Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 137 (1995)

Heft: 12

Artikel: Tierseuchendiagnostik mittels PCR

Autor: Hofmann, M.A. / Tratschin, J.D. / Brechtbühl, K.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-593398

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe (IVI), Mittelhäusern

Tierseuchendiagnostik mittels PCR

M.A. Hofmann, J.D. Tratschin, K. Brechtbühl, C. Griot

Zusammenfassung

Die PCR wird heute mehr und mehr in der Infektionsdiagnostik eingesetzt, da sie einen Erregernachweis in viel kürzerer Zeit erlaubt als mittels kultureller Isolierung. Überdies können auch Viren und Bakterien, die ihre Infektiosität verloren haben, direkt aus klinischem Untersuchungsmaterial nachgewiesen werden. Diese Vorteile spielen insbesondere in der Diagnostik von Tierseuchenerregern – in erster Linie Viren – eine grosse Rolle, wo eine rasche Labordiagnose angestrebt wird, um rechtzeitig seuchenpolizeiliche Massnahmen ergreifen zu können. Verschiedene PCRs zum Nachweis von Afrikanischer und Klassischer Schweinepest, Maul- und Klauenseuche, Morbus Aujeszky, Porcines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom sowie Newcastle Disease werden am Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe routinemässig zum Virusnachweis eingesetzt, wobei das Isolat durch Direktsequenzierung der amplifizierten DNS innerhalb kurzer Zeit charakterisiert werden kann. Da die Zuverlässigkeit der Resultate und die Vermeidung von Kontaminationen entscheidend sind, müssen hohe Anforderungen an das Laborpersonal sowie an die Infrastruktur gestellt werden.

Schlüsselwörter: **Tierseuchen – Diagnostik – Virusnachweis – Direktsequenzierung – Kontaminationen**

PCR for the diagnosis of viral diseases in animals

The PCR is used for diagnostic purposes as it allows to detect infectious agents within a much shorter time than by cultural isolation. In addition, it can detect non-infectious viruses and bacteria in clinical samples. These advantages are important factors in the diagnosis of highly contagious animal diseases (mainly caused by viruses) since a rapid laboratory diagnosis will allow to take immediate disease control actions. PCR is routinely used at the Institute of Virology and Immunoprophylaxis for detection of African and classical swine fever virus, foot and mouth disease virus, Aujeszky's disease virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, as well as Newcastle disease virus. The isolate can be further characterized by direct nucleotide sequencing of the amplified DNA. Since reliability of the results as well as prevention of contaminations are vital to PCR, this method should be carried out by appropriately trained personnel.
In addition, it requires a high level of technical infrastructure.

Key words: **contagious animal diseases – laboratory diagnosis – virus detection – direct sequencing – contamination**

Einleitung

Tierseuchen sind Infektionskrankheiten, die durch eine rasche Ausbreitung der Infektion (hohe Kontagiosität) gekennzeichnet sind und zu hohen wirtschaftlichen Verlusten in den betroffenen Tierhaltungsbetrieben führen. Oberstes Ziel der – in der staatlichen Gesetzgebung verankerten –Tierseuchenbekämpfung ist es, die Einschleppung von Tierseuchen in unser Land zu verhindern. Dies wird mittels Stichprobenerhebung (z. B. von Blutproben anlässlich der Schlachtung) und ständiger Überwachung der klinischen Herdengesundheit erreicht. Damit bei einem Seuchenausbruch der Infektionsherd möglichst schnell eliminiert werden kann, ist eine zuverlässige Labordiagnose notwendig, bevor Massnahmen zur Seuchenbekämpfung ergriffen werden können. Nun ist es aber gerade bei gewissen hochkontagiösen Tierseuchen bekannt, dass die klinischen Symptome entweder nicht typisch sein können (fehlende Kardinalsymptome) oder aber die Krankheit in verschiedenen klinischen Verlaufs-

formen auftreten kann (z. B. bei der Klassischen und Afrikanischen Schweinepest). In anderen Fällen wiederum führen Infektionen mit völlig unterschiedlichen Erregern zu klinisch kaum unterscheidbaren Krankheitsbildern (z. B. Klassische versus Afrikanische Schweinepest, Maul- und Klauenseuche versus Vesikulärstomatitis). Eine Labordiagnose der entsprechenden Krankheit ist daher in jedem Fall unabdingbar.

Im Falle eines akuten Verdachtes auf eine anzeigepflichtige Krankheit besteht die Labordiagnose darin, den Erreger direkt oder indirekt in intra vitam oder postmortal entnommenem Untersuchungsmaterial nachzuweisen. Dies geschieht entweder durch Isolierung und Anzüchtung des infektiösen Erregers mit anschliessender Typisierung, oder man weist direkt im Untersuchungsmaterial entweder erregerspezifische Proteine (Antigennachweis) oder Teile des Genoms des Erregers nach. Während die kulturelle Isolierung des Erregers (Zellkulturen, Nährböden, Hühnerembryo) und der Antigennachweis seit Jahren in vielen Routinediagnostiklabors zu den Standardmethoden gehören, ist der Nachweis von erregerspezifischer DNS beziehungsweise RNS erst möglich geworden, seit molekularbiologische Arbeitsmethoden im Diagnostiklabor Einzug gehalten haben. Es ist möglich, einen Erregernachweis entweder durch direkte Detektion viraler oder bakterieller DNS oder RNS mittels Hybridisation (Bindung einer spezifischen und markierten DNS-Sonde an die nachzuweisende Nukleinsäure) durchzuführen oder durch Amplifikation des nachzuweisenden Genomabschnittes mittels der PCR.

Ursprünglich wurde die PCR in der Forschung zur Vermehrung von DNS entwickelt; innerhalb Stunden konnten im Reagenzglas DNS-Mengen produziert werden, wie es bis anhin nur mittels Plasmidvermehrung in Bakterien möglich war. In den letzen Jahren findet nun die PCR mehr und mehr auch im Diagnostikbereich ihre Anwendung (Belak und Ballagi-Pordany, 1993; Rodriguez und Schudel, 1993).

In den folgenden Ausführungen soll zunächst auf einige allgemeingültige Grundsätze bezüglich der Anwendung der PCR in der Infektionsdiagnostik und ihre Vor- und Nachteile eingegangen werden. Zudem werden die einzelnen Methoden, die gegenwärtig in der Routinediagnostik des Institutes für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe zum Nachweis viraler Tierseuchenerreger eingesetzt werden, näher vorgestellt.

Allgemeines zum Einsatz der PCR in der Virusdiagnostik

Wie die Zellkulturisolierung eines Erregers dient auch die PCR lediglich dazu, das nachzuweisende Material, in unserem Fall virale DNS oder RNS, zu vermehren, damit sie anschliessend in genügend grosser Menge vorhanden ist, um mittels geeigneter Methoden typisiert werden zu können. An dieser Stelle sollen auch bereits die grossen Vorteile der PCR erwähnt werden: Neben der hohen Empfindlichkeit – theoretisch genügt ein einziges verfügbares Nukleinsäuremolekül – ist ein kurzer intakter Genomabschnitt ausreichend, um eine Amplifikation zu ermöglichen. Ein Virusnachweis mittels PCR ist demzufolge auch dann noch möglich, wenn das Virus selbst im Untersuchungsmaterial nicht mehr infektiös ist, zum Beispiel nach Formalinfixation oder aus stark autolytischem Probenmaterial, wo das Genom des Virus teilweise degradiert sein kann.

Der Ablauf der PCR-Diagnostik besteht somit im wesentlichen aus drei Teilen: (i) Probenaufarbeitung, (ii) Amplifikation und (iii) Nachweis und Charakterisierung der amplifizierten DNS.

Probenaufarbeitung

Damit die Nukleinsäure für die DNS-Polymerase als Vorlagenstrang verfügbar wird, muss sie zunächst aus den Zellen des Untersuchungsmaterials und/oder aus dem Viruspartikel freigesetzt werden. Ebenso müssen störende Faktoren, vor allem enzymhemmende oder Nukleinsäure-degradierende Proteine inaktiviert werden. Dies geschieht dadurch, dass das Probenmaterial nach einer mechanischen Homogenisierung entweder erhitzt wird oder die DNS respektive RNS mittels einer Detergens-/Phenolbehandlung extrahiert wird. Im Falle von RNS-Viren muss zudem der zu amplifizierende Teil des Genoms vor der eigentlichen PCR in komplementäre DNS umkopiert werden (Reverse Transkription).

Amplifikation

Die freigesetzte DNS wird mittels geeigneter Primer erkannt und in der eigentlichen PCR vermehrt. Die Primer können entweder so gewählt werden, dass sie an stark konservierte Sequenzen binden und somit ein möglichst breites Spektrum von Virusfamilien abdecken wie zum Beispiel alle Pestiviren (Virus der Klassischen Schweinepest [ESPV], Bovines Virusdiarrhoe-Virus [BVDV], Border Disease Virus [BDV]), oder es können Virus- oder stammspezifische Primer eingesetzt werden, die dann eine Unterscheidung von nahe verwandten Erregern erlauben (z. B. Unterscheidung der verschiedenen Feldisolate der Schweinepestausbrüche 1993 in der Schweiz).

Nachweis und Charakterisierung der durch PCR vermehrten DNS

Im einfachsten Fall genügt es, die DNS in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufzutrennen und anzufärben, um die Länge zu bestimmen. Verschiedene, zum Teil arbeitsintensive Methoden (Restriktionsenzymverdauung, Hybridisation, Nukleotidsequenzbestimmung) können zur weiteren Charakterisierung herbeigezogen werden, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.

Anforderungen

Während man beim Einsatz zu Forschungszwecken bei der PCR vor allem an einer möglichst effizienten Amplifikation interessiert ist, spielen bei der diagnostischen PCR zusätzliche Kriterien eine entscheidende Rolle. Neben der Spezifität ist eine möglichst hohe Empfindlichkeit anzustreben, die allerdings auf ein vernünftiges Mass beschränkt bleiben soll (so ist es z. B. nicht sinnvoll, eine PCR zu entwickeln, die fähig ist, ein einziges DNS-Molekül zu entdecken, obwohl in der zu untersuchenden Probe 1000 Moleküle vorhanden sind). Grösstes Gewicht muss in der PCR-Diagnostik auf die Verhinderung von Kontaminationen, sei es durch positives Kontroll- oder Probenmaterial oder vor allem durch DNS von einer früher durchgeführten PCR, gelegt werden. Dazu sind eine Reihe von unerlässlichen Massnahmen zu ergreifen, von denen die wichtigsten hier erwähnt werden sollen: (i) Alle Pipettierschritte müssen mit Aerosol-dichten Pipettenspitzen durchgeführt werden; (ii) räumliche Trennung von Probenaufarbeitung und -analyse nach der Amplifikation inklusive separate Instrumente und (iii) Verhinderung der Rückschleppung von PCR-DNS ins Probenaufarbeitungslabor (Geräte, Handschuhe, Kleider, Personal, Raumventilation). Allgemein muss betont werden, dass die Anfälligkeit für DNS-Kontaminationen den grössten Nachteil der PCR in der Diagnostik überhaupt darstellt.

PCR in der Tierseuchendiagnostik

Am Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe begann der Einsatz von Diagnostik-PCRs vor 4 Jahren mit der Entwicklung eines Nachweises für das Virus der Afrikanischen Schweinepest. Später wurden PCRs etabliert, die heute routinemässig zusammen mit einigen aus der Literatur übernommenen Methoden in unserer Virusdiagnostik eingesetzt werden. Die einzelnen Virusnachweise sind in Tabelle 1 und die jeweiligen Primersequenzen in Tabelle 2 zusammengefasst. Prinzipiell werden alle PCRs nach der gleichen Basismethode durchgeführt, lediglich die Sequenzen der verwendeten Primer sowie die Zyklusparameter für die einzelnen Amplifikationen sind unterschiedlich.

Da es das Ziel ist, innerhalb möglichst kurzer Zeit, das heisst innerhalb weniger Stunden, den Virusnachweis mittels PCR durchzuführen, wird in jedem Fall für die Freisetzung der Nukleinsäure und die Proteindenaturierung eine Hitzebehandlung angewandt. Das Probenmaterial wird mittels mechanischer Homogenisation zu einer 10%-Suspension in Phosphatpuffer verarbeitet. Anschliessend erfolgt die Denaturierung bei 95 °C während 5–10 Minuten, wobei bereits bei diesem Schritt im Falle der reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR) Puffer, Nukleotide und der Antisense-Primer für die reverse Transkription der RNS beigegeben werden. Damit eine sogenannte «Hot Start»-PCR durchgeführt werden kann, werden die Reaktionsgemische nach der 30minütigen reversen Transkription mit einer Paraffinschicht im Röhrchenboden eingeschlossen. Analog werden die Proben beim DNS-Virusnachweis vorbereitet, wobei in diesem Fall lediglich die Taq-DNS-Polymerase noch nicht in den Reaktionsansatz zugegeben wird. Unmittelbar vor der Amplifikation werden die übrigen Komponenten auf die erstarrte Paraffinbarriere geschichtet. Die Amplifikation erfolgt während 30 bis 40 Zyklen. Die detaillierten Parameter sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zum Nachweis der amplifizierten DNS wird ⅕ der Probe in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel elektrophoretisch analysiert. Bei Bedarf wird der Rest der amplifizierten DNS zwecks Nukleotidsequenzbestimmung weiterverarbeitet. Die Sequenzinformation wird dazu verwendet, durch die Identifikation von Unterschieden eine Laborkontamination mit dem Referenzvirus auszuschliessen; zudem erlaubt es, durch Vergleich mit anderen Sequenzen und Bestimmung der Ähnlichkeit gewisse Rückschlüsse bezüglich der Herkunft oder der Ausbreitung eines neuen Virusisolates zu ziehen (molekulare Epidemiologie). Die routinemässige Direktsequenzierung ist gegenwärtig für die Pestivirus-PCR etabliert (Beschreibung siehe dort).

Die Sensitivität der Methode ist in allen Fällen so gewählt, dass sich zwischen 1 und 10 zellkulturinfektiöse

Tabelle 1: Übersicht der am Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe in der Routine-Diagnostik zum Virusnachweis eingesetzten PCRs

PCR[a)]	Primer	Primerlokalisation	Länge der amplifizierten DNA	Referenz
Pestiviren	Pest2/Pest3	5' NTR	155–159	Hofmann et al. (1994)
ESPV	HCV2/HCV1	p75 (Polymerase)	477	Wirz et al. (1993)
ASPV	Oligo1/Oligo5	Zentralregion (konserviert)	640	Steiger et al. (1992)
ASPV	Oligo2/Oligo4	nested PCR innerhalb Oligo1/Oligo5	440	Steiger et al. (1992)
PRRSV	PRRS2.1/PRRS1	Nukleokapsid	263	Hofmann (unveröffentlicht)
PRV	PRV1/PRV2	g II	195	Belak et al. (1989)
MKSV	P1/SV1	VP1/VP2A	321–330	Locher et al. (1995)
MKSV	A2/SV1	VP1/VP2A	140–149	Locher et al. (1995)
NDV	NCD3/NCD4	F1/F2	310	Stäuber et al. (1995)

[a)] Abkürzungen siehe Text

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen der in Tabelle 1 zusammengefassten PCRs

PCR	Antisense-(RT-)Primer		Sense-Primer	
	Name	Sequenz (5' → 3')	Name	Sequenz (5' → 3')
Pestiviren	Pest2	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	Pest3	GTGGACGAGGGCATGCCCA
ESPV	HCV2	ATTTGGTCTTCGAGGCGCAGCA	HCV1	CCGTGACCGTGGTAGGGGAAA
ASPV	Oligo5	AGGCACTGGTGGCCAAAGTT	Oligo1	GTATAGGAGGGCGCCGGCTT
ASPV	Oligo4	CAAGCCTCGTCACCTTGTTTGA	Oligo2	TTAGCAGCTCGCGGCGCCT
PRRSV	PRRS2.1	CCGGCAGCATAAACTCAACC	PRRS1	GCCAGTCAATCAACTGTGCC
PRV	PRV2	GGTTCAGGGTCACCCGC	PRV1	ACGGCAVGGGCGTGATC
MKSV	P1	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	SV1	GCGCCACACCGCGTGTTGG
MKSV	A2	GCTTGATTGCACCATAGTT	SV1	GCGCCACACCGCGTGTTGG
NDV	NCD4	GTCAACATATACACCTCATC	NCD3	GGAGGATGTTGGCAGCATT

Einheiten mittels PCR nachweisen lassen. Diese Nachweisgrenze hat sich als ausreichend erwiesen, um mit hoher Sicherheit in Organen von akut erkrankten Tieren Virus nachweisen zu können; gleichzeitig lassen sich DNS-Kontaminationen mit relativ geringem Aufwand unter Kontrolle halten.
Zur Zeit werden die nachfolgenden PCRs am Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe routinemässig in der Tierseuchendiagnostik eingesetzt (Tab. 1).

Tabelle 3: Reaktionsparameter der in Tabelle 1 zusammengefassten PCRs

PCR	Zyklus-zahl	Zyklusparameter
Pestiviren	30	94°C (30 sec), 57°C (30 sec), 72°C (30 sec)
ESPV	40	94°C (30 sec), 62°C (60 sec), 72°C (60 sec)
ASPV	35	94°C (30 sec), 64°C (60 sec), 72°C (60 sec)
PRRSV	35	94°C (30 sec), 62°C (30 sec), 72°C (30 sec)
PRVV	35	95°C (45 sec), 48°C (60 sec), 72°C (45 sec)
MKSV	30	94°C (15 sec), 60°C (15 sec), 72°C (45 + 1 sec)
NDV	35	95°C (30 sec), 51°C (60 sec), 72°C (60 sec)

Afrikanisches Schweinepestvirus (ASPV)

Die beiden Primer Oligo 1 und Oligo 5, die in einer hochkonservierten Region im Zentrum des ASPV-Genoms binden, führen zur Amplifikation eines 640-bp-Fragmentes (Steiger et al., 1992). Anschliessend wird mittels eines 2. Primerpaares (Oligo 2 und Oligo 4), die beide innerhalb der amplifizierten Sequenz binden, eine «nested PCR» durchgeführt. Dies führt zu einer höheren Empfindlichkeit und erlaubt gleichzeitig eine Überprüfung der Spezifität des 640-bp-Fragmentes. In einem zusätzlichen Schritt kann das mit Oligo 2 und 4 vermehrte 440-bp-DNS-Fragment nötigenfalls mit einem zusätzlichen Primer, der als Sonde in einer Hybridisation eingesetzt wird, weiter charakterisiert werden

Maul- und Klauenseuchevirus (MKSV)

Die drei verwendeten Primer binden in der VP1/VP2A-Region des MKSV-Genoms und führen je nach Primerkombination zu zirka 325 bp respektive 145 bp langen Amplifikaten (Locher et al., 1995). Die Genomsequenz unterscheidet sich je nach Serotyp des Virus (O, A, oder C) um maximal 9 Nukleotide, was eine provisorische Typisierung des nachgewiesenen MKSV-Serotyps erlaubt. Mittels Restriktionsanalyse der amplifizierten DNS mit bestimmten Endonukleasen lässt sich die Typisierung bestätigen. Auch in diesem Fall kann die Identität der mit dem Primerpaar P1 und SV1 generierten PCR-DNS durch eine mit den Primern A2 und SV1 durchgeführte «seminested PCR» überprüft werden. Die Direktsequenzierung der amplifizierten DNS, unter Verwendung der gleichen Primer, wie sie für die Amplifikation gebraucht werden, ist für die MKSV-PCR etabliert (Methode siehe Pestivirus-PCR).

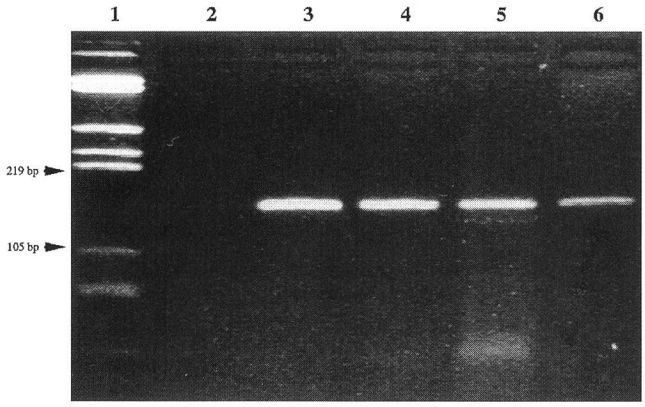

Abbildung 1: Produkte der RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren unter Verwendung verschiedener Virusstämme, analysiert in einem Ethidiumbromid-haltigen 2% Agarose-Gel. Spur 1: DNS-Längenmarker; Spur 2: Negativ-Kontrolle (Überstand von nicht infizierten Zellkulturen); Spur 3: ESPV (Stamm Alfort/187), aus Zellkulturüberstand; Spur 4: ESPV (Isolat Schweiz 2-93), aus Zellkulturüberstand; Spur 5: ESPV (Isolat Schweiz 4-93), aus Milzhomogenisat; Spur 6: BVDV (Stamm NADL), aus Zellkulturüberstand

Pestiviren

Eine RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren im allgemeinen sowie des ESPV wird heute routinemässig bei jedem Schweinepestverdachtsfall als Schnellmethode (Resultat innert 8 Stunden) eingesetzt (Wirz et al., 1993). Die verwendeten Pestivirus-spezifischen Primer binden in der 5' nichtkodierenden Region des Genoms und führen zu einem Amplifikat von 155 (ESPV) bis 159 bp (BVDV). In Abbildung 1 sind die Resultate einer RT-PCR mit verschiedenen Pestiviren vergleichend dargestellt. Amplifizierte cDNS aus positiven Proben wird routinemässig weiterverarbeitet für die Nukleotidsequenzbestimmung mittels Direktsequenzierung (Cycle Sequencing), wobei beide DNS-Stränge mittels eines der beiden für die RT-PCR verwendeten, endmarkierten Primer sequenziert werden (Hofmann et al., 1994). Bisher wurden die Primer jeweils mit radioaktivem Phosphor markiert, das Gel über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert und die Sequenz manuell bestimmt. Neuerdings wird ein Sequenzier-Automat eingesetzt, was die Verwendung von nichtradioaktiven Primern ermöglicht und die Zeit zur Sequenzbestimmung auf wenige Stunden reduziert. So ist es möglich, mit der von uns angewandten Methode die Sequenzinformation innert 36 Stunden, nachdem das virushaltige Untersuchungsmaterial im Labor eingetroffen ist, zu erhalten.

Ergänzend zur Pestivirus-PCR wird eine RT-PCR mit ESPV-spezifischen Primern, die im Polymerase-Gen des Virus binden, durchgeführt. Dies dient zur Absicherung eines positiven Resultates der Pestivirus-PCR und zur Abgrenzung des ESPV gegenüber den anderen Pestiviren.

Porcines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom-Virus (PRRSV)

Das Porcine Respiratorische und Reproduktive Syndrom ist eine neue Schweinekrankheit (Synonyme: «seuchenhafter Spätabort», «Blue Ear Disease»), die bisher in der Schweiz noch nicht diagnostiziert wurde. Zwei Primer innerhalb des Nukleokapsidprotein-Gens des PRRSV dienen dazu, mittels RT-PCR ein 263-bp-Fragment zu amplifizieren. Eine Restriktionsverdauung mit dem Enzym Dde I (Spaltung in 2 Fragmente von 185 bp und 78 bp) dient zur Identifizierung der amplifizierten DNS, ebenso eine Southern-Blot-Hybridisation mit einem im Zentrum der amplifizierten Sequenz bindenden Oligonukleotid als Sonde. Die PCR wird vor allem deshalb angewandt, weil sich das PRRSV ausser in Schweine-Lungenmakrophagen in keiner Zellkultur isolieren lässt.

Diagnostic des épizooties au moyen de la PCR

La PCR est aujourd'hui de plus en plus utilisée dans le diagnostic des infections, afin de permettre une mise en évidence plus rapide de l'agent pathogène, en comparaison à un isolement en culture. De plus pour les virus et les bactéries ayant perdu de leur virulence; ceux-ci peuvent être isolés directement à partir du matériel clinique. Cet avantage joue un rôle important pour diagnostiquer les épizooties, avec en première ligne les virus, où un rapide diagnostic s'impose afin d'établir à temps toutes les mesures de contrôle nécessaires à cet effet. Différentes PCR, pour la mise en évidence des virus de la peste porcine africaine et classique, de la fièvre aphteuse, de la maladie d'Aujeszky, du syndrome disgénésique et respiratoire porcin comme de la maladie de Newcastle, sont habituellement utilisées à l'Institut de Virologie et d'Immunoprophylaxie; de plus le virus isolé peut être caractérisé de façon rapide à l'aide d'un séquençage direct du DNS amplifié. Etant donné que l'authenticité des résultats et l'absence de contamination sont primordiaux, des mesures strictes doivent être misent en place pour l'infrastructure du laboratoire comme pour son personnel.

Diagnostica delle epizoozie tramite PCR

La PCR e oggi impiegata con sempre maggiore frequenza nella diagnostica delle infezioni, poiche permette l'identificazione dell'agente eziologico in un lasso di tempo molto piu breve che non l'isolamento in coltura. Inoltre, è anche possibile l'identificazione, direttamente a partire da prelievi clinici, di virus e batteri che hanno perso la loro infettività. Questi vantaggi si rivelano di grande importanza in particolare nella diagnostica degli agenti eziologici delle epizoozie (essenzialmente virus), dove, allo scopo di intraprendere tempestivamente delle misure di polizia sanitaria, una diagnosi di laboratorio che sia rapida e auspicata. Nel depistaggio della Peste suina africana e classica, dell'Afta, della Malattia di Aujeszky, della Sindrome respiratoria e dell'infertilita del suino e della Malattia di Newcastle, diverse PCR sono impiegate regolarmente all'Istituto di Virologia et Immunoprofilassi per identificare il virus; l'isolato viene caratterizzato in breve tempo tramite la determinazione diretta della sequenza dell'ADN amplificato. Siccome l'affidabilità del risultato e la prevenzione di contaminazioni sono determinanti, delle elevate esigenze devono essere poste al personale di laboratorio e alle infrastrutture.

Newcastle Disease Virus (NDV)

Die RT-PCR für den Nachweis des NDV wurde ursprünglich zur Kontrolle von Geflügel-Impfstoffen auf NDV-Kontaminationen entwickelt. Es wird eine 310 bp lange cDNS im FO-Protein-Gen, das die F1/F2-Spaltstelle einschliesst, amplifiziert. Durch Direktsequenzierung wird die Aminosäuresequenz an der Spaltstelle bestimmt, was Rückschlüsse auf die Pathogenität des Virusstammes erlaubt (Collins et al., 1993). Diese RT-PCR wird neuerdings auch an diagnostischem Material angewendet.

Aujeszky- oder Pseudorabies-Virus (PRV)

Der Nachweis von PRV wird mit einer in der Literatur beschriebenen PCR durchgeführt (Belak et al., 1989), wobei die beiden verwendeten Primer ein 194-bp-DNS-Fragment im gII-Bereich des PRV-Genoms definieren.

Ausblick

Die jährlich stark steigende Anzahl von Publikationen, die den Einsatz der PCR zu diagnostischen Zwecken beschreiben, demonstriert, dass diese Methode in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen wird. Dazu werden zweifellos auch verschiedene Weiterentwicklungen technischer Natur beitragen. Als Beispiele seien der Einsatz von vollautomatischen Pipettierrobotern sowie von PCR-ELISA-Systemen zur Analyse der amplifizierten DNS erwähnt. Dies wird auch die Durchführung von Massenuntersuchungen erlauben, was heute infolge des hohen manuellen Arbeitsaufwandes in der Regel noch nicht möglich ist und somit momentan einen grossen Nachteil der PCR in der Diagnostik darstellt.

Allerdings wird es schwierig bleiben, die PCR so weit zu automatisieren und zu vereinfachen, dass sie in jedem Diagnostiklabor durchgeführt werden kann, denn in jedem Fall erfordert sie einen hohen Aufwand an Infrastruktur (Apparate, Räumlichkeiten), der im Normalfall nur in einem Labor, in dem ohnehin mit molekularbiologischen Methoden gearbeitet wird, kostenmässig vertretbar ist. Überdies erfordert die PCR entsprechend ausgebildetes Personal; das heisst, eine überdurchschnittliche molekularbiologische Erfahrung wird vorausgesetzt, damit die Methode auch langfristig erfolgreich eingesetzt werden kann.

In der Tierseuchendiagnostik, wo der Einsatz der PCR aufgrund ihrer raschen Durchführbarkeit äusserst sinnvoll ist, indem sie innert kürzester Zeit die Typisierung eines nachgewiesenen Erregers erlaubt, ist eine Ausdehnung auf weitere (Virus-)Nachweise wünschenswert. Als Beispiele sollen die Differenzierung verschiedener vesikulärer Erkrankungen beim Rind (Maul- und Klauenseuche, Vesikulärstomatitis, Bovine Virusdiarrhoe, Bösartiges Katarrhalfieber und andere) oder die Abgrenzung von Tierseuchenerregern von verwandten Viren, die aber seuchenpolizeilich keine Massnahmen erfordern (z. B. Newcastle Disease versus andere aviäre Paramyxoviren, Teschener Krankheit versus andere Serotypen von porcinen Enteroviren), erwähnt werden. In den nächsten Jahren wird deshalb die Entwicklung weiterer PCR-Virusnachweise einen Schwerpunkt der Forschungsarbeiten am Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe darstellen.

Literatur

Belak, S., Ballagi-Pordany, A., Flensburg, J., Virtanen, A. (1989): Detection of pseudorabies virus DNA sequences by the polymerase chain reaction. Arch. Virol. *108*, 279–286.

Belak, S., Ballagi-Pordany, A. (1993): Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. Vet. Res. Comm. *17*, 55–72.

Collins, M.S., Bashiruddin, J.B., Alexander, D.J. (1993): Deduced aminio acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus showing variation in antigenicity and pathogenicity. Arch. Virol. *128*, 363–370.

Locher, F., Suryanarayana, V.V.S., Tratschin, J.D. (1995): Rapid detection and characterization of foot-and-mouth disease virus by restriction enzyme and nucleotide sequence analysis of PCR products. J. Clin. Microbiol. *33*, 440–444.

Hofmann, M.A., Brechtbühl, K., Stäuber, N. (1994): Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. Arch. Virol. *139*, 217–229.

Rodriguez, M., Schudel, A.A. (1993): Nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction in the diagnosis of infectious animal diseases. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. *12*, 405–423.

Stäuber, N., Brechtbühl, K., Hofmann, M.A. (1995): Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified fragments. Vaccine *13*, 360–364.

Steiger, Y., Ackermann, M., Mettraux, C., Kihm, U. (1992): Rapid and biologically safe diagnosis of African swine fever virus infection by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. *30*, 1–8.

Wirz, B., Tratschin, J.D., Müller, H.K., Mitchell, D.B. (1993): Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. *31*, 1148–1154.

Dank

Die Autoren danken dem Bundesamt für Veterinärwesen für die fortlaufende Unterstützung der Projekte zur Entwicklung der verschiedenen beschriebenen PCRs und Frau Dagmar Heim für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Korrespondenzadresse: Dr. Martin Hofmann, Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, CH-3147 Mittelhäusern

Manuskripteingang: 2. August 1995