

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Virus der bovinen Virusdiarrhöe (BVDV) kann neben anderen Erkrankungskomplexen Mißbildungen des Gehirns mit schweren neurologischen Ausfällen bei Kälbern und Schaflämmern verursachen. Warum das Virus in den meisten mißgebildeten Gehirnen bislang nicht nachgewiesen werden konnte, ist nicht geklärt. Bei Rindern, in deren Blut das BVDV zeitlebens persistiert (persistent virämische Rinder), ist dieses neben anderen Organen auch stets im Gehirn nachweisbar; bei diesen Tieren liegen jedoch weder neurologische Beeinträchtigungen noch pathologische Veränderungen am Gehirn vor.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Einsatz neuerer molekularbiologischer Methoden (Polymerase-Kettenreaktion, PCR, und *in situ* Hybridisierung) verschiedene Lokalisationen aus Gehirnen von an Mucosal Disease erkrankten Rindern, von persistent virämischen Rindern und mißgebildete Gehirne von Kälbern und Schaflämmern auf das Vorliegen von Virusnukleinsäure (RNA) zu untersuchen. Die Gewebeproben waren im Archiv des Instituts für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover in teils frischer oder tiefgefrorener, teils formalinfixierter und paraffineingebetteter Form vorhanden (insgesamt 69 Tiere). Es sollte festgestellt werden, in welchen der Gehirne BVDV-RNA in welchen Lokalisationen vorliegt. Wenn möglich, sollte eine Aussage über den vorliegenden Virus-Biotyp (zytopathogen oder nichtzytopathogen) gemacht werden.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Es wurde ein Nachweisverfahren für BVDV-RNA in frischem und tiefgefrorenem Gehirngewebe mittels Reverser Transkription-PCR (RT-PCR) und in formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gehirngewebe mittels Zweistufen-RT-PCR ("*nested*" RT-PCR) neu etabliert, wobei ein 402 bp (RT-PCR) bzw. ein 803 bp (Zweistufen-RT-PCR) langes Fragment aus dem für das Virusprotein p125 kodierenden Bereich des viralen Genoms amplifiziert wurde. Für die Etablierung der Methode dienten virusinfizierte Zellkulturen und frische Gehirne von persistent BVDV-infizierten Rindern. Durch die Wahl der Primer war es möglich, bei den BVDV-Stämmen *Indiana*, *MDI*, *NADL* und *Osloss* die RNA der beiden Biotypen (zytopathogen und nichtzytopathogen) zu unterscheiden.
2. Die Eigenschaften der Methode wurden charakterisiert (untere Nachweisgrenze = 10^{-5} KID₅₀/ml; Sensitivität = je nach Lagerungsdauer und Fixierung des Gewebes bis zu 100%; Spezifität = 100%; Reproduzierbarkeit = 100%).

3. Autolyse und Fäulnis hatten bis zum zehnten Tag post mortem keinen Einfluß auf die Nachweisbarkeit der BVDV-RNA. Formalinfixierung führte jedoch nach mehr als zehn Tagen (10%iges, ungepuffertes Formalin) bzw. nach mehr als zwei Monaten (5%iges, neutralgepuffertes Formalin) und nach Lagerung des fixierten Gewebes von mehr als zwei Jahren zu einem teilweisen bis vollständigen Verlust der viralen RNA.
4. In den Gehirnen persistent BVD-virämischer und an Mucosal Disease erkrankter Rinder konnte virale RNA in allen Lokalisationen nachgewiesen werden, abgesehen von wenigen Fällen, in denen dies wegen ungeeigneter Fixierung und zu langer Lagerung des Gewebes nicht mehr möglich war. Bei Rindern mit experimentell induzierter Mucosal Disease konnte im Gehirn stets nur der nichtzytopathogene Biotyp nachgewiesen werden.
5. Trotz hoher Empfindlichkeit der Methode konnte in den mißgebildeten Kälbergehirnen BVDV-RNA in keinem Fall gefunden werden, was auf ungeeignete Fixierung und zu lange Lagerung der untersuchten Gewebe zurückgeführt werden muß.
6. Die BVDV-induzierten Gehirnmißbildungen bei Schaffeten konnten eindeutig auf eine Infektion mit dem zytopathogenen Biotyp des Virus zurückgeführt werden. Zytopathogenes BVDV konnte in Gehirnen experimentell transplazentar infizierter Schaffeten bis zum 14. Tag post infectionem nachgewiesen werden; zu späteren Zeitpunkten war es möglicherweise durch das fetale Immunsystem bereits eliminiert.
7. Die Etablierung einer nichtradioaktiven *in situ* Hybridisierung in fixiertem Gewebe ermöglichte die Bestimmung der zellulären Lokalisation der BVDV-RNA. Diese war in den Rindergehirnen in denselben Hirnregionen und Zellen (ausschließlich im Zytoplasma von Nervenzellen) nachweisbar, in denen bei früheren Untersuchungen Virusantigen dargestellt werden konnte. Die einzige Ausnahme stellte die Hypophyse dar. Während Virusantigen vormals lediglich in der Adenohypophyse gefunden werden konnte, war Virusnukleinsäure hier nur in der Neurohypophyse darstellbar.

In anschließenden *in situ* Hybridisierungen soll durch Einsatz positivsträngiger BVDV-Sonden untersucht werden, ob BVDV sich in den Nervenzellen aktiv repliziert, oder ob es lediglich in nichtproduktiver Form vorliegt. Daneben soll eine *in situ* Hybridisierung mit der Möglichkeit zur Unterscheidung der Biotypen in formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe etabliert werden.

SUMMARY

Achim Dieter Gruber

Detection of bovine viral diarrhoea virus in the brain by polymerase chain reaction and *in situ* hybridization

Besides mild, transient diarrhoea and lethal mucosal disease, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) may induce malformations of the brain with severe neurological disorders in calves and lambs. So far, it is unknown why no virus was detected in most cases of malformations of the brain. In persistent BVD-viremic cattle, however, the virus is present in many organs including the central nervous system without causing any neurological or pathological changes.

The purpose of this study was to detect the virus in different localizations of brains of cattle with mucosal disease, persistent BVD-viremia and of malformed brains of calves and lambs using molecular biological methods (polymerase chain reaction and *in situ* hybridization). Brains from 69 adult cows, calves and lambs were available in the Institute of Pathology, School of Veterinary Medicine, Hannover, partly fresh or deep frozen, partly formalin-fixed and paraffin-embedded. It was intended to find out, which of the brains contained the viral nucleic acid (RNA). If possible, the biotype (cytopathic or noncytopathic) should be identified.

The following results were obtained:

1. A polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR) was established to detect BVDV-RNA in fresh and deep frozen brain tissue. For the detection in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue, a "*nested*" RT-PCR was performed. A 402 bp fragment (RT-PCR) and a 803 bp fragment ("*nested*" RT-PCR) were amplified from the genomic region coding for the viral protein p125. Virus infected tissue cultures and fresh brains of persistently BVDV-infected cattle were employed to establish the PCR method. The choice of primers allowed the differentiation of viral RNA of the two biotypes (cytopathic or noncytopathic) in BVDV-strains *Indiana*, *MD1*, *NADL* and *Osloss*.

2. The features of the employed PCR were characterized (detection limit: 10^{-5} TCID₅₀/ml; sensitivity: up to 100%, depending on tissue fixation and time of tissue storage; specificity: 100%; reproducibility: 100%).
3. Tissue autolysis for up to ten days had no influence on the detectability of BVDV-RNA. However, formalin-fixation for more than ten days (10% unbuffered formalin) or more than two months (5% neutral-buffered formalin) and storage of fixed tissue for more than two years resulted in a reduction or total loss of the detectability of viral RNA.
4. In brains of cattle with persistent BVD-viremia or mucosal disease, viral RNA could be detected in all localizations examined. This was not possible with brains that were fixed unsuitably or stored for more than two years. In cattle with experimentally induced mucosal disease, only the noncytopathic biotype could be detected in the brain.
5. In spite of high sensitivity of the PCR-method applied, BVDV-RNA could not be detected in malformed brains of calves due to unsuitable fixation and tissue storage of long duration (several years).
6. BVDV-induced malformations of brains in lambs were shown to be induced by the cytopathic biotype of the virus. RNA of cytopathic BVDV could be demonstrated in the brains up to day 14 after experimental infection. At later times, the virus was obviously eliminated by the fetal immune system.
7. The establishment of nonradioactive *in situ* hybridization in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues allowed the precise cellular localization of BVDV-RNA. The latter was demonstrated in the same regions and cells (exclusively in the cytoplasm of neurons), where viral antigen had been found in earlier studies. The only exception was the pituitary gland: viral antigen had been detected only in the anterior lobe whereas viral nucleic acid could be demonstrated exclusively in the posterior lobe.

The purpose of subsequent studies is to find out whether the virus is actively replicating in the neurons by means of *in situ* hybridization using a positive strand probe. Additionally, it is intended to establish an *in situ* hybridization method for differentiation of the viral biotypes in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.