃ (Kaliumhydrogencarbonat), Merck, Darmstadt;
- KH₂PO₄ (Kaliumphosphat), Merck, Darmstadt;
- Lysispuffer
 - 8,29g NH₄Cl
 - 1,0g KHCO₃
 - 1mM EDTA
 - ad 1l A. demin, pH 7,4
- Molekularsieb 0,3nm, 2mm Perlen, Merck, Darmstadt;
- NaCl (Natriumchlorid), Merck, Darmstadt;
- NaCl-Lösung
 - 9g NaCl
 - ad 1l A. demin
- Na₂HPO₄ (Natriumhydrogenphosphat), Merck, Darmstadt;
- NH₄Cl (Ammoniumchlorid) Merck, Darmstadt;
- Nonidet P40, Fluka, Buchs, CH;
- Octyl-β-D-Glukopyranosid, Sigma-Aldrich, Steinheim;
- PBS (*phosphate buffered saline*) ohne Ca²⁺/Mg²⁺
 - 8g NaCl
 - 0,2g KCl
 - 2,37g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
 - 0,2g KH₂PO₄
 - ad 1l A.demin, pH 7,4
- Primer und Sonden für *real time* PCR: Operon Biotechnologies GmbH, Köln;
- SDS, Roth, Karlsruhe;
- Triton X100, Sigma-Aldrich, Steinheim;
- Tween 20, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn;
- Tween 80, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn;

8.2 Verwendete Abkürzungen

A

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
A. demin	<i>Aqua demineralisata</i>
<i>A. pyogenes</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>

B

BDV	Virus der Border Disease
BVD	Bovine Virusdiarrhoe
BVDV	Virus der Bovinen Virusdiarrhoe
bzw.	beziehungsweise

C

cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFU	<i>colony forming units</i> (Kolonie bildende Einheiten)
CSFV	<i>classical swine fever virus</i> (Virus der Klassischen Schweinepest)
Ct	<i>threshold cycle</i>
°C	Grad Celsius

D

d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	E ^{rns} -ELISA
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Ep80	NS3-ELISA
E ^{rns}	<i>envelope, ribonuclease, soluble</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
------	--

G

g Gramm

H

h Stunde(n)

Hz Hertz

I

IF Immunfluoreszenz-Färbung

IHC Immunhistochemie

K

kb Kilobasen

L

l Liter

log Logarithmus

M

mAK monoklonaler Antikörper

Max. Maximum

MD *Mucosal Disease*

mg Miligramm

min Minute(n)

Min. Minimum

Mittel arithmetisches Mittel

ml Mililiter

mm Milimeter

mM milimolar

µl Mikroliter

N

n Anzahl

NS Nichtstrukturprotein

nzp nicht zytopathogen

O

OD *optical density* (optische Dichte)

P

PBS *phosphate buffered saline* (Phosphat-gepufferte Saline)

PCR polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

pH *potentia Hydrogenium*

PI persistent BVDV infiziert

pmol Pikomol

PK Proteinase K

P. aeruginosa *Pseudomonas aeruginosa*

R

R Spanne

RNA Ribonukleinsäure

RNase Ribonuklease

rpm *rounds per minutes* (Umdrehungen pro Minute)

RT Reverse Transkription

S

sec Sekunde(n)

spez. *spezies*

STD Standardabweichung

S. aureus *Staphylococcus aureus*

T

Tab. Tabelle

TierSG Tierseuchengesetz

U

UTR *untranslated region*

V

vgl. vergleiche

VK Variationskoeffizient

v/v *volume per volume* (Volumenanteil pro Volumenanteil)

W

w/v *weight per volume* (Gewichtsanteil pro Volumenanteil)

Z

zp zytopathogen

z. B. zum Beispiel

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erwin Märtlbauer gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme im Institut, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Vertretung dieser Arbeit vor dem Promotionsausschuss.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Georg Wolf. Ohne seine fachliche Unterstützung, seine konstruktive Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt seine freundschaftliche Betreuung wäre diese Arbeit nur schwer durchführbar gewesen.

Frau Dr. Iona Moßbrugger gebührt an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön. Für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken, für die freundliche und liebenswerte Unterstützung und ihr immerwährendes Verständnis möchte ich mich vielmals bei ihr bedanken.

Frau Astrid Freudenstein und Frau Gudrun Matschke gilt mein Dank für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor und für manchen guten Ratschlag. Vielen Dank auch allen anderen Kollegen im Institut für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Die Studie wurde finanziell durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) unterstützt.