

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines "Antigen Capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay" (AgC-ELISA) zum Nachweis des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) im peripheren Blut virämischer Rinder. Dazu wurde versucht, zusätzlich zu schon vorhandenen, monoklonale Antikörper mit hoher Affinität und breiter Reaktivität gegen das BVD-Virus herzustellen.

Es konnten aus einer Fusion drei Hybridzelllinien, die monoklonale Antikörper gegen den homologen BVD-Virusstamm NADL-USA produzierten, stabilisiert werden.

Das Reaktionsspektrum der drei monoklonalen Antikörper wurde im indirekten Enzymimmuntest mit 33 BVD-Virusstämmen bzw. -isolaten, 4 Virusstämmen der Europäischen Schweinepest und 2 "Border Disease"-Virusstämmen ermittelt. Die monoklonalen Antikörper BVD/CT13 und BVD/CT19 reagierten nur mit 4 bzw. 5 der zytopathogenen BVD-Virusstämme. Der monoklonale Antikörper BVD/CT14 reagierte mit allen getesteten Virusstämmen. Es handelte sich bei diesem monoklonalen Antikörper insoweit um einen panpestivirusspezifischen monoklonalen Antikörper.

Es wurden Studien mit dem homologen Virus durchgeführt, um Informationen über die Affinität der monoklonalen Antikörper für ihre Epitope zu erhalten. Der im Institut verfügbare panpestivirusspezifische monoklonale Antikörper BVD/C16 (anti-p125/80) und der BVD/CT14 besaßen eine hohe Affinität.

Der monoklonale Antikörper BVD/CT14 präzipitierte in der Radioimmunpräzipitation eine Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht von 125 Kilodalton. Dies entspricht dem Nicht-Strukturprotein p125/80.

Virales Antigen wurde von den monoklonalen Antikörpern BVD/C16 und BVD/CT14 im AgC-ELISA am besten gebunden.

Für die erfolgreiche Entwicklung dieses Tests waren mehrere Faktoren von entscheidender Bedeutung:

Die Mikrotiterplatten wurden mit dem monoklonalen Antikörper BVD/C16 beschichtet. Virales Antigen konnte aus BVD-virusinfizierten Zellkulturen durch Behandlung mit Detergenzlösung

gewonnen werden. Dies führte zu der Entwicklung eines Teststandards. Anschließend wurden die für infizierte Kulturzellen ermittelten Testbedingungen auf Leukozyten aus dem peripheren Blut virämischer Rinder übertragen und weiter optimiert. Das gebundene BVD-Virusantigen wurde im AgC-ELISA mit einem im Schwein hergestellten polyklonalen, panpestiviruspezifischen Immunperoxidase-Konjugat nachgewiesen.

Nach Etablierung der Testbedingungen wurden 212 Blutproben aus der Routinediagnostik vergleichend im AgC-ELISA und der kulturellen Virusisolierung untersucht. Die mit beiden Verfahren erzielten Ergebnisse korrelierten zu 100%.

Der im Rahmen der Arbeit entwickelte AgC-ELISA stellt eine rasche, sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von BVD-Virusantigen im Blut virämischer Rinder dar. Da das Verfahren Zellkultur-unabhängig ist, könnte es eine praxisreife Alternative zum herkömmlichen Verfahren werden.

Enno Werner Elmar Cord Gottschalk:

Development of an enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine viral diarrhoea (BVD) virus antigen in the leucocyte fraction of viremic cattle.

7. SUMMARY

The aim of the study was the development of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (AgC-ELISA) for the diagnosis of bovine viral diarrhoea (BVD) virus antigen in peripheral blood of viremic cattle. For this purpose monoclonal antibodies with high affinity and broad reactivity against the BVD virus were produced in order to complete the panel of available monoclonal antibodies.

Three stable hybrid cells producing monoclonal antibodies against the homologous BVD virus strain NADL-USA were established.

The reactivity pattern of the monoclonal antibodies BVD/CT13, BVD/CT14 and BVD/CT19 was determined using an indirect enzyme-immunoassay with 33 BVD-, 4 hog cholera- and 2 border disease virus strains. The monoclonal antibody BVD/CT13 reacted with four whereas BVD/CT19 reacted with five cytopathogenic BVD virus strains. Only the monoclonal antibody BVD/CT14 reacted with all strains tested. It was considered to be a panpestivirus specific monoclonal antibody.

Studies with the homologous virus were performed in order to obtain information about the affinity of the monoclonal antibodies to their epitopes. The monoclonal antibodies BVD/CT14 and the panpestivirus specific BVD/C16 (anti-p125/80) available in our laboratory displayed high affinities to their epitopes.

The monoclonal antibody BVD/CT14 precipitated a band with an estimated molecular weight of 125 kilodalton using a radioimmunoprecipitation assay. The band was considered to be the non-structural protein p125/p80.

The monoclonal antibodies BVD/C16 and BVD/CT14 were superior to other monoclonal antibodies in capturing BVD virus antigen in the AgC-ELISA.

The successful development of this test depend on several factors:

Micotiter plates were coated with monoclonal antibody BVD/C16 as capture antibody. BVD virus infected cell cultures were treated with detergent to solubilize viral antigen. This led to the development of a standardized antigen preparation. Subsequently the test procedure established with infected cultured cells was transfered to the preparation of leucocytes from the peripheral blood of viremic cattle and it was further optimized. A polyclonal panpestivirus specific immunoperoxidase conjugate produced in swine was used to detect BVD virus antigen in the AgC-ELISA.

After the establishment of the test conditions a comparison of the AgC-ELISA and cultural virus isolation from 212 randomly selected blood samples showed that both tests correlated to 100%.

The AgC-ELISA developed in this study represents a fast, sensitive and specific assay for the detection of BVD virus antigen in blood of viremic cattle. This assay could be a practical alternative to conventional methods because it does not depend on cell cultures.