

Aus dem Institut für Virologie  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

---

**Methoden zur Isolierung von Ribonukleinsäure  
(RNA) zum Virusgenomnachweis mittels  
Polymerasekettenreaktion nach Reverser  
Transkription (RT-PCR)**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE  
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
Holger Matthias Scheibner  
aus Berlin

Hannover 2000

Wissenschaftliche Betreuung: PD. Dr. I. Greiser-Wilke

1. Gutachter : PD Dr. I. Greiser-Wilke

2. Gutachter : Prof. Dr. Brenig

Tag der mündlichen Prüfung : 30.05.2000

*Meinen Eltern*

*und*

*Linda*

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Modellpathogene</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Taxonomie</b>	<b>3</b>
2.2.1 Genus Flavivirus	3
2.2.2 Genus Pestivirus	4
2.2.3 Genus Hepacivirus	4
<b>2.3 Struktur und physikalische Eigenschaften des Virions</b>	<b>4</b>
2.3.1 Genus Flavivirus - Gelbfieber-Virus	4
2.3.2 Genus Pestivirus - BVDV und KSPV	5
<b>2.4 Genomorganisation und Proteine</b>	<b>6</b>
<b>2.5 Infektionsbiologie und Erkrankungen</b>	<b>11</b>
2.5.1 Gelbfieber	11
2.5.2 Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease	13
2.5.3 Klassische Schweinepest	15
<b>2.6 Direkter und indirekter Erregernachweis</b>	<b>17</b>
2.6.1 Direkter und indirekter Gelbfieber-Nachweis	17
2.6.2 Direkter und indirekter BVDV-Nachweis	17
2.6.3 Direkter und indirekter KSPV-Nachweis	18

<b>2.7 Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription</b>	<b>19</b>
2.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.7.2 Reverse Transkription (RT)	23
2.7.3 Auswertung der PCR	25
2.7.4 Empfindlichkeit der RT-PCR	25
2.7.5 Probleme der PCR	27
2.7.5.1 Bildung unspezifischer Amplifikate	27
2.7.5.2 Falsch-positive Ergebnisse- Problem der Kontamination	28
2.7.5.3 Falsch-negative Ergebnisse	29
2.7.6 Negative Kontrollen	30
2.7.7 Positive Kontrollen	31
2.7.8 Einsatz der RT-PCR zur Virus-Diagnostik	32
2.7.9 RT-PCR zum Nachweis von Flaviviren	33
2.7.10 RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren	33
<b>2.8 Vorbereitung von RNA für den Einsatz in der RT-PCR</b>	<b>34</b>
2.8.1 Freisetzung der Nukleinsäuren	35
2.8.2 Schutz der freigesetzten RNA	36
2.8.3 Beseitigung unerwünschter Substanzen	37
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Modellpathogene</b>	<b>40</b>
3.1.1 Vermehrung und Titration des BVDV-Stammes NADL	40
3.1.2 Vermehrung und Titration des KSPV-Stammes Alfort/187	41
3.1.3 Vermehrung und Titration des Gelbfiebervirusstammes 17D	41
<b>3.2 Probenmaterialien</b>	<b>43</b>
3.2.1 BVDV haltiges Probenmaterial	43
3.2.2 KSPV haltiges Probenmaterial	44
3.2.3 17D-Virus haltiges Probenmaterial	45
3.2.4 Negatives Probenmaterial	45

<b>3.3 Vorbereitung der Proben für die RNA-Isolierung</b>	<b>47</b>
3.3.1 Zellkulturüberstand	47
3.3.2 Fetales Kälberserum	48
3.3.3 Vollblut	48
3.3.4 Vollmilch	49
3.3.5 Sperma und Seminalplasma	50
3.3.6 Autoklaviertes Abwasser	50
3.3.7 KSPV haltiges Organmaterial	51
3.3.8 Lebergewebe	52
3.3.9 Positive Kontrollproben	52
3.3.10 Negative Kontrollproben	53
<b>3.4 RT-PCRs zum Genomnachweis von Pestiviren und des 17D-Virusgenoms</b>	<b>53</b>
3.4.1 Primer	53
3.4.2 RT-PCR	54
3.4.3 PCR zum Nachweis des 17 D-Virusgenoms	56
3.4.4 Erprobung unterschiedlicher DNA-Polymerasen und von HotStart-Verfahren	58
3.4.5 RT-PCR-Protokolle zum Nachweis von Pestivirusgenomen	58
3.4.6 Bestimmung der Nachweisgrenzen der etablierten RT-PCR-Protokolle	59
3.4.7 Visualisierung der PCR-Produkte im Agarosegel	59
3.4.8 Überprüfung der Spezifität des 17D-RT-PCR-Produktes	60
<b>3.5 Methoden zur Isolierung von RNA</b>	<b>60</b>
3.5.1 Erstellung einer Marktübersicht über kommerziell erhältliche RNA-Isolierungskits	60
3.5.2 Etablierung und Optimierung der Trizol-Standard-Methode	61
3.5.3 Optimierte Trizol-Standard-Methode	63
3.5.4 Erprobung der universellen Einsetzbarkeit der Trizol-Standard-Methode	64
3.5.5 Trizol-Standard-Methode kombiniert mit RNABind	65
3.5.6 Trizol-Standard-Methode kombiniert mit Genereleaser	65
3.5.7 RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen	66
3.5.8 RNA-Isolierung mit dem QIAamp Viral RNA-Kit der Firma Qiagen	67

3.5.9 RNA-Isolierung mit dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit	68
3.5.10 RNA-Isolierung mit den Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit	69
3.5.11 RNA-Isolierung mit dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit mit dem Puffer RAV	70
3.5.12 RNA-Isolierung mit den Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kits mit Bäckerhefen-RNA	71
3.5.13 RNA-Isolierung mit dem Purescript Kit der Firma Biozym	71
3.5.14 RNA-Isolierung mit dem Purescript Kit der Firma Biozym modifiziert	72
3.5.15 Vergleich der RNA-Isolierungskits und -methoden mit 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand	73
3.5.16 RNA-Isolierung aus komplexen Probenmaterialien	76
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>79</b>
<b>4.1 Vermehrung und Titration der Modellpathogene</b>	<b>79</b>
<b>4.2 Entwicklung und Optimierung der RT-PCR-Protokolle</b>	<b>79</b>
4.2.1 Erprobung unterschiedlicher DNA-Polymerasen und von HotStart-Verfahren	82
<b>4.3 RNA-Isolierung</b>	<b>83</b>
4.3.1 Marktübersicht über kommerziell erhältliche RNA-Isolierungskits	83
4.3.2 Etablierung und Optimierung der Trizol-Standard-Methode zur RNA-Isolierung	91
4.3.3 Erprobung der Trizol-Standard-Methode mit komplexen Probenmaterialien	92
4.3.4 Vergleichende Untersuchung der RNA-Isolierungsmethoden	93
4.3.5 Vergleich der unterschiedlichen RNA-Isolierungsmethoden aus 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand	94
4.3.6 Komplexe Probenmaterialien	103
4.3.7 Vollblutproben	105
4.3.7.1 Mit 17D-Virus künstlich kontaminierte Vollblutproben	105
4.3.7.2 BVDV haltige Vollblutproben	107
4.3.8 Vollmilch	109
4.3.9 Vollmilch konserviert	111

4.3.10 Sperma und Seminalplasma	111
4.3.11 Autoklaviertes Abwasser	113
4.3.12 Lebergewebe	115
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>117</b>
<b>5.1 Auswahl der Modellpathogene</b>	<b>117</b>
<b>5.2 Auswahl der Probenmaterialien</b>	<b>118</b>
5.2.1 Virushaltiger Zellkulturüberstand	120
5.2.2 Vollblut	120
5.2.3 Vollmilch	121
5.2.4 Sperma und Seminalplasma	122
5.2.5 Autoklaviertes Abwasser	123
5.2.6 Lebergewebe	124
<b>5.3 Etablierung und Optimierung der RT-PCRs zum Nachweis der Modellvirusgenome</b>	<b>125</b>
<b>5.4 RNA-Isolierungsmethoden</b>	<b>127</b>
5.4.1 Optimierung der Trizol-Standard-Methode	129
5.4.2 Vergleich der einzelnen RNA-Isolierungsmethoden unter Verwendung von 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand	130
5.4.3 Isolierung von RNA aus komplexen Probenmaterialien	132
5.4.3.1 Untersuchung von Vollblutproben	133
5.4.3.2 Untersuchung von Vollmilch	137
5.4.3.3 Untersuchung von Vollsperma und Seminalplasma	138
5.4.3.4 Untersuchung von autoklaviertem Abwasser	140
5.4.3.5 Untersuchung von Lebergewebe	141
<b>5.5 Schlußfolgerungen</b>	<b>142</b>
<b>5.6 Ausblick</b>	<b>143</b>



<b>6 ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY</b>	<b>144</b>
<b>7 LITERATURLISTE</b>	<b>148</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>188</b>
<b>8.1 Material</b>	<b>188</b>
8.1.1 Bruteier und Zellen	188
8.1.2 Enzyme	188
8.1.3 Nährmedien und Sera	188
8.1.4 Organische Lösungsmittel	189
8.1.5 Primer	189
8.1.6 Puffer und Lösungen	189
8.1.7 Reagenzien speziell für die RNA-Isolierung	191
8.1.7.1 Präzipitationshilfen	191
8.1.7.2 kommerzielle Kits zur RNA-Isolierung	191
8.1.8 Sonstige Reagenzien	192
8.1.9 Virusstämme	192
8.1.10 Wasser	192
<b>8.2 Geräte und Gebrauchsgegenstände</b>	<b>193</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
17D	Gelbfiebervirusimpfstamm 17D
A	Adenosin
Aqua bidest	<i>Aqua bidestillata</i> , zweifach destilliertes Wasser
BDV	Border Disease Virus
bp	Basenpaare
BVD	<i>bovine virus diarrhoea</i> , Bovine Virusdiarrhoe
BVDV	Virus der Bovinen Virusdiarrhoe
bzw.	beziehungsweise
C	allein Cytosin, im Zusammenhang mit Protein <i>core</i> , Kapsid
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CSF	<i>classical swine fever</i> , Klassische Schweinepest
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	Deutsche Mark
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	<i>envelope</i> , Virushülle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELA	Earle's Salzlösung mit Lactalbuminhydrolysat
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EtBr	Ethidiumbromid

FKN	Fetale Kälbernieren
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	<i>hora</i> , Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IE	internationale Einheiten
IFT	Immunfluoreszenztechnik
kD	Kilodalton
KID <sub>50</sub>	Kultur infektiöse Dosis 50
KSP	Klassische Schweinepest
KSPV	Virus der Klassischen Schweinepest
log <sub>10</sub>	Zehnerlogarithmus
M	<i>membrane</i> , Membran
m/V	Masse bezogen auf das Volumen
MD	Mucosal Disease
MES	<i>2[N-Morpholino]ethanesulfonic Acid</i>
min	Minute bzw. Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus- reverse Transkriptase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NS	Nichtstruktur-
NTR	nicht translatierte Region
opt	optimal
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFU	<i>plaque forming units</i> , plaquebildende Einheiten
pg	Pikogramm
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

PK	<i>porcine kidney</i> , Schweineniere
pmol	Pikomol
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
spp.	Spezies
T	Thymin
Ta	<i>annealing temperature</i> , Anlagerungstemperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (Bakterium)
TBE	Tris-Borat-EDTA
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur
Tth	<i>Thermus thermophilus</i> (Bakterium)
U	allein Uracil, bei Enzym Angabe der Aktivität in <i>units</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
WHO	<i>world health organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
x	fach / fache
z. B.	zum Beispiel
zp	zytopathogen

## 1 Einleitung

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro*-Technik zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragmentes aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) bzw. nach vorangeschalteter Reverser Transkription (RT-PCR) auch aus Ribonukleinsäure (RNA). Nachdem die PCR durch die Verfügbarkeit der thermostabilen DNA-Polymerasen automatisiert werden konnte, wird diese Methode zunehmend auch für den Nachweis von pathogenen Erregern in der Medizin eingesetzt.

Die PCR ist eine relativ schnell durchführbare Methode, deren Nachweisempfindlichkeit deutlich höher liegt als bei anderen Diagnostikverfahren. Eine vorherige Vermehrung des Mikroorganismus in Kultur, Bruteiern oder Versuchstieren ist nicht notwendig. Für die erfolgreiche Durchführung der PCR bzw. RT-PCR werden nur geringe Mengen Nukleinsäure des Zielorganismus benötigt. Dadurch eignet sich die PCR bzw. RT-PCR für den Nachweis aus Probenmaterial, das nicht genügend vermehrungsfähige Erreger enthält. Ebenso kann die PCR bzw. RT-PCR bei Probenmaterial eingesetzt werden, dessen Eigenschaften die Anzucht des Erregers verhindern. Da der Nachweis nur auf der Nukleinsäure des Zielorganismus basiert, kann zudem mit inaktiviertem Material gearbeitet werden. Dies ermöglicht einen sicheren Probentransport und die Diagnostik hochpathogener Erreger in Laboratorien ohne aufwendige Schutzeinrichtungen und Sicherheitsmaßnahmen. Nach dem Nachweis des spezifischen Amplifikationsproduktes ist dieses für weitergehende Untersuchungen einsetzbar. So kann durch Analyse der Sequenz des amplifizierten Genomabschnittes eine Erregertypisierung durchgeführt werden.

Viele Viren mit einem RNA-Genom sind für den Menschen Krankheitserreger, wie das Gelbfieber- oder das Hepatitis C-Virus. In der Veterinärmedizin sind sie für wichtige Tierseuchen, wie die Klassische Schweinepest, den seuchenhaften Spätabort beim Schwein oder die Geflügelpest, verantwortlich. Eine schnelle und sichere Diagnostik dieser Erreger ist eine Grundvoraussetzung für eine effektive Bekämpfung und den Schutz vor Weiterverbreitung. Der Nachweis mittels RT-PCR ist wegen der oben genannten Vorteile ein geeignetes Diagnostikverfahren.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Amplifikation ist jedoch, dass die Nukleinsäure den für die Reaktion notwendigen Enzymen und Reagenzien zugänglich gemacht wird. Zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse müssen die Nukleinsäuren vor Abbau und Verlust geschützt und Stoffe, die die enzymatischen Reaktionen stören, aus der Probe entfernt werden. Vor der eigentlichen Nukleinsäureamplifikation in der PCR bzw. RT-PCR steht daher ein Nukleinsäureextraktionsschritt. Dieser hat einen wesentlichen Einfluß auf Nachweisgrenze, Geschwindigkeit und Automatisierbarkeit der Diagnostik mittels RT-PCR.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Effektivität verschiedener Methoden bzw. kommerziell verfügbarer Kits zur Isolierung und Aufbereitung viraler RNA für den Einsatz in der RT-PCR zu vergleichen. Es sollte eine RNA-Isolierungsmethode gefunden werden, die den sensitiven und sicheren Nachweis viraler RNA mittels RT-PCR aus verschiedenen Probenmaterialien ermöglicht. Über die Feststellung der Nachweisgrenze in der RT-PCR sollte die Effizienz der RNA-Isolierung mit den verschiedenen Methoden bzw. Kits aus virushaltigem Zellkulturüberstand, Vollblut, Vollmilch, Sperma, Seminalplasma, Abwasser und Lebergewebe bestimmt werden. Es wurden klinische Proben oder künstlich kontaminierte Materialien verwendet, die die zur Familie Flaviviridae gehörenden Modellpathogene Gelbfiebervirusimpfstamm 17D (17D), Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) oder Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) enthielten. Die Verfahren sollten zudem im Hinblick auf Handhabung, Zeitbedarf und Kosten evaluiert werden.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Modellpathogene**

Die drei verwendeten Modellpathogene Gelbfiebervirusimpfstamm 17D, das Virus der bovinen Virusdiarrhoe und das Virus der Klassischen Schweinepest gehören zur Familie der Flaviviridae, die eine Anzahl wichtiger human- und tierpathogener Erreger enthält (MAYO u. PRINGLE 1998; BOS 1999; PRINGLE 1999).

### **2.2 Taxonomie**

Die Familie Flaviviridae beinhaltet die Genera Flavivirus, Pestivirus und Hepacivirus (MAYO u. PRINGLE 1998; BOS 1999; PRINGLE 1999). Diese Genera weisen unterschiedliche biologische Eigenschaften auf und zeigen keine serologischen Kreuzreaktionen. Sie erscheinen jedoch in Virusmorphologie, Organisation des Genoms und in der Art der RNS-Replikation ähnlich (WENGLER 1991a).

#### **2.2.1 Genus Flavivirus**

Das Genus Flavivirus enthält mehr als 68 Mitglieder, die in serologisch unterscheidbare Gruppen eingeteilt werden (MONATH et al. 1986; MONATH u. HEINZ 1996). Die meisten Flaviviren werden über infizierte Moskitos oder Zecken auf Wirbeltiere übertragen. Durch Arthropoden übertragene Flaviviren verursachen bei Mensch und Tier gefährliche Erkrankungen und sind weltweit verbreitet (SHOPE 1980). Von globaler Bedeutung sind Dengue Fieber, Japanische Enzephalitis, Zeckenzephalitis und Gelbfieber (MONATH u. HEINZ 1996).

### **2.2.2 Genus Pestivirus**

Das Genus Pestivirus beinhaltet das BVDV, das KSPV und das Virus der Border Disease. (MOENNIG u. PLAGEMANN 1992). Beim Virus der Bovinen Virusdiarrhoe unterscheidet man auf Grund ihres Verhaltens in der Zellkultur zwei Biotypen, den nichtzytopathogen und den zytopathogen (UNDERDAHL et al. 1957; GILLESPIE et al. 1960). Die drei tierpathogenen Pestiviren sind serologisch verwandt (HAHN u. LIESS 1972). Pestiviruserkrankungen sind weit verbreitet und von großer ökonomischer Bedeutung.

### **2.2.3 Genus Hepacivirus**

Das Genus Hepacivirus wurde nach dem Hepatitis C-Virus benannt, das insbesondere in der Genomorganisation Ähnlichkeiten mit den Genera Flavi- und Pestivirus aufweist (CHOO et al. 1989; MATSUURA u. MIYAMURA 1996). Im Jahre 1995 wurde ein weiteres Virus entdeckt, welches hohe Nukleotidsequenzhomologien mit dem Hepatitis C-Virus aufweist. Es wird als HGV oder GB-Virus bezeichnet und ebenfalls dem Genus Hepacivirus zugeordnet (SIMONS et al. 1995; LINNEN et al. 1996).

## **2.3 Struktur und physikalische Eigenschaften des Virions**

### **2.3.1 Genus Flavivirus - Gelbfieber-Virus**

Das Gelbfieber-Virus gehört dem Genus Flavivirus an. Bei den Flaviviren handelt es sich um sphärische, behüllte RNS-Viren, deren Durchmesser zwischen 40 und 60 nm liegt (MURPHY 1980). Die Virionen bestehen aus einer Lipiddoppelmembran, die zwei oder mehr Hüll- (E)-Proteine enthält. Diese Membran umhüllt ein Nukleokapsid, welches aus dem Genom, das von vielen Kopien eines kleinen Kapsid- (C)- Proteins umgeben ist, besteht. Das Nukleokapsid ist elektronendicht und weist einen Durchmesser von etwa 30 nm auf. Bedingt durch ihre Lipidhülle sind Flaviviren leicht durch organische Lösungsmittel und Detergentien

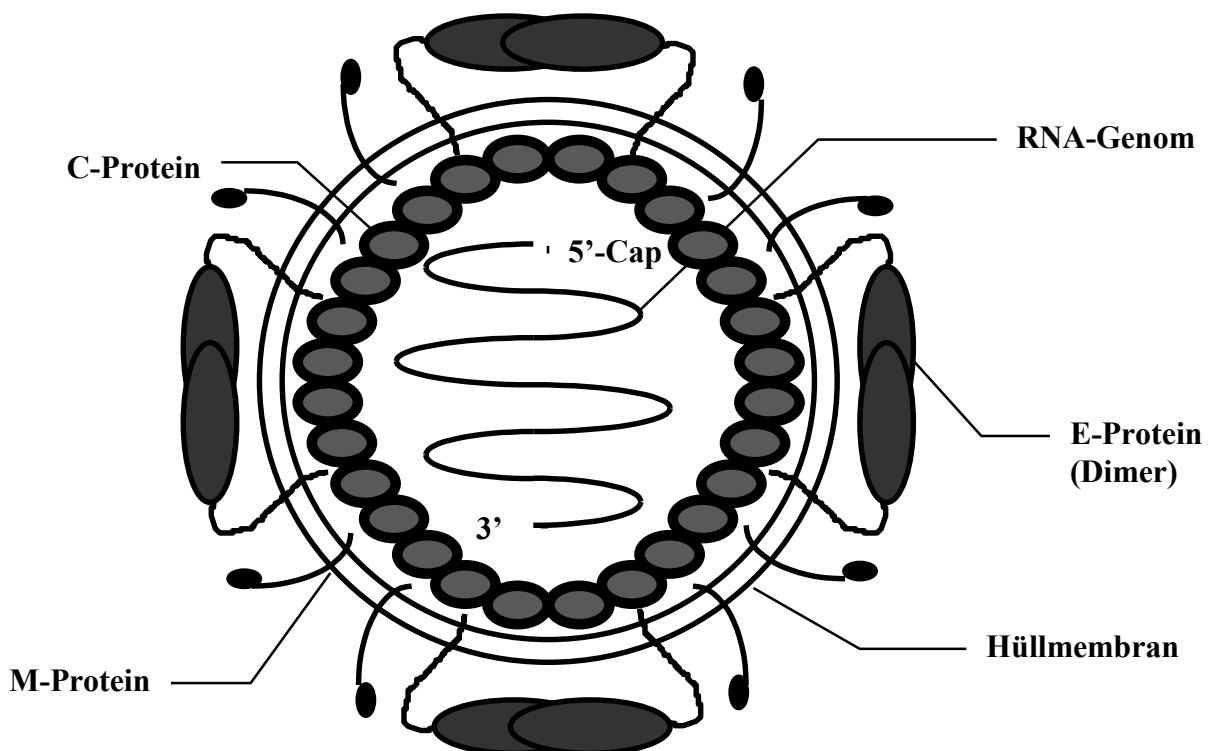


inaktivierbar (RUSSEL et al. 1980). Flaviviren sind in einem pH-Bereich von 8 bis 9 stabil (RUIZ-LINARES et al. 1989). Sie werden bei höheren Temperaturen schnell inaktiviert.

### 2.3.2 Genus Pestivirus - BVDV und KSPV

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe und das Virus der Klassischen Schweinepest sind Vertreter des Genus Pestivirus. Bei diesen handelt es sich um sphärische, behüllte RNS-Viren mit einem Durchmesser zwischen 40 und 60 nm (MOENNIG u. PLAGEMANN 1992). Pestiviren besitzen drei strukturelle Glykoproteine, wovon eines sich an der Oberfläche des Virions befindet (WEILAND et al. 1990). Die Virushülle umgibt ein wahrscheinlich hexagonal geformtes, elektronendichtes Kapsid mit einem Durchmesser von etwa 30 nm (HORZINEK et al. 1967). Bei höheren Temperaturen kommt es zu einer Inaktivierung des Virus. Bei Behandlung mit Detergentien und Lipidlösungsmitteln verlieren Pestiviren ihre Infektiösität. Im Gegensatz zu den Flaviviren sind Pestiviren in einem relativ breiten pH-Bereich von etwa pH 5,7 bis 9,3 stabil (HAFEZ u. LIESS 1972; LIESS 1981; DEPNER et al. 1992). In **Abbildung 1** ist die Flavivirusmorphologie schematisch dargestellt.

**Abbildung 1:** schematische Darstellung des Aufbaus eines Flaviviruspartikels (in Anlehnung an MODROW u. FALKE (1997))

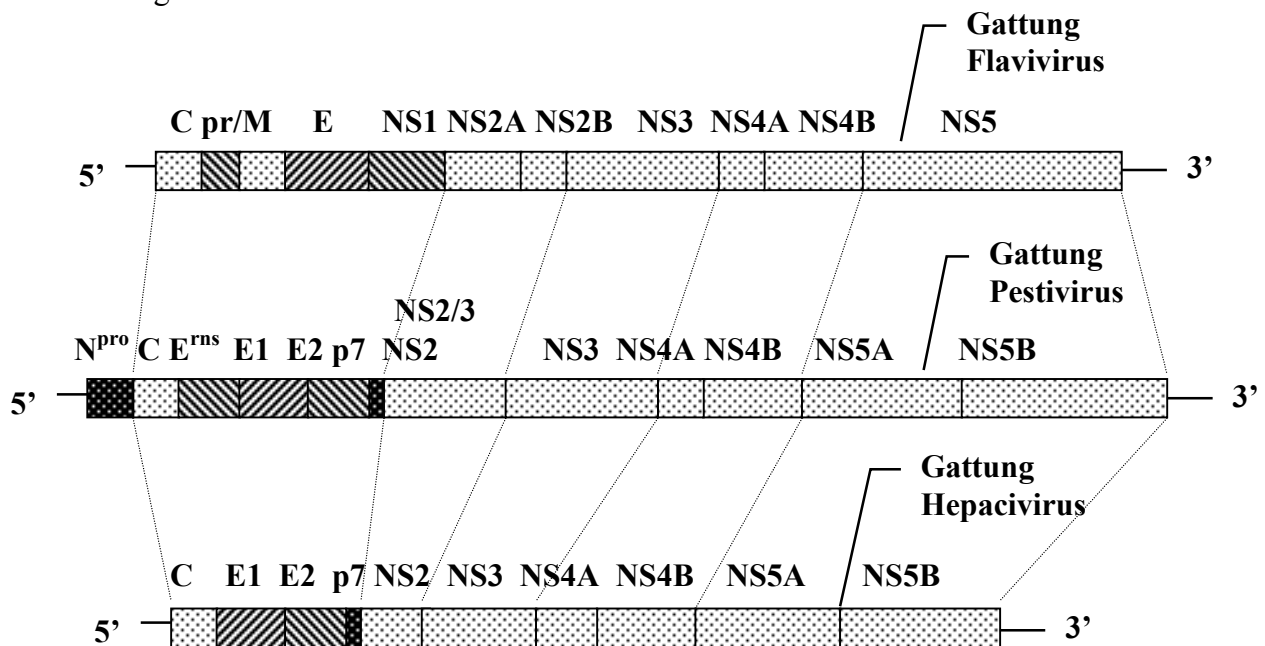


## **2.4 Genomorganisation und Proteine**

Das Genom der Flaviviridae besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül. Die Länge differiert zwischen 10862 Nukleotiden beim Gelbfiebervirusimpfstamm 17D, ca. 12000 Nukleotiden bei Klassischer Schweinepest und ca. 12500 Nukleotiden bei BVDV. Das BVDV-Genom kann in Abhängigkeit vom Virustyp Insertionen oder Duplikationen aufweisen (MEYERS u. THIEL 1996).

Die RNA liegt in Plusstrangorientierung vor und besitzt einen einzigen großen Leserahmen, der die Informationen für ein Polyprotein von etwa 3500-4000 Aminosäuren enthält (3411 Aminosäuren bei Gelbfieberimpfstamm 17D, BVDV und KSPV ca. 4000 Aminosäuren (COLLETT et al. 1988a; MEYERS u. THIEL 1996)). Sowohl während als auch nach der Translation wird dieses Polyprotein so prozessiert, dass über Spaltung und Bildung verschiedener Vorläuferproteine die Struktur- und Nichtstrukturproteine des jeweiligen Virus entstehen. Ausgehend von der Bezeichnung der Proteine bei den Flaviviren erfolgte auch eine entsprechende Anpassung der Bezeichnungen der Pestivirusproteine, die früher nach ihren Molekülmassen bezeichnet wurden (COLLETT 1994). Diese nunmehr einheitlichen Bezeichnungen für analoge Proteine ermöglichen vergleichende Betrachtungen innerhalb unterschiedlicher Stämme der Gattung Pestivirus und der Familie Flaviviridae (**Abbildung 2**). Die RNA der Flavi- und Pestiviren besitzt am 5'-Ende eine Cap-Struktur. Der Leserahmen wird am 5'- und 3'- Ende von nichttranslatierten Nukleotidfolgen flankiert, die verschiedene Sekundärstrukturen und konservierte Sequenzbereiche enthalten. Beim Gelbfiebervirus umfasst die 5'-nicht-translatierte Region (NTR) 118 Nukleotide und die 3'-NTR 511 Nukleotide (BRINTON u. DISPOTO 1988). Die Pestiviren haben eine 5'-NTR von fast 400 Nukleotiden mit vielen AUG-Kodons. Die 3'-NTR weist mehr als 200 Nukleotide auf (COLLETT et al. 1988b; MEYERS et al. 1989b; MOORMANN et al. 1990). Das 3'-Ende bei Flavi- und Pestiviren ist nicht polyadenyliert, enthält jedoch adenosinreiche Basenfolgen variabler Länge (BRINTON et al. 1986). Durch Sequenzanalysen des 5'-Endes bei BVDV erfolgte eine Einteilung in zwei Genotypen (RIDPATH et al. 1994). Die meisten bisherigen BVDV-Isolate gehören dem Typ I an. Diese Isolate weisen eine deutlich höhere Nukleinsäuresequenzhomologie zu KSPV-Stämmen auf als die Isolate des Genotyps II.

**Abbildung 2:** Nomenklatur der Proteine und Position der sie kodierenden Gene im Genom der Gattungen der Familie Flaviviridae



**Npro** ist eine Protease mit autoproteolytischer Aktivität, die nur bei den Pestiviren vorkommt (WISKERCHEN et al. 1991a; STARK et al. 1993). Es handelt sich um das erste Protein innerhalb des viralen Polyproteins und gehört zur Gruppe der sogenannten "*accessory leader proteases*", die bei tierischen und pflanzlichen Viren identifiziert worden sind (GORBALENYA 1991).

Beim **C-Protein** handelt es sich um das bei allen Flaviviridae vorkommende Kapsidprotein, das zusammen mit der viralen RNA das Nukleokapsid ausbildet. Es enthält eine hohe Anzahl basischer Aminosäuren, die mit dem RNA-Genom interagieren. Das carboxyterminale Ende ist hydrophob und wirkt als Signalpeptid für Translation und Spaltung des folgenden Proteins. Die Aufgaben des C-Proteins sind Schutz des Genoms und die Funktion eines Transkriptionsregulators (MANDL et al. 1988; MEYERS u. THIEL 1996; RICE et al. 1986).

Das **PrM-Protein** kommt nur bei den Flaviviren vor und ist Vorläufer des in der Virusmembran verankerten **M-Proteins** (RICE et al. 1986). Das PrM-Protein ist an Asparaginresten glykosyliert. Es enthält auch sechs konservierte Cysteinreste, die alle an der Bildung intramolekularer Disulfidbrücken beteiligt sind (NOWAK u. WENGLER 1987). Während der Passage durch den Golgi-Apparat wird der aminoternale Anteil des PrM-

Proteins durch eine furinähnliche, zelluläre Protease abgespalten und in das extrazelluläre Medium freigesetzt (MURRAY et al. 1993). Das in der Virusmembran verankerte Strukturprotein M enthält eine kurze äußere Domäne, gefolgt von zwei in der Membran befindlichen Domänen (WENGLER u. WENGLER 1989).

Bei den **Hüllproteinen** unterscheiden sich die Genera Flavi- und Pestivirus. Das **E-Protein** der Flaviviren ist meist glykosyliert und liegt als Dimer (HEINZ u. KUNZ 1980) vor. Es ist über eine hydrophobe Aminosäurefolge im carboxyterminalen Bereich mit der Membran verankert. Es handelt sich um das Haupthüllprotein der Flaviviren. Die E-Protein-Sequenzen verschiedener Flaviviren zeigen untereinander Bereiche hoher Homologie, aber auch von Divergenz (CHAMBERS 1990; HEINZ 1990). Die zwölf Positionen der Cystein-Aminosäuren in der Ektodomäne des E-Proteins sind stark konserviert und an der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken beteiligt (NOWAK u. WENGLER 1987). Das Dimer bildet keine langen Projektionen oder Spikes, sondern liegt, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen, flach auf der Virusoberfläche auf (MURPHY 1980). Das E-Protein vermittelt die Adsorption des Virus an die Zellen und die Fusion. Es wird angenommen, dass die aktive Einheit für die Fusion ein E-Protein-Trimer darstellt, das sich bei einer Reorganisation der Virusoberfläche bei einem sauren pH-Wert ausbildet (MURPHY 1980; RUSSEL et al. 1980). Das E-Protein ist für die hämagglutinierenden Eigenschaften zuständig. Im Verlaufe einer Infektion werden gegen Epitope auf dem E-Protein gerichtete virusneutralisierende Antikörper induziert (MANDL et al. 1989a).

Die Glykoproteine **Erns**, **E1** und **E2** der Pestiviren bilden ebenfalls über Disulfidbrücken Komplexe, die mit der Virushülle assoziiert sind (THIEL et al. 1991). Es werden Erns-Homodimere, E1/E2-Heterodimere und E2-Homodimere gebildet (STARK et al. 1990; WEILAND et al. 1990; THIEL et al. 1991). Für die Glykoproteine E1 und E2 wurden als Membrananker dienende hydrophobe Regionen identifiziert (RÜMENAPF et al. 1993). Das Erns-Protein dagegen hat keine hydrophobe Region, die als Membrananker dienen könnte und wird in Zellkultur in den Überstand abgegeben (WEILAND et al. 1992; RÜMENAPF et al. 1993). Das Erns-Protein besitzt kein Analogon bei anderen Vertretern der Familie Flaviviridae. Es besitzt eine RNase-Aktivität (SCHNEIDER et al. 1993; HULST et al. 1994) und spielt eine Rolle bei der Virusreplikation (WINDISCH et al. 1996). Außerdem induziert es in aufgereinigter Form Apoptose in Lymphozyten (BRUSCHKE et al. 1997;

SUMMERFIELD et al. 1998). Das Erns-Protein ist stark glykosyliert (RÜMENAPF et al. 1993) und induziert die Bildung schwach neutralisierender Antikörper (RÜMENAPF et al. 1991; WEILAND et al. 1992). Gegen das E1-Protein gerichtete neutralisierende Antikörper wurden bisher nicht beschrieben. Das E2-Protein stellt das Hauptimmunogen der Pestiviren dar und ist für die Adsorption des Viruspartikels verantwortlich (BOLIN et al. 1988; DONIS et al. 1988; WENSVOORT et al. 1989; GREISER-WILKE et al. 1990; WEILAND et al. 1990).

Bei den Pestiviren liegt zwischen den Strukturproteinen und den folgenden Nichtstrukturproteinen das p7-Protein. Es handelt sich um ein stark hydrophobes Protein und tritt auch mit E2 assoziiert als E2p7 auf. Die Funktion ist bisher nicht bekannt (ELBERS et al. 1996).

Das **NS1-Protein** kommt nur bei den Flaviviren vor, ist mit der Zellmembran assoziiert und wird teilweise von Säugerzellen sezerniert, während es von Moskitozellen nicht abgegeben wird (MASON 1989; POST et al. 1991). Das NS1-Protein liegt überwiegend als Dimer vor (WINKLER et al. 1988; WINKLER et al. 1989). Die Funktion des NS1-Proteins liegt wahrscheinlich in der frühen Virusreplikation (MUYLAERT et al. 1996 u. 1997). Außerdem hat das NS1-Protein Einfluß auf die Virulenz (PLETNEV et al. 1993). Bei einer natürlichen Flavivirus-Infektion werden gegen das NS1-Protein gerichtete, Komplement bindende Antikörper gebildet. Eine Schutzwirkung wird über eine Antikörper abhängige, Komplement bedingte Lyse der virusinfizierten Zellen, die NS1 an ihrer Oberfläche exprimieren, erreicht (SCHLESINGER et al. 1990).

Das **NS2-Protein** wird bei den Flaviviren in die Anteile NS2a und NS2b gespalten. Die Funktion von NS2a ist unklar (FALGOUT et al. 1989). Das NS2b-Protein der Flaviviren ist eine Zinkmetalloprotease und stellt einen essentiellen Kofaktor der NS3-Protease dar (CHAMBERS et al. 1993).

Das **NS3-Protein** der Flaviviren ist trifunktionell. Die aminoterminale Region besitzt eine Serin-Proteaseaktivität (BAZAN u. FLETTERICK 1989; GORBALENYA et al. 1989a; BAZAN u. FLETTERICK 1990), während die carboxyterminale Region Nukleotidbindungsstellen, RNA-Triphosphatase-Aktivität (GORBALENYA et al. 1989b; WENGLER 1991b; WARRENER et al. 1993; WENGLER 1993) und eine Helikaseaktivität (GORBALENYA et al. 1989b) enthält. Die Proteaseaktivität ist für Spaltungen im

Polyprotein zuständig. Die übrigen Funktionen sind wahrscheinlich für die Entwindung der stark strukturierten RNA bei der Genomreplikation und bei Translation und Synthese des Polyproteins notwendig. Die RNA-Triphosphatase-Aktivität spielt auch bei der Bildung der CAP-Struktur am 5'-Ende des Genoms eine Rolle (GORBALENYA et al. 1989).

Das **NS2-3-Protein** der Pestiviren hat eine Größe von ca. 125 kD. Die am carboxyterminalen Ende gelegenen zwei Drittel mit einer Größe von ca. 80 kD sind bei den Pestiviren hochkonserviert (MEYERS et al. 1989) und enthalten Sequenzmotive, die denen des NS3-Proteins anderer Vertreter der Familie Flaviviridae entsprechen. Das NS2-3-Protein der Pestiviren weist eine Serin-Protease-, RNA-Helikase- und RNA-abhängige NTPase-Aktivität auf (WISKERCHEN u. COLLETT 1991; TAMURA et al. 1993; WARRENER u. COLLETT 1995). Bei einigen Pestiviren wird das NS2-3 Protein in ein 80 kD großes und ein 54 bzw. 41 kD großes Protein prozessiert (COLLETT et al. 1988a; MEYERS et al. 1991; GREISER-WILKE et al. 1992). Das 80 kD große, dem NS3-Protein entsprechende Protein tritt bei BVDV nur bei den zytopathogenen Biotypen auf (PURCHIO et al. 1984; DONIS u. DUBOVI 1987; POCOCK et al. 1987; MEYERS et al. 1992). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des 80 kD großen Proteins und der Zytopathogenität wird postuliert. Mit der Bildung des NS3-Analogons sind bei einigen zp BVDV Auffälligkeiten im Genom verbunden. Für den BVDV-Stamm "Osloss" wurde der Weg der Prozessierung bis zur Entstehung des NS3 aufgeklärt. BVDV "Osloss" weist zwischen dem NS2- und NS3-Gen eine Insertion auf, die einer vollständigen zellulären Ubiquitinsequenz entspricht (MEYERS et al. 1989, 1991; QI et al. 1992; TAUTZ et al. 1993; RIDPATH et al. 1994). Es kommt dadurch sowohl am aminoterminalen als auch am carboxyterminalen Ende zur posttranslationalen Spaltung durch zelluläre Enzyme und somit zur Expression des NS3-Proteins (TAUTZ et al. 1993). Für die Viren NADL, MD-1 und Indiana konnten ebenfalls Insertionen zellulären Ursprungs im Bereich des NS2-3-Genes nachgewiesen werden. (MEYERS et al. 1989, 1991, 1992; GREISER-WILKE et al. 1992 u. 1993; FRITZEMEIER 1995 u. 1997). Andere Viren haben eine NS3-Gen-Duplikation, die mit einer Geninsertion verbunden ist (MEYERS et al. 1991; QI et al. 1992; GREISER-WILKE et al. 1993; RIDPATH et al. 1994). Insertionen oder Duplikationen im NS2-3-Gen konnten jedoch nicht bei allen zytopathogenen Viren nachgewiesen werden (GREISER-WILKE et al. 1993).

Die sowohl bei Flavi- wie auch bei Pestiviren vorhandenen Proteine **NS4a** und **NS4b** entstehen durch Prozessierung des Nichtstrukturproteins **NS4**. Beide Proteine scheinen mit zellulären Membranen assoziiert zu sein. Über die Funktionen ist bisher nichts bekannt. Für das NS4a wird eine Funktion als Kofaktor und Stabilisator des NS3-Proteins vermutet (CHAMBERS et al. 1990b, LIN et al. 1993).

Bei den Flaviviren stellt das **NS5-Protein** das letzte Nichtstrukturprotein dar, das sich am carboxyterminalen Ende des Polyproteins befindet. Es ist das größte und am meisten konservierte Protein der Flaviviren (MANDL et al. 1989b). Es wird vermutet, dass das NS5-Protein bifunktionell ist. Am aminoterminalen Ende des NS5-Proteins befindet sich eine zu Methyltransferasen homologe Region, die an der Methylierung der 5'-cap-Struktur beteiligt sein soll (KOONIN 1993). Des Weiteren finden sich Sequenzmotive, die charakteristisch für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase sind (KAMER u. ARGOS 1984; RICE et al. 1985 u. 1986). Bei den Pestiviren wird das am carboxyterminalen Ende befindliche letzte Nichtstrukturprotein in das stabile NS5a-Protein und das NS5b-Protein, das nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt und somit einen limitierenden Faktor bei der Replikation darstellt, prozessiert. Auch hier deuten charakteristische Sequenzmotive auf eine Funktion des NS5b-Proteins als RNA-abhängige RNA-Polymerase hin (COLLETT et al. 1988b u. 1991; MEYERS et al. 1989b).

## **2.5 Infektionsbiologie und Erkrankungen**

### **2.5.1 Gelbfieber**

Das Gelbfiebervirus ist ein bedeutender humanpathogener Erreger sowie Namensgeber und Prototyp der Familie Flaviviridae. Gelbfieber wurde erstmals 1648 in Yucatan beobachtet (STRODE 1951; MONATH 1991). Die virale Natur des Erregers konnte jedoch erst Anfang des 20. Jahrhunderts durch Walter Reed aufgeklärt werden (REED 1901).

Gelbfieber ist eine Zoonose und kommt hauptsächlich in Afrika und Südamerika vor. Die Replikation des Gelbfiebervirus findet in Vertebraten und Nichtvertebraten (Moskitos) statt. Eine Übertragung erfolgt unter natürlichen Bedingungen nur über Moskitos als Vektoren (LUDWIG u. IACONO-CONNORS 1993). In Afrika sind *Aedes africanus* und sylvatische Moskitos in den Urwäldern und in Südamerika *Haemogogus spp.* primäre Vektoren. In

städtischen Regionen stellt auf beiden Kontinenten *Aedes aegypti* den wichtigsten Vektor dar. Bei der Übertragung des Gelbfiebervirus müssen zwei Arten unterschieden werden. Auf der einen Seite existiert der Dschungeltyp des Gelbfiebers, der wildlebende Affen als natürliches Reservoir und neben *Aedes aegypti* auch andere in den Wäldern beheimatete Moskitoarten als Vektoren umfaßt (SOPER 1936; NASSAR et al. 1995). Demgegenüber wird beim sogenannten Urbanen Infektionszyklus in Städten Gelbfieber nur zwischen Menschen und dem Moskito *Aedes aegypti* übertragen (CORDELLIER 1991, GREISER-WILKE u. HAAS 1999). Die Bedeutung des Urbanen Infektionszyklus nimmt in der letzten Zeit zu (NASIDI et al. 1989; ROBERTSON et al. 1996; VAN DER STUYFT et al. 1999). Unter Laborbedingungen sind auch Aerosole eine mögliche Infektionsquelle (SCHERER et al. 1980). Wegen der Empfindlichkeit gegenüber sauren pH-Werten ist eine orale Infektion jedoch eher unwahrscheinlich.

Gelbfieber hat eine Inkubationszeit von 3-6 Tagen. Der Verlauf der Infektion ist biphasisch. Die Krankheit beginnt mit Fieber, Kopfschmerzen, Rückenschmerzen und Appetitlosigkeit. Die meisten Gelbfieberinfektionen klingen in diesem Stadium ab und bleiben unbemerkt. Die zweite Krankheitsphase ist durch Fieber, Erbrechen, Dehydratation, Abdominalschmerz und Auftreten eines Ikterus gekennzeichnet. Es kann zu Nierenversagen und Hämorrhagie auf Grund verminderter Synthese von Blutgerinnungsfaktoren in der Leber kommen. Hämatemesis, intraabdominale Blutungen und Hämoptyse sind Bestandteil einer schweren Symptomatik (SERIE et al. 1968; JONES u. WILSON 1972). Die Hälfte der Patienten, welche dieses zweite Stadium erreichen, stirbt zwischen dem 7. und 10. Tag infolge von Funktionsausfällen der Niere bzw. Leber, Schock oder Krampfanfällen. Das Gelbfiebervirus weist als Virulenzfaktoren Neurotropismus und Viszerotropismus auf, die Enzephalitis und Hepatitis induzieren (SERIE et al. 1968; JONES u. WILSON 1972; SCHÖNRICH 1997).

Gegen die Infektion mit Gelbfieber existiert ein effizienter Impfstamm, den THEILER und SMITH (1937) durch Passagierung des Gelbfiebervirus auf embryonalen Hühnergewebe erzeugt haben. Dieser als **17D** bezeichnete Gelbfieberimpfstamm hat die Fähigkeit verloren, Hepatitis zu erzeugen (THEILER u. SMITH 1937). Der Neurotropismus ist noch in reduziertem Maße insbesondere für das nicht ausdifferenzierte Gehirn vorhanden. Der Gelbfiebervirusimpfstamm 17D ist ein sicherer und effektiver Lebendvirusstamm, der unter WHO-Standards in infizierten Hühnerembryonen hergestellt wird (ROBERTSON 1993). Die



Impfung führt zu einer geringgradigen Virämie, die ein bis zwei Tage dauert und drei bis vier Tage nach der Inokulation beginnt. *Aedes aegypti* ist gegenüber einer oralen Infektion mit 17 D-Virus refraktär, so dass natürliche Übertragungen des Impfstammes ausgeschlossen werden können. Wegen des noch vorhandenen Neurotropismus und den damit möglicherweise verbundenen Schäden bei Kleinkindern (MERLO et al. 1993) ist die Impfung in einem Lebensalter von unter 6 Monaten kontraindiziert.

### **2.5.2 Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease**

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe verursacht verschiedene Krankheitsbilder unterschiedlichen Schweregrades, der von Immunstatus des Tieres, Infektionszeitpunkt, Biotyp und Virulenz des infizierenden BVDV-Stammes abhängt (MOENNIG u. LIESS 1995). Hauptsächlich treten zwei Krankheitsbilder auf (GILLESPIE et al. 1961; LIESS 1967). Die als Virusdiarrhoe der Rinder bezeichnete Form wurde erstmals 1946 beschrieben (OLAFSON et al. 1946). Die zweite mit Schleimhautkrankheit oder Mucosal Disease benannte Erscheinungsform wurde 1953 von RAMSEY und CHIVERS charakterisiert. In den letzten Jahren trat weiterhin ein als Hämorrhagisches Syndrom beschriebenes Krankheitsbild auf (REBHUHN et al. 1989; CORAPI et al. 1989 u. 1990; BOLIN u. RIDPATH 1992; LIEBLER et al. 1995). Das Infektionsspektrum umfaßt Wiederkäuer, einschließlich Wildwiederkäuer und das Schwein.

Akut infizierte Tiere scheiden nur vorübergehend geringe Mengen an Virus aus und sind für die horizontale Virusübertragung von geringer Bedeutung, da die Infektkette innerhalb einer Herde meist abbricht. Im Gegensatz dazu scheiden persistent infizierte Tiere große Mengen an Virus aus und führen zu einer effizienten Verbreitung der Infektion. Die Virusausscheidung erfolgt über Nasen- und Augensekrete, Faeces, Urin, Sperma sowie Uterus- und Geburtssekrete. Die Übertragung erfolgt horizontal durch Ingestion oder Inhalation (ROEDER u. HARKNESS 1986; LIESS 1990). Eine indirekte Übertragung über Fliegen, Futter, Stalleinrichtungen, Stallpersonal oder iatrogen ist möglich (TARRY et al. 1991; GUNN 1993; LANG-REE et al. 1994). Auch durch Sperma und Embryotransfer kann das BVDV übertragen werden (LIESS 1987; REVELL et al. 1988; PATON et al. 1989). Ein Übertragungsrisiko

besteht auch durch unvollständig inaktivierte Serumpräparate und Impfstoffe (ORBAN 1982; LOHR et al. 1983; KREEFT et al. 1990). Bei empfänglichen tragenden Tieren wird das Virus vertikal auf den Fötus übertragen (CASARO et al. 1971; KENDRICK 1971; BROWNLIE 1991).

Werden Tiere nach dem 125. Tag der Trächtigkeit oder nach der Geburt infiziert, kommt es zu einer kurzen Phase der Virusreplikation. Diese akuten Bovine Virusdiarrhoe-Infektionen verlaufen meist in einer milden Krankheitsform mit mäßigem Fieber, Leukopenie, Anorexie, Salivation, Nasenausfluß, Husten und geringgradigem Durchfall oder sind inapparent. Weiterhin können Pneumoenteritiden, Unfruchtbarkeit, Aborte (KAHRS 1968) und die Geburt anormaler, lebensschwacher Kälber (*weak calf syndrome*), Umrindern sowie Wachstumsstörungen auftreten (CASARO et al. 1971, KENDRICK 1971; BROWN et al. 1973; KAHRS 1973; DONE et al. 1980). Bei einer akuten Infektion kommt es zu einer Schwächung der Immunabwehr und dadurch zu Sekundärinfektionen. Gewöhnlich genesen diese Tiere schnell, wobei das Virus aus dem Körper eliminiert wird und sich eine lang anhaltende Immunantwort ausbildet.

Von entscheidender Bedeutung sind die intrauterinen Infektionen vor dem 125. Tag der Trächtigkeit. Es kann zu embryonalem Frühtod, Resorption, Totgeburten, einer Reihe von Mißbildungen und/oder zu einer persistenten Infektion kommen. Infizierte immuntolerante Kälber können überleben und erneut persistent infizierte Kälber zur Welt bringen. Die Immuntoleranz gegen das persistierende Virus ist hochspezifisch. Gegen andere BVDV-Varianten bleibt die Immunkompetenz erhalten (BOLIN 1988).

Die tödlich verlaufende Mucosal Disease entwickelt sich nur bei persistent infizierten Rindern. Akute Mucosal Disease tritt in der Regel im Alter von 6-24 Monaten auf, wobei das persistierende nichtzytopathogene und ein antigenetisch sehr eng verwandtes zytopathogenes Virus für die Pathogenese notwendig sind (McKERCHER et al. 1968; McCLURKIN et al. 1985; WILHELMSSEN et al. 1991). Die akute Mucosal Disease ist gekennzeichnet durch Anorexie, Salivation, Nasenausfluß, Fieber, profuse wässrige Diarrhoe sowie Erosionen im Verdauungstrakt und an den Klauen (BAKER 1987; MOENNIG et al. 1990). Der Tod tritt gewöhnlich zwei Wochen nach Auftreten der klinischen Symptome ein (RAMSEY u. CHIVERS 1953; RAMSEY 1956; BOLIN et al. 1985; MOENNIG et al. 1990).

Sehr selten tritt die chronische Form der Mucosal Disease/Virusdiarrhoe auf. Die Tiere sind persistent virämisch, zeigen über Wochen fortschreitendes Kümern, verbunden mit Diarrhoe, Schleimhauterosionen und Läsionen im Zwischenklauenspalt und Kronsaum (BROWNLIE 1991; MOENNIG et al. 1993).

Beim Hämorrhagischen Syndrom treten generalisierte Hämorrhagien, Fieber und blutig-wäßrige Diarrhoe auf. Im Blutbild sind Thrombozytopenie, Lymphopenie, Neutropenie und Anämie erkennbar (REBHUN et al. 1989; CORAPI et al. 1989 u. 1990; BOLIN u. RIDPATH 1992; LIEBLER et al. 1995).

### **2.5.3 Klassische Schweinepest**

Die Klassische Schweinepest wurde erstmals 1833 im Staate Ohio, USA, beobachtet. 1903 gelang es, ein filtrierbares Virus als Ursache der Schweinepest nachzuweisen (DE SCHWEINITZ u. DORSET 1904). Das Wirtsspektrum des KSPV beschränkt sich unter natürlichen Bedingungen auf Vertreter der Gattung *Sus*, was auf die niedrige Prävalenz im Feld zurückgeführt wird (MOENNIG u. PLAGEMANN 1992).

Das Virus wird mit Sekreten und Exkreten, wie Urin, Kot, Sperma, Speichel, schon in der Inkubationszeit, bei subakutem und chronischem oder atypischem Verlauf über längere Zeiträume ausgeschieden. Die Übertragung erfolgt auf direktem Wege durch Tierkontakte und indirektem Wege über Futterprodukte, Küchenabfälle (ANONYMUS 1960), viruskontaminierte Stallgeräte, Transportfahrzeuge, Personen, Einstreu und sonstige Materialien. Auch kann eine mechanische Übertragung durch Arthropoden erfolgen (VAN OIRSCHOT u. TERPSTRA 1989). Die Virusaufnahme erfolgt in der Regel über Ingestion, Einatmen oder Konjunktivalkontakt, sehr oft über Schlachtabfälle, Abwasser und nicht ausreichend erhitzte Küchenabfälle (MOENNIG 1993). Auch ist eine Übertragung über den Deckakt bekannt (GEIGER 1939). Die künstliche Besamung als Infektionsweg wird diskutiert (DE SMIT et al. 1999).

Die Klassische Schweinepest ist eine anzeigepflichtige Erkrankung. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 4 und 6 Tagen, in subakuten oder chronischen Fällen bis zu einem Monat. Es treten perakute, akute, chronische und klinisch inapparente Verlaufsformen auf, die vor allem

vom Alter der Tiere, der Virulenz des Virus und Sekundärinfektionen beeinflusst werden (VAN OIRSCHOT 1992).

Bei perakuten Verlaufsformen der Erkrankung kommt es zwei bis fünf Tage nach der Infektion zum plötzlichen Tod der Tiere ohne deutliche klinische Symptome (DUNNE 1973). Pathologisch-anatomisch findet man meist das Bild eines akuten Kreislaufversagens (TRAUTWEIN 1988).

Akute Infektionen sind gekennzeichnet durch Fieber um 41 °C, Störungen des Allgemeinbefindens mit Konjunktivitis, Ataxie, Anorexie, Erbrechen, abwechselnd Durchfall und Verstopfung, Rhinitis und Erythem sowie Bewegungsstörungen. Kreislaufstörungen zeigen sich in punktförmigen Hämorrhagien in der Haut und unregelmäßigen blauroten Verfärbungen in Schulter- und Kreuzgegend, an Nacken, Ohren und am Unterbauch. Im Blutbild zeigt sich Lymphopenie, aus der eine Immunsuppression resultiert (SUSA et al. 1992). Die Letalität schwankt zwischen 30 und 100 % (VAN OIRSCHOT 1992). Bei Jungtieren liegen die Verlustraten bei bis zu 80 Prozent, während ältere Tiere, wie z. B. Zuchttiere, häufig nur subklinisch erkranken.

Die chronische Verlaufsform hat nach ca. 30 Tagen einen lethalen Ausgang. Die im Erkrankungszeitraum auftretenden klinischen Symptome sind uncharakteristisch. Es kommt zu Inappetenz, Abmagerung, Enteritiden und/oder Pneumonien sowie Hautnekrosen. Fieber ist nicht immer vorhanden (MENGELING u. CHEVILLE 1968; MENGELING u. PACKER 1969; CHEVILLE u. MENGELING 1969). Wegen des unspezifischen klinischen Bildes trägt die chronische Verlaufsform auch die Bezeichnung atypische Schweinepest (REPPIN 1963).

Durch das gleichzeitige Vorhandensein von Antikörpern und KSP-Virus kann es zu einer auf der Bildung von Immunkomplexen beruhenden Glomerulonephritis kommen (CHEVILLE et al. 1970).

Beim atypischen milden und schleichenden Verlauf kommt es zu variablem Fieber, Durchfall, Störungen der Fruchtbarkeit, Aborten, Totgeburten, kongenitalem Tremor, Kümern, Ferkelsterben, nervösen klinischen Erscheinungen, wie Schwanken in der Nachhand, Störungen in der Bewegung, Krämpfen und Drehbewegungen (VAN OIRSCHOT 1992).

Pränatal kann das KSPV die Plazentarschranke durchbrechen. Dabei kommt es bei den Feten zur Schädigung der Organentwicklung, zu Mißbildungen, Geburt lebensschwacher oder toter Ferkel (VAN OIRSCHOT u. TERPSTRA 1977; FREY et al. 1980; MEYER et al. 1981) und

zum Überleben einiger kongenital persistent infizierter Ferkel, die zum Geburtszeitpunkt klinisch unauffällig erscheinen, dann kümmern und irgendwann sterben. Von Überlebenszeiten bis zu einem Jahr wird berichtet. Diese Form der Infektion wird als *late onset* bezeichnet (VAN OIRSCHOT 1992).

## **2.6 Direkter und indirekter Erregernachweis**

### **2.6.1 Direkter und indirekter Gelbfieber-Nachweis**

Der Virusnachweis ist auf Grund der kurzen Virämiephase schwierig. Vom Menschen gelingt er nur in den ersten 3-4 Fiebertagen aus Blut. Auch durch Biopsie oder Autopsie gewonnenes Lebergewebe ist für die Detektion des Gelbfiebervirus geeignet. Aus infizierten Moskitos ist der Virusnachweis stets möglich. Die Virusanzucht erfolgt in empfänglichen Zellkulturen von Warmblütern oder Moskitos, wobei die Moskitozelllinien in der Regel empfindlicher sind. Eine Virusvermehrung kann auch nach intracerebraler Inokulation in Mäusen oder nach intrathorakaler Inokulation in Moskitos erfolgen. Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assays (ELISA) werden ebenfalls zum Antigennachweis eingesetzt (MONATH u. NYSTROM 1984; GOULD et al. 1985; CAMMACK u. GOULD 1986; MONATH et al. 1986; XIAO et al. 1986). Aus *post mortem* gewonnenem Lebergewebe kann der Antigennachweis mittels Immunfärbungen und *in situ*-Hybridisierung erfolgen (GOULD et al. 1985; MONATH et al. 1989; HALL et al 1991; DE BRITO et al. 1992).

Antikörper können 5-7 Tage nach Ausbruch der Krankheitssymptome, das entspricht etwa 8-14 Tagen nach der Infektion bzw. Impfung, mit konventionellen immunologischen Verfahren, wie Immunfluoreszenztechnik (IFT), Komplementbindungsreaktion, Hämagglutinationshemmungstest oder Neutralisationstest, im Serum nachgewiesen werden (SCHÖNRICH 1997). Auch ELISA-Verfahren werden verwendet (NOGUEIRA et al. 1992).

### **2.6.2 Direkter und indirekter BVDV-Nachweis**

Da die meisten BVDV-Infektionen eher harmlos verlaufen, kommt der Diagnose persistierender Infektionen und der Mucosal Disease die größte Bedeutung zu.

Die Detektion persistenter Infektionen ist einfacher als bei akuten Infektionen, da die Virustiter meist sehr hoch sind. Der Antigennachweis gelingt über Virusisolierung in

Zellkulturen oder durch den Einsatz immunologischer Detektionsmethoden, wie IFT, ELISA oder Durchflusszytometrie (GOTTSCHALK 1991; GREISER-WILKE et al. 1993). Von lebenden Tieren sind die Lymphozytenfraktionen gerinnungsgehemmter Blutproben das beste Material für die Virusdetektion. Auch Milch, Kot oder Konjunktivalabstriche sind verwendbar. Als Untersuchungsmaterial von toten Tieren eignet sich eine Anzahl von Organen, wie Milz, Leber, Lymphknoten oder Knochenmark. Neben der reinen zellkulturellen Virusanzucht kann ein direkter Virusnachweis an Gewebeschnitten oder in der Zellkultur mit fluoreszenz- oder enzymmarkierten- Antikörpern erfolgen (RHODE u. LIESS 1970; HYERA et al. 1987). In der Zellkultur wird in den meisten Fällen nichtzytopathogenes Virus isoliert. Bei Tieren, die an Mucosal Disease erkrankt sind, kann das zytopathogene Virus mit höherer Wahrscheinlichkeit im Kot, im gastrointestinalen und lymphatischen Gewebe, wie den Darmepithelzellen, den Peyerschen Platten, den Lymphfollikeln der Mandeln, in Lymphknoten und Milz sowie in dendritischen Zellen der Thymusrinde, als im Blut gefunden werden (LIEBLER et al. 1991; HECKERT et al. 1998).

Der indirekte Virusnachweis, d.h. der Nachweis von gegen BVDV gerichteten Antikörpern, kann zur Ermittlung des Bestandstatus eingesetzt werden. Die beste Methode ist der Virusneutralisationstest (VNT). In der Routinediagnostik ist er jedoch weitgehend durch verschiedene Enzym-Linked-Immunosorben-Assays (ELISA) ersetzt worden (DURHAM u. HASSARD 1990; LECOMTE et al. 1990; MOENNIG et al. 1991). In skandinavischen Ländern findet der von NISKANEN et al. (1989) beschriebene kommerzielle, indirekte ELISA als Screening-Methode eine flächendeckende Anwendung. Neben Serumproben können für den Nachweis BVDV spezifischer Antikörper auch Einzel- oder Sammelgemelkproben eingesetzt werden (NISKANEN 1993). Dies ist aber nur dann sinnvoll, wenn flächendeckend auf eine Impfung verzichtet wird (GREISER-WILKE et al. 1999).

### **2.6.3 Direkter und indirekter KSPV-Nachweis**

Der direkte Nachweis des Virus ist immer dann gefordert, wenn der KSP-Verdacht bei Krankheits- oder Todesfällen geäußert wird. Der Erregernachweis vom lebenden Tier kann aus Leukozyten oder Sekreten erfolgen, die in Schweinezellkulturen inokuliert nach 2 Tagen

mittels Immunfluoreszenztechnik (IFT) oder direkter Immunperoxidase-Technik auf KSPV-Virusantigen untersucht werden (MENGELING et al. 1963). Vom toten Tier gelingt die Virusanzucht aus Organsuspensionen der Milz, aus Lymphknoten oder den Tonsillen. Mittels IFT ist der KSPV-Nachweis auch ohne vorherige Virusvermehrung in histologischen Schnitten oder in Abklatschpräparaten möglich. Eine serologische Abgrenzung vom BVDV mittels monoklonaler Antikörper muss nach zellkulturellem Nachweis über einen IFT oder einen indirekten Immunperoxidasetest erfolgen (HOLM JENSEN 1981; MOENNIG 1993; BÜTTNER u. AHL 1998; NEPOKLONOV et al. 1998). Der Antigennachweis kann auch über Antigen-EILSAs und Durchflußzytometrie geführt werden (KADEN et al. 1999).

Für den Nachweis von Antikörpern, die nach einer Infektion mit KSPV gebildet worden sind, stellt der Virusneutralisationstest die sicherste Nachweismethode dar (GILLESPIE et al. 1960; COGGINS u. SHEFFY 1961; VAN BEKKUM 1966). Für Massenuntersuchungen wird in der Regel ein weniger aufwendiger Neutralization-Peroxidase-Linked-Antibody-Assay (NPLA) (HYERA et al. 1987; DAHLE et al. 1993; DEPNER et al. 1994) oder ELISA zum Nachweis von Antikörpern (HAVE 1984; LEFORBAN et al. 1990; DAHLE u. LIESS 1993; MOENNIG et al. 1993; DEPNER et al. 1994) verwendet.

## **2.7 Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, "polymerase chain reaction") ist eine *in vitro* Technik zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragments aus Desoxyribonukleinsäure (DNA, "*deoxyribose nucleic acid*") (MULLIS u. FALOONA 1987; SAIKI et al. 1988), das zwischen zwei Genomregionen mit bekannter Nukleotidsequenz liegt. Dafür wird die Eigenschaft der DNA-Polymerasen genutzt, die zur Amplifikation kurze spezifische Oligonukleotide, sogenannte „*Primer*“ benötigen. Nach Umschreibung durch eine Reverse Transkription (RT) in die komplementäre DNA kann auch RNA mit Hilfe der PCR amplifiziert werden. Der Vorgang der RNA-Vermehrung mittels PCR wird daher als RT-PCR bezeichnet. Die spezifische Vermehrung von Genomabschnitten kann für den diagnostischen Nachweis von Viren genutzt werden.

### 2.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Jede PCR stellt eine wiederholte Abfolge von Zyklen dar. Jeder dieser Zyklen besteht aus drei Schritten.

#### 1. Trennung des DNA-Doppelstranges ("Denaturierung"):

Durch Erhitzen auf eine Temperatur um 95 °C werden die beiden Stränge der DNA voneinander getrennt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen durch Hitze zerstört werden.

#### 2. Anlagerung ("Annealing"):

Zwei *Primer* lagern sich über die Wasserstoffbrückenbindungen an die DNA-Einzelstränge. *Primer* sind kleine synthetisch hergestellte Stücke von einzelsträngiger DNA mit einer Länge von etwa 18 bis 35 Nukleotiden (Oligonukleotide). Sie werden so ausgewählt, dass sie komplementär zum 5'- bzw. zum 3'-Ende der Zielstränge sind, wobei sie die zu vermehrende Region begrenzen. Die *Primer* werden relativ zur Menge an Ziel-DNA im Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben, so dass sich die beiden komplementären Zielstränge eher mit den *Primern* als miteinander verbinden. Die Anlagerungstemperatur  $T_a$  liegt normalerweise zwischen 40 °C und 60 °C ist abhängig von der Basenzusammensetzung des *Primers* und der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur  $T_m$ . Für *Primer* bis zu einer Länge von etwa 20 Nukleotiden findet sich bei Mülhardt (1999) eine einfache Formel zur Berechnung von  $T_m$ :

$$T_m = 4 (\text{Anzahl G und C}) + 2 (\text{Anzahl A und T})$$

Eine für mehr als 20 Nukleotide geeignete Formel stammt von BALDINO et al. (1989):

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[J^+]) + 0,41 (\%G+C) - (675/n)$$

$J$  = Konzentration monovalenter Kationen in mol/l, %G+C = Anteil der Basen Guanin u. Cytosin in Prozent,  $n$  = Anzahl der Nukleotide



Mit der Formel nach RYCHLIK et al. (1990) kann aus  $T_m$  die optimale  $T_a$  ermittelt werden:

$$T_a^{opt} = 0,3 T_m^{Primer} + 0,7 T_m^{Produkt} - 14,9$$

### 3. Verlängerung ("Elongation"):

Die *Primer* dienen als Startpunkte für die DNA-Polymerase, die die matrizenabhängige Synthese des komplementären zweiten Stranges katalysiert. Die optimale Arbeitstemperatur der für die PCR verwendeten hitzestabilen Enzyme liegt bei ca. 72 °C.

Die Zeitdauer der einzelnen Schritte ist von der Länge des PCR-Produktes und den verwendeten Reagenzien und Geräten abhängig und liegt zwischen 30 Sekunden und 2 Minuten.

Diese Zyklen werden etwa 25 bis 40 mal wiederholt. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Anzahl amplifizierter Fragmente (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ... u.s.w.) (NEDELMANN et al. 1992), so dass nach 20 Zyklen theoretisch  $2^{20}=1048576$  Kopien entstanden sein müssten. Praktisch liegt jedoch die Effizienz eines jeden Zyklus niedriger, so dass eine exponentielle Vermehrung nicht erreicht wird (WANG et al. 1989).

### Reaktionsansatz:

Ein Reaktionsansatz für die PCR besteht grundsätzlich aus folgenden Komponenten (REMICK et al. 1990):

- Ziel-Desoxyribonukleinsäure (DNA), einzel- oder doppelsträngig
- Puffer
- Salze
- Magnesiumchlorid
- *Primer*
- Nukleotiden (A, C, G, T)
- thermostabile DNA-Polymerase

***Puffer:***

Die eingesetzten thermostabilen Polymerasen haben ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert oberhalb von 8. Zur Pufferung wird am häufigsten ein Tris-Puffer von pH 8,5 bis pH 9,0 verwendet.

***Salze:***

Kaliumchlorid (KCl) und Ammoniumsulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  werden zur Steigerung der Ausbeute der PCR-Reaktion zugesetzt. Natriumchlorid (NaCl) kann die Amplifikation hemmen (MÜLHARDT 1999).

***Magnesiumchlorid:***

Magnesiumionen sind der wichtigste Kofaktor der DNA-Polymerase und stimulieren ihre Aktivität. Außerdem bilden sie zusammen mit den Nukleotiden einen löslichen Komplex, der für den Nukleotid-Einbau entscheidend ist. Auch beeinflussen sie die Bindung der *Primer* und die  $T_m$  des DNA-Doppelstranges. Die Magnesiumchlorid-Konzentration ist somit für die Spezifität und Ausbeute der PCR von wesentlicher Bedeutung. Sie variiert in einem Bereich zwischen 0,5 mM und 5 mM.

***Primer:***

Die Oligonukleotide beeinflussen in hohem Maße den Erfolg einer PCR. Bedeutsam bei ihrer der Auswahl sind folgende Kriterien:

- Länge der *Primer*: 18 bis 35 Nukleotide
- Basenzusammensetzung der *Primer*: der G/C- Gehalt sollte bei ca. 50% liegen
- Komplementäre Bereiche zwischen den *Primern* sollten vermieden werden, da sie zur Bildung von *Primer*-Dimeren führen können. Hierbei sind insbesondere die 3'- Enden der *Primer* kritisch.
- *Primer*-Sequenzen mit signifikanten Sekundärstrukturen sollten vermieden werden.
- Mindestens die letzten fünf Basen am 3'-Ende der *Primer* sollten eine 100%-ige Homologie zur Zielsequenz aufweisen.
- Die optimale *Primer*-Konzentration liegt zwischen 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ .

***Nukleotide:***

Die Nukleotide stellen die Grundbausteine der neu zu bildenden DNA dar. Ihre optimale Konzentration hängt von der Länge des zu amplifizierenden Produktes, der Magnesiumchloridkonzentration, der Primer-Konzentration und der Stringenz der Reaktion ab. Die normalerweise verwendete Konzentration liegt bei etwa 100  $\mu\text{M}$ . Bei niedrigeren Konzentrationen arbeitet die DNA-Polymerase präziser (FINCKH et al. 1991).

***Thermostabile Polymerasen:***

Erst mit dem Einsatz thermostabiler Polymerasen (SAIKI et al. 1988) setzte sich die PCR als Nukleinsäureamplifikationstechnik durch. Es war die Voraussetzung für eine automatische Durchführung der PCR gegeben, ohne dass nach jedem Denaturierungszyklus neue DNA-Polymerase zum Reaktionsansatz gegeben werden musste.

Thermostabile Polymerasen ergänzen ausgehend vom 3'-Ende der an die Ziel-DNA gebundenen Primer die einzelsträngige Matrize durch Einbau der vier Nukleotide im Sinne einer komplementären Basenpaarung zu einem Doppelstrang. Sie wurden ursprünglich aus thermostabilen Mikroorganismen isoliert (z. B. *Thermus aquaticus*: Taq-Polymerase, CHIEN et al. (1976); *Thermus thermophilus*: Tth-Polymerase, MYERS u. GELFAND (1991)) und werden inzwischen gentechnisch hergestellt. Sie unterscheiden sich bezüglich der Thermostabilität, der Aktivität und der 3'-5'-Exonuklease-Funktion, die einer Korrekturaktivität entspricht und damit deutlich verringerte Fehlerraten ermöglicht (CLINE et al. 1996). Das definierte Temperatur-Zeit-Profil der PCR-Reaktion erfolgt in Reaktionsvolumina zwischen 20 und 100  $\mu\text{l}$  und wird in speziell programmierbaren Heizblöcken, sogenannten Thermocyclern, durchgeführt (MOSSA et al. 1991). Die optimalen Konzentrationen der thermostabilen Polymerase liegen zwischen 0,5 und 2,5 Einheiten bezogen auf einen 50  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz.

**2.7.2 Reverse Transkription (RT)**

Soll RNA in der PCR amplifiziert werden, muss mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige-DNA-Polymerase) zuerst eine komplementäre DNA synthetisiert werden

(KAWASAKI 1989). Die dabei entstandenen RNA-DNA-Heteroduplexe dienen als Ausgangsmaterial für eine Nukleinsäureamplifikation mittels PCR. Es gibt verschiedene Reverse Transkriptasen, die sich in der optimalen Arbeitstemperatur und Effizienz unterscheiden. Genannt seien die aviäre Myeloblastosevirus- Reverse Transkriptase (AMV-RT) (FROHMAN et al. 1988; LYNAS et al. 1989) und die Moloney-Mausleukämievirus-Reverse-Transkriptase (MMLV-RT) (BYRNE et al. 1988), die aus Retroviren stammen. Die Effizienz der Reversen Transkription kann durch den Einsatz von Reversen Transkriptasen mit deletierter RNaseH-Funktion erhöht werden, da die RNA in RNA-DNA-Heteroduplexen nicht mehr abgebaut wird (KOTEWICZ 1988). Als Beispiel seien die von einer MMLV-RT abgeleiteten Superscript und Superscript II Reversen Transkriptasen der Firma Gibco genannt. Eine der DNA-Polymerasen, die Tth-Polymerase, weist bei Anwesenheit von Mangan-Ionen ebenfalls eine Reverse Transkriptaseaktivität auf (MYERS u. GELFAND 1991).

Zum Umschreiben der RNA in DNA benötigt die Reverse Transkriptase ähnlich wie die DNA-Polymerase einen *Primer* in Form eines kurzen, an die DNA angelagerten Oligonukleotids. Diese *Primer* können eine spezifische oder auch eine zufällige Sequenz (*Random-Primer*) haben und sind meist zwischen 6 und 20 Nukleotiden lang.

Ein typischer Reaktionsansatz für eine Reverse Transkription besteht aus folgenden Bestandteilen:

- RNA
- Puffer
- *Primer*
- Nukleotide (A,C,G,T)
- RNase-Inhibitor (um den Abbau der RNA zu minimieren)
- Reverse Transkriptase

Das Temperatur-Zeit-Profil der RT-Reaktion kann ebenfalls in einem Thermocycler durchgeführt werden (MOSSA et al. 1991).

### **2.7.3 Auswertung der PCR**

Das Ergebnis der PCR-Reaktion besteht aus einem DNA-Fragment mit einer spezifischen Länge und Sequenz. Durch Auftrennung nach der Größe in einem Agarose-Gel und anschließender Färbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff, der sich in den DNA-Doppelstrang einlagert, wie z. B. Ethidiumbromid (EtBr) (KEMP et al. 1989), kann dieses DNA-Stück im UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht werden (SAMBROOK et al. 1989). Die Nachweisgrenze liegt etwa bei 2-4 ng DNA. Durch einen parallel aufgetragenen Größenmarker lässt sich die relative Größe des Stückes bestimmen (MULLIS u. FALLONA 1987).

Eine weitere Charakterisierung des PCR-Produktes kann durch anschließende Hybridisierung mit einer spezifischen Gensonde (SAIKI et al. 1985; SAMBROOK et al. 1989; SOUTHERN 1975), Restriktionsenzymchnittmusteranalyse (SAMBROOK et al. 1989) oder direkte Bestimmung der Nukleotidabfolge durch Sequenzieren (SANGER et al. 1977) erfolgen.

Eine Quantifizierung der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese ist durch Einsatz von Massenmarkern oder Vermessung der Leuchtstärke der Banden möglich. Auch ist der Einsatz von sogenannten PCR-ELISAs beschrieben (CHOW et al. 1997). Durch die direkte Messung der Einlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen (EtBr, Cybergreen) oder der Hybridisierung spezifischer fluoreszenzmarkierter Sonden mit den PCR-Amplifikaten kann mit modernen PCR-Geräten, wie z. B. dem LightCycler (Roche), dem GeneAmp 7700 (PE Biosystems) und dem iCycler (BioRad), eine Quantifizierung schon während der PCR erfolgen.

### **2.7.4 Empfindlichkeit der RT-PCR**

Ein sehr großer Vorteil der PCR gegenüber anderen Nachweisverfahren besteht in der außerordentlich großen Sensitivität. Theoretisch wäre der spezifische Nachweis eines einzelnen DNA-Moleküls möglich. Praktisch wird diese hohe Empfindlichkeit nur selten erreicht. Nach MÜLHARDT (1999) sind wenigstens 10000 Zielmoleküle für eine zuverlässige PCR notwendig. Für die Amplifikation von RNA muss der PCR noch die cDNA-

Synthese mittels Reverser Transkriptase vorangeschaltet werden. Die Effizienz der Reversen Transkription schwankt zwischen einzelnen Versuchen erheblich. Sie liegt zwischen 10 und 90 % (RAPPOLEE 1990). Die Nachweisgrenzen, die mit der RT-PCR erreicht werden, hängen nicht nur von der Effizienz der RT-PCR und ihrer Sensitivität und Spezifität ab, auch die Art der RNA-Vorbereitung (Freisetzung, Isolierung), das eingesetzte Probenmaterial und die Art der Auswertung der Nukleinsäureamplifikation haben einen großen Einfluß. So können andere Verfahren als Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung, wie Southern Hybridisierung (SOUTHERN 1975) oder PCR-ELISA (CHOW et al. 1997) eine Steigerung der Nachweisgrenze um den Faktor 10 bis 100 ermöglichen. Auch der Einsatz einer Zweistufen-PCR (*nested* PCR) (JACKSON et al. 1991) ermöglicht die Anhebung der Spezifität und der Nachweisgrenze um bis zu drei Zehnerpotenzen. Bei einer *nested* PCR werden zwei PCR-Reaktionen hintereinander durchgeführt. Dabei wird ein Teil des in der ersten PCR-Reaktion entstandenen Amplifikates mit *Primern*, die im inneren Bereich des PCR-Produktes binden, in einer zweiten PCR-Reaktion nochmals vermehrt. Durch den Einsatz von PCR-Produkten für die zweite PCR ist eine *nested* PCR jedoch deutlich anfälliger für Kontamination.

Die Angaben für die Empfindlichkeit der RT-PCR zum Nachweis viraler Pathogene sind in der Literatur nicht einheitlich. Die Nachweisgrenzen werden mit Angaben bezogen auf die Menge viraler RNA, die Anzahl eingesetzter Genomäquivalente oder die Anzahl nachweisbarer infektiöser Partikel, angegeben in PFU (*plaque forming units*) oder KID<sub>50</sub> (Kultur infektiöse Dosis) quantifiziert. Das dabei eingesetzte Bezugssystem ist jedoch auch nicht einheitlich. So beziehen sich die Angaben auf 1ml oder 1g Probenausgangssubstanz, auf die zur RNA-Isolierung eingesetzte Menge Probenmaterial oder auf das in einem PCR-Ansatz eingesetzte Volumen an Nukleinsäurepräparation. Andere Angaben beziehen sich auf Verdünnungen natürlich infizierten Materials. Beispielsweise werden für Hepatitis C Nachweisgrenzen zwischen 200 und 1000 Viruspartikeln je ml Plasma (HILFENHAUS 1995; NÜBLING et al. 1996) angegeben. HAYASHI et al. (1994) konnten das Hepatitis C-Virusgenom noch aus einer 1:100000 Verdünnung Hepatitis C haltigen Serums nachweisen. CHOW et al. (1993) geben für die virale RNA des Dengue-Virus eine Nachweisgrenze von 0,01 pg je RT-PCR-Reaktion an. Auch kann die Empfindlichkeit der RT-PCR relativ zu anderen Nachweisverfahren angegeben werden. So ist die RT-PCR im Vergleich zur

zellkulturellen Virusisolierung (HOOFT VAN IDDEKINGE et al. 1992; PAULI et al. 1991) oder zur Immunfluoreszenz (WIRZ et al. 1993) um eine bis vier Zehnerpotenzen empfindlicher.

## 2.7.5 Probleme der PCR

### 2.7.5.1 Bildung unspezifischer Amplifikate

Neben den gewünschten Amplifikationsprodukten können bei der PCR auch unspezifische Produkte entstehen (LYONS 1992). Diese weisen eine andere Länge und/oder Nukleotidfolge auf. Eine mögliche Ursache für unspezifische Amplifikate besteht darin, dass *Primer* an Sequenzen in der DNA-Matrize binden, die nicht exakt ihrer komplementären Basenfolge entsprechen (*mispriming*). Die Anzahl der möglichen fehlerhaften Basenpaarungen (*mismatches*) hängt dabei von der Höhe der *Primer*-Anlagerungstemperatur ab. Je niedriger die *Primer*-Anlagerungstemperatur ist, um so mehr unspezifische Bindungen sind möglich (RYCHLIK et al. 1990). Diese führen zu einer deutlichen Abnahme der Spezifität und Sensitivität einer PCR-Reaktion. Bereits nach 5 minütiger Inkubation eines PCR-Ansatzes bei Raumtemperatur sinkt die Empfindlichkeit um den Faktor 1000 (MULLIS 1991).

Es ist daher wichtig, die Bildung unspezifischer PCR-Produkte zu verhindern. Nach Lyons (1992) treten um so weniger unspezifische Amplifikate auf, je niedriger die Konzentrationen an Magnesiumchlorid, Nukleotiden und DNA-Polymerase im PCR-Ansatz sind. Weiterhin werden kurze Reaktionszeiten für die Kettenverlängerung und möglichst wenige Zyklen empfohlen (BELL u. DeMARINI 1991). Auch sollte die Anlagerungstemperatur der *Primer* möglichst hoch sein (LYONS 1992). Besonders kritisch für die Entstehung unspezifischer PCR-Produkte ist daher der Zeitpunkt zwischen Fertigstellung des PCR-Reaktionsansatzes und Start des PCR-Programmes, bei dem durch niedrige Temperaturen zur unspezifischen Anlagerung von *Primer* kommen kann. Durch den Einsatz von Heißstart („*hot start*“)-Techniken lässt sich dieses Problem umgehen und die Spezifität und Empfindlichkeit der PCR-Reaktion steigern. Ein wesentliches Kriterium dieser Methode ist, dass eine oder mehrere wichtige Reaktionskomponenten erst bei Temperaturen zugegeben oder aktiviert werden, bei denen nur wenige oder keine *Primer* unspezifisch an falsche DNA-Sequenzen

binden können (ROLFS et al. 1992; MÜLHARDT 1999). Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, ist z. B. der Einsatz von Wachskügelchen, die erst bei 55-65 °C für die PCR-Reaktion essentielle Reagenzien, wie Magnesiumchlorid oder die DNA-Polymerase; freisetzen (KAIJALAINEN et al. 1993). Eine weitere Möglichkeit stellen durch Bindung von Antikörpern bzw. Oligonukleotiden oder durch Konformationsänderungen modifizierte DNA-Polymerasen dar, die erst nach längerer Inkubation bei 95 °C aktiv werden (DANG u. JAYASENA 1996). Die Amplifikation startet durch diese Techniken erst bei Temperaturen, bei denen nur noch wenige oder keine *Primer* unspezifisch binden (NEWTON u. GRAHAM 1994).

Eine weitere Ursache für unspezifische Produkte stellen di- oder polymerisierte *Primer* dar, die durch partielle Basenkongruenz und daraus resultierender Hybridisierung mit anschließender Doppelstrangsynthese entstehen können (CHOU 1992).

#### **2.7.5.2 Falsch-positive Ergebnisse- Problem der Kontamination**

Auf Grund der hohen Sensitivität besteht bei der praktischen Durchführung der PCR die große Gefahr falsch-positiver Ergebnisse durch Kontaminationen (KWOK u. HIGUCHI 1989; HEINRICH 1991; PAUL et al. 1991; PERSING 1991). Bei der gleichzeitigen Aufarbeitung mehrerer Proben kann es vorkommen, dass spezifische Nukleinsäuren zwischen den Proben verschleppt werden (Kreuzkontamination). DNA aus vorangeegangenen PCR-Reaktionen kann in den PCR-Ansatz gelangen (Produktkontamination, "*Carry over*") (HEINRICH 1991; BELAK u. BALLAGI-PORDANY 1993b). Die verschleppte DNA wird durch die PCR vermehrt und führt so zu einem positiven Ergebnis, obwohl im ursprünglichen Ansatz keine DNA mit der gesuchten Sequenz enthalten war.

Als Kontaminationsquellen kommen in Frage:

- Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Pipetten können mit Nukleinsäure kontaminiert sein. Durch den Einsatz von Einwegmaterial und Benutzung von Pipettenspitzen mit aerosoldichten Filtern lässt sich diese Form der Kontamination vermeiden.



- Bedeutend schwieriger zu kontrollieren ist die Kontamination der Raumluft durch Aerosole, die beim Öffnen von amplifikathaltigen Reaktionsgefäßen entstehen. Dadurch können alle Oberflächen in einem Labor mit PCR-Produkten kontaminiert werden.
- Auch das Laborpersonal, Laborbekleidung und Geräte, wie Sterilbänke, Zentrifugen oder Wasserbäder, können Verursacher von Kontaminationen sein.

Daher müssen zur Vermeidung von Kontaminationen eine Reihe von Maßnahmen ergriffen werden:

In den Räumlichkeiten zur Durchführung der PCR sollten nach Möglichkeit getrennte Bereiche 1.) zur Vorbereitung und Gewinnung der Nukleinsäuren, 2.) zur Vorbereitung der Reagenzien (pre-PCR-Bereich), 3.) zur Zugabe der Nukleinsäure zum Amplifikationsansatz und für die PCR-Reaktion (PCR-Bereich) sowie 4.) zur Auswertung der PCR-Reaktion (post-PCR-Bereich) geschaffen werden (DIEFFENBACH 1993). Zwischen diesen Bereichen ist der Verkehr mit möglichen Kontaminationsquellen streng zu begrenzen. Weiterhin sollten während der Arbeit Handschuhe getragen und regelmäßig gewechselt werden. Gleiches gilt für die Laborkittel. Da auch Reagenzien kontaminiert sein können, ist es sinnvoll, diese zu portionieren (DRAGON 1993). Durch regelmäßiges Entfernen des nukleinsäurehaltigen Abfalls und regelmäßige Dekontamination der Raumluft und Oberflächen in Form von Bestrahlung mit UV-Licht, das DNA degradiert und kreuzvernetzt bzw. durch den Einsatz von DNA zerstörenden Reinigungsmitteln kann das Kontaminationsrisiko weiter minimiert werden (HEINRICH 1991; PRINCE u. ANDRUS 1992).

### ***2.7.5.3 Falsch-negative Ergebnisse***

Die Amplifikation eines gesuchten Genomabschnittes kann trotz dessen Vorhandenseins im Probenmaterial durch verschiedene Einflüsse misslingen. Eine Möglichkeit stellen fehlerhafte Basenpaarungen am 3'-Ende eines *Primers* dar, wodurch es zu keiner Verlängerung des komplementären Stranges anhand der Zielnukleinsäurematritze kommt. Weitere Ursachen können die genetische Variabilität zwischen verwandten Virusstämmen oder Isolaten sowie auch spontane Punktmutationen sein.

Weiterhin vermögen Substanzen, die im Probenmaterial enthalten sind oder zur Probenvorbereitung eingesetzt werden, die PCR bzw. RT-PCR zu hemmen (WILDE et al. 1990; ROLFS et al. 1992; ROSSEN et al. 1992). Diese Substanzen bezeichnet man auch als Inhibitoren. Bekannte Inhibitoren aus Probenmaterial sind z. B. Porphyrin, ein Bestandteil des Hämoglobins (HIGUCHI 1989), oder das zur Blutgerinnung eingesetzte Heparin (BEUTLER et al. 1990; HOLODNIY et al. 1991). Detergentien zur Nukleinsäure-Extraktion, wie Sodiumdodecylsulfat (SDS) (GELFAND 1989), sind ebenfalls kritisch. Auch Enzyme, wie Proteinase K, müssen vor Durchführung der PCR inaktiviert werden. Ebenso können Reste der bei der Extraktion eingesetzten organischen Lösungsmittel, wie Phenol oder Ethanol, die anschließende Nukleinsäureamplifikation behindern. Auch Kaliumchlorid, Harnstoff, Dimethylsulfoxid und Formamid können die PCR hemmen (ROLFS et al. 1992; ROSSEN et al. 1992).

Die zu amplifizierende RNA kann auch durch im Probenmaterial enthaltene oder von außen eingeschleppte RNasen noch vor der Reversen Transkription abgebaut werden, so dass kein Ausgangsmaterial mehr für die Amplifikation vorhanden ist.

Die bei der RT-PCR eingesetzten Reagenzien sind nicht sehr lange lagerbar, so dass es durch fehlerhafte Komponenten ebenfalls zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Schließlich sind auch Pipettierfehler beim Ansetzen der RT bzw. PCR eine weitere Quelle für falsch negative Ergebnisse.

### **2.7.6 Negative Kontrollen**

Um mögliche Kontaminationen erkennen zu können, müssen bereits mit Beginn der Probenvorbereitung negative Kontrollen (z. B. negatives Probenmaterial, Wasser, Ansätze ohne Probe, bei RNA RT-Ansätze ohne reverse Transkriptase) mit bearbeitet werden. Sollte eine Kontamination vorliegen, so sind diese negativen Kontrollen in der PCR positiv. Zur Absicherung der Ergebnisse müssen dann alle PCR-Reaktionen nach Beseitigung der Kontamination erneut durchgeführt werden (ROLFS et al. 1992).

### 2.7.7 Positive Kontrollen

Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse und zur Überprüfung der Effizienz und Sensitivität der Amplifikationsreaktion sollten positive Kontrollen bei der RT-PCR-Assay mit untersucht werden (ROLFS et al. 1992).

Als positive Kontrollen können unterschiedliche Ansätze eingesetzt werden. Eine einfache Möglichkeit ist, eine positive Probe in die Untersuchung einzuschließen, die zusammen mit den Untersuchungsmaterialien aufgearbeitet und in eine eigene RT-PCR eingesetzt werden kann. Weiterhin können in ein Plasmid klonierte spezifische Sequenzen zu den aus den Proben isolierten Nukleinsäuren zugegeben werden. Diese externen Kontrollen ermöglichen eine Überprüfung der Funktion der zur Probenvorbereitung und RT-PCR eingesetzten Reagenzien (*Primer*, Enzyme) (ROLFS et al. 1992). Als Nukleinsäuren mit der zu amplifizierenden Sequenz stellen sie jedoch eine mögliche Kontaminationsquelle dar (NERENBERG u. MINOR 1991). Außerdem können Fehler bei der Bearbeitung der individuellen Proben bzw. darin enthaltene RT-PCR-Inhibitoren falsch negative Ergebnisse verursachen, die durch diese Methode nicht detektiert werden. Eine korrekte RNA-Isolierung aus dem Probenmaterial, möglicher Abbau durch RNasen und die Funktion der Reversen Transkriptase lassen sich durch die Amplifikation von im Probenmaterial immer vorhandener mRNAs, die für sogenannte *Housekeeping-Gene*, wie  $\beta$ -Aktin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GADPH) (APASTOLAKOS et al. 1993; ZHAO et al. 1995) kodieren, überprüfen. Nachteil ist hierbei, dass die Methode nur für Gewebematerial und nicht für zellarme Substanzen, wie Serum oder Wasser, eingesetzt werden kann. Außerdem wird ein zweites Paar *Primer* benötigt, so dass hiermit auch keine falsch negativen Ergebnisse durch defekte spezifische *Primer* erkannt werden können.

Für den sicheren Ausschluss falsch negativer Ergebnisse kann eine interne Kontrolle eingesetzt werden (CONE et al. 1992). Diese soll möglichst schon bei der Probenaufarbeitung zugesetzt werden (DONNACHIE et al. 1989). Es handelt sich hierbei um ein System, das eine Nukleinsäure enthält, die sich von der Zielsequenz möglichst wenig unterscheidet. Es kann sich dabei z. B. um *in vitro*-transkribierte RNA handeln (BALLAGI-PORDANY u. BELAK 1996; ZERLAUTH 1996; BANGE u. VAHLENKAMP 1999). Die interne Kontrolle weist

analoge *Primer*-Bindungsstellen wie die Zielsequenz auf, besitzt aber z. B. eine andere Sequenz (BALLAGI-PORDANY u. BELAK 1996), eine Insertion (ZERLAUTH 1996) bzw. Deletion (ZERLAUTH 1996; BANGE u. VAHLENKAMP 1999) oder andere Restriktionsschnittstellen. Durch die Hybridisierung mit verschiedenen Sonden, die unterschiedlichen Größen nach elektrophoretischer Auftrennung oder unterschiedliche Schnittmuster nach Behandlung mit Restriktionsenzymen kann die Kontrolle vom Wildtyp abgegrenzt werden. Bei richtig negativen Ergebnissen liegt nur das RT-PCR-Produkt der Kontrolle vor, während bei falsch negativen Ergebnissen kein RT-PCR-Produkt gebildet wird.

### **2.7.8 Einsatz der RT-PCR zur Virus-Diagnostik**

Nach der Erstbeschreibung der PCR im Jahre 1985 wurden zahlreiche Einsatzgebiete für die PCR als Nukleinsäureamplifikationstechnik erschlossen (ERLICH et al. 1991; PERSING 1991). Zunehmend wurde die PCR bzw. RT-PCR sowohl in der Human- (WRIGHT u. WYNFORD-THOMAS 1990) als auch in der Veterinärmedizin (HAAS 1992; BELAK u. BALLAGI-PORDANY 1993a) zu diagnostischen Zwecken eingesetzt. Mittlerweile gibt es zahlreiche PCR-Protokolle zum Einsatz in der Diagnostik (BLUM 1994; VAN BELKUM u. NIESTERS 1995).

Die RT-PCR weist gegenüber klassischen Virusnachweisverfahren, wie zellkultureller Virusisolierung oder Immunfluoreszenz, Vorteile bezüglich Geschwindigkeit, Nachweisgrenze und Automatisierbarkeit auf (HOFMANN et al. 1995). Sie wird für einige wichtige humanpathogene RNA-Viren, wie HIV oder HCV, in der medizinischen Diagnostik und in der Blutprodukteindustrie bereits routinemäßig eingesetzt (NÜBLING et al. 1996; ZERLAUTH 1996).

Zum Nachweis von Viren mittels Nukleinsäureamplifikation wählt man spezifische Genomabschnitte aus. Die Sequenzen der Anlagerungsstellen für die *Primer* sollten dabei hochkonserviert sein, d.h. in der Nukleotidabfolge dürfen nur wenige und seltene Veränderungen zwischen den einzelnen Vertretern einer Erregerspezies auftreten, damit es stets zu einer Bindung der spezifischen *Primer* und damit zu einer Amplifikation des Genomfragmentes kommt. Geeignete Genomabschnitte müssen daher Informationen enthalten, die keinem großen Evolutionsdruck unterliegen. Für Viren kommen Bereiche aus

nicht kodierenden Genomregionen oder auch Gene für Nichtstrukturproteine in Frage (HAAS 1992). Bei den Flaviviren sind auch einige konservierte Abschnitte für Strukturproteine kodierender Nukleinsäuresequenzen geeignet.

### **2.7.9 RT-PCR zum Nachweis von Flaviviren**

Die Gattung Flavivirus enthält eine Reihe medizinisch bedeutsamer Erreger, wie die Verursacher von Dengue-Fieber, Gelbfieber, Japanischer Enzephalitis, St. Louis Enzephalitis, Murray Valley Enzephalitis und West Nile Enzephalitis (MONATH u. HEINZ 1996). Zum Nachweis dieser Erreger wurden verschiedene RT-PCR-Nachweise entwickelt (ELDADAH et al. 1991; TANAKA 1993; CHANG et al. 1994; DEUBEL et al. 1997). Es handelt sich dabei sowohl um gattungs- als auch speziesspezifische RT-PCRs, wobei mit einem *Primer*-Paar der Test auf Flavivirus-RNA durchgeführt wird und anschließend mit virusspezifischen *Primern* in einer zweiten PCR der Virustyp ermittelt werden kann. CHOW et al. (1993) konnten mittels RT-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese Nachweisgrenzen von 0,01 pg eingesetzter Denguevirus-RNA erreichen, was  $10^3$  Genomäquivalenten entspricht. Bei Einsatz von Gelbfieber-RNA wurden gelelektrophoretisch Nachweisgrenzen von 2,8  $\log_{10}$  PFU Äquivalenten an Gelbfieberspezifischer RNA pro RT-PCR-Reaktion erreicht (CHANG et al. 1994). Neben dem Nachweis aus der Zellkultur und Patientenserum sind für verschiedene Flaviviren wie Dengue (ROSEN et al. 1999), Gelbfieber (DEUBEL et al. 1997; HERAUD et al. 1999) erfolgreiche Virusgenomnachweise aus Organmaterialien mittels RT-PCR beschrieben.

### **2.7.10 RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren**

Für den Nachweis von Pestiviren mittels Reverser Transkription und anschließender Polymerasekettenreaktion wurden eine Reihe von RT-PCRs publiziert. Diese sind wiederum entweder für die Gattung Pestivirus spezifisch, können also gleichzeitig Vertreter der BVD/MD, der KSP und der Border Disease detektieren (GREISER-WILKE et al. 1993; WIRZ et al. 1993; HOFMANN et al. 1994; STADEJEK et al. 1995). Andere PCRs sind in Abhängigkeit von den verwendeten *Primern* spezifisch für den jeweiligen Virustyp BVDV (HERTIG et al. 1991; HOOFT VAN IDDEKINGE et al. 1992), KSPV (SHIH-TUNG et al.

1991; ZABEREZHNY et al. 1999) oder BDV. Bei BVDV kann in einigen Fällen mittels RT-PCR auch eine Unterscheidung des Biotyps (GREISER-WILKE et al. 1993) oder des jeweiligen Genotyps (BVDV I; BVDV II) (RIDPATH et al. 1998) vorgenommen werden.

Für den Nachweis von Pestiviren entwickelte RT-PCRs sind um den Faktor 5 bis 50 empfindlicher als der Virusnachweis mittels zellkultureller Virusisolierung und anschließender Immunperoxidasefärbung (nested RT-PCR, SANDVIK et al. 1997b; einfache RT-PCR VYDELINGUM et al. 1998). CANAL et al. (1996) erreichten mit einer einfachen RT-PCR für KSPV Nachweisgrenzen bis zu 100 KID<sub>50</sub>/ml und für BVDV bis zu einer KID<sub>50</sub>/ml. Als weitere erreichte Nachweisgrenzen sind 0,6 KID<sub>50</sub>/100 mg KSPV haltigem Gewebe und 0,1 KID<sub>50</sub>/ml Virus haltigem Zellkulturüberstand beschrieben (VYDELINGUM et al. 1998). GILBERT et al. (1999) erreichten mit einer nested RT-PCR zum Nachweis des BVDV-Genoms eine Nachweisgrenze von 3 KID<sub>50</sub>/ml mit Blut als Probenmaterial.

Bei Einsatz von 25 ml Milch eines persistent mit BVDV infizierten Tieres mit einem Titer von 10<sup>5,5</sup> KID<sub>50</sub>/ml verdünnt in BVDV negativer Milch konnte bis zu einer Verdünnung von 1:640 ein positives Signal in der RT-PCR erhalten werden. (RADWAN et al. 1995). Bei Einsatz realer Tankmilchproben lag das empfindlichste Ergebnis bei der Detektion eines persistent infizierten Tieres bezogen auf eine Gesamttierzahl von 162 (DREW et al. 1999). Aus Bullensperma mit Virustitern von 4x10<sup>4</sup> bis 4 KID<sub>50</sub>/ml gelang es Da SILVA et al. (1995) das BVDV-Genom mittels RT-PCR nachzuweisen. Für den KSPV-Nachweis sind RT-PCR-Nachweise aus Milz, Mandeln, Lymphknoten oder Niere (WIRZ et al. 1993; HARDING et al. 1996; VIDELYGUM et al. 1999) sowie der Lunge (WIRZ et al. 1993) publiziert. Das BVDV-Genom wurde ebenfalls erfolgreich mittels der RT-PCR aus verschiedenen Geweben nachgewiesen (ALANSARI et al. 1993; GRUBER et al. 1993; SCHMITT et al. 1994; HAMEL et al. 1995; URUNO et al. 1998). Die Nachweisgrenze lag bei 10 KID<sub>50</sub>/ml Probenmaterial (URUNO et al. 1998).

## **2.8 Vorbereitung von RNA für den Einsatz in der RT-PCR**

Die für den Nachweis des Virusgenoms mittels RT-PCR benötigte virale RNA liegt nur in den seltensten Fällen frei zugänglich vor. In der Regel ist sie von Zellen, die das Virus beinhalten, der Virushülle selbst oder interkalierenden Proteinen (Nukleokapsidproteinen) umgeben. Für

eine erfolgreiche Amplifikation muss die RNA daher zunächst den in der RT-PCR eingesetzten Enzymen und Reagenzien zugänglich gemacht werden.

Nach der Freisetzung der RNA ist diese viel anfälliger gegenüber äußeren Einflüssen und kann schneller abgebaut werden. Dies gilt insbesondere bei höheren Temperaturen ( $>65\text{ °C}$ ) und für basische pH-Werte, da RNA sehr empfindlich gegenüber dem Abbau durch alkalische Hydrolyse ist. Die größte Gefahr stellen Ribonukleinsäure abbauende Enzyme (RNasen) dar. Diese RNasen kommen ubiquitär vor, sind sehr stabil sind und benötigen in der Regel keine Kofaktoren (SELA et al. 1957; BLACKBURN u. MOORE 1982). Damit die RNA nicht während oder nach der Probenaufarbeitung zerstört wird, müssen daher Maßnahmen zum Schutz vor Abbau getroffen werden.

Ein weiteres Problem stellen die als Inhibitoren bezeichneten Substanzen dar, die die Polymerasekettenreaktion bzw. die Reverse Transkription stören können (WILDE et al. 1990; ROLFS et al. 1992; ROSSEN et al. 1992). Während der Nukleinsäurevorbereitung müssen alle Inhibitoren soweit entfernt werden, dass die Konzentration an Hemmsubstanzen in der RNA-Präparation die sich anschließende Umschreibung in cDNA und die Amplifikationsreaktion nicht behindert.

Die Probenvorbereitung dient demnach der Freisetzung der Nukleinsäure, dem Schutz der freigesetzten Nukleinsäure vor Abbau und der Beseitigung unerwünschter Substanzen.

### **2.8.1 Freisetzung der Nukleinsäuren**

Die Nukleinsäuren werden beim Probenaufschluss durch Zerstörung der Strukturen, die die Nukleinsäuren umgeben (Proteine, Lipidhüllen u.s.w.) freigesetzt. Dazu kommen verschiedene physikalische und chemische Verfahren zum Einsatz (**Tabelle 1**). Zellen und Bakterien können z. B. mit dem FP 120 Fast Prep Cell Disrupter von BIO 101 mechanisch aufgeschlossen werden (BEJ et al. 1996). Eine weitere Methode besteht in Wärmebehandlung durch Kochen (SHI u. LIU 1992; WIRZ et al. 1993; SCHWAB et al. 1996) oder Mikrowellenbehandlung (CHEYROU et al. 1991). So beschreiben WIRZ et al. (1993) den Einsatz von Pestivirus haltigen Zellkultur- bzw. Organhomogenisatüberständen in der RT-PCR nach 5 minütigem Erhitzen des Probenmaterials auf  $90\text{ °C}$ . Der Einsatz proteolytischer

Enzyme, wie z. B. Proteinase K, ermöglicht ebenfalls die Probenvorbereitung für den Einsatz in der RT-PCR (JACKSON et al 1990; HAYASHI et al. 1994). Bei den meisten Methoden zur RNA-Isolierung werden die die RNA umgebenden Strukturen durch ionische oder nichtionische Detergentien (SDS, Tween) (SAMBROOK et al. 1989; ROSSEN et al. 1992; VODKIN et al. 1994; ZHONG et al. 1994), chaotrope Substanzen, wie Guanidinisothiozyanat (CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1987; BOOM et al. 1990), Guanidinhydrochlorid (COX 1968; CHIRGWIN et al. 1979), Natriumjodid (LEMA et al. 1994) oder Natriumperchlorat (REZAIAN u. KRAKE 1987) sowie organische Lösungsmittel, wie Phenol oder Chloroform (CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1987) zerstört, um die RNA freizusetzen. Die genannten Reagenzien werden oft auch kombiniert verwendet (FRAZIER et al. 1983).

**Tabelle 1:** Übersicht über Methoden zur Zerstörung der die RNA umgebenden Strukturen, um diese aus dem Probenmaterial freizusetzen.

<b>physikalische Methoden</b>	<b>chemische Methoden</b>
mechanische Behandlung	Detergentieneinsatz
Wärmebehandlung	Einsatz chaotroper Reagenzien
Mikrowellenbehandlung	Einsatz organischer Lösungsmittel
	Einsatz proteolytischer Enzyme

### 2.8.2 Schutz der freigesetzten RNA

Der Schutz der RNA besteht vor allem in der Inaktivierung von RNAsen durch Zusatz hemmender Substanzen, sogenannter RNase-Inhibitoren. Es gibt spezifische und unspezifische RNase-Inhibitoren. Spezifische Inhibitoren sind z. B. Vanadyl Ribonukleosid Komplexe (VDR) (BERGER u. BIRKENMIER 1979; NICOLAIDES u. STOECKERT 1990) oder ein Protein, das aus der humanen Plazenta isoliert bzw. rekombinant hergestellt wird. Beispiele für Handelsnamen dieses Proteins sind RNaseinhibitor (Gibco), RNasin (Promega) oder RNAGuard (PharmaciaAmershamBiotech). Die Aktivität dieses Proteins ist im hohen Maße von der Dithiothreitol (DTT)-Konzentration abhängig (BLACKBURN et al. 1977, BLACKBURN 1979). VDR besteht aus dem Oxovanadiumion und den vier Ribonukleosiden



und inhibiert auch enzymatische Reaktionen wie die Reverse Transkription. Demgegenüber sind Substanzen wie RNaseinhibitor zu vielen *in vitro*-Reaktionen kompatibel und werden daher auch zum Schutz der RNA bei der Reversen Transkription zugesetzt (SCHEIDER et al. 1988).

Viele Nukleasen werden auch sehr effektiv durch die zum Probenaufschluss und die anschließende Reinigung eingesetzten chaotropen Substanzen, organischen Lösungsmittel und proteolytischen Enzyme gehemmt. Dabei werden sämtliche Enzymaktivitäten unspezifisch inaktiviert.

Der Einsatz Nuklease freier Materialien und Reagenzien sowie sauberes Arbeiten (Handschuhe, gestopfte Pipettenspitzen) bei möglichst niedrigen Temperaturen (Eisbad) sind ein weiterer Schutz für die RNA vor dem Abbau durch RNasen.

### **2.8.3 Beseitigung unerwünschter Substanzen**

Für eine erfolgreiche RT-PCR müssen nicht zwingend reine Nukleinsäurepräparationen vorliegen (WIRZ et al. 1993). Nur Substanzen, die das Ergebnis der RT-PCR-Reaktion stören könnten, müssen gänzlich entfernt, inaktiviert oder auf eine tolerierbares Maß ausverdünnt werden.

So kann das Probenmaterial mit Wasser verdünnt ohne weitere Aufarbeitungsschritte direkt in die RT-PCR eingesetzt werden, da hier die Konzentration der Inhibitoren auf ein nicht wirksames Maß gesenkt wird (LANTZ et al. 1994). Verdünnungen des Probenmaterials führen jedoch auch zu einer deutlichen Verringerung der Empfindlichkeit der RT-PCR. Daher werden für die Vorbereitung der Nukleinsäuren vor der PCR bevorzugt Verfahren zur Inaktivierung oder Beseitigung störender Substanzen eingesetzt.

Bei den Methoden zur Inaktivierung störender Substanzen wird das Probenmaterial zusammen mit dem inaktivierenden Mittel direkt oder nach Wärmebehandlung in die PCR eingesetzt. Bei den inaktivierenden Mitteln handelt es sich um Substanzen, die selektiv störende Stoffe, wie z. B. Salze oder Proteine, binden. Es handelt sich dabei um Ionenaustauscher, Fließpapiere oder spezifische Bindeharze.

Diese Substanzen sind unter unterschiedlichsten Bezeichnungen wie Instagene (BioRad), Genereleaser (Eurogentec) oder Maximator: PCR Enhancer System (Connex) im Handel erhältlich.

Störende Substanzen wie Proteine oder genomische DNA können auch durch den Abbau über spezifische Enzyme, wie Proteinase K oder DNase, entfernt werden.

Die überwiegende Zahl der für die RNA-Vorbereitung eingesetzten Verfahren entfernt die Inhibitoren, indem die Nukleinsäuren isoliert werden. Dies geschieht über Verfahren zur selektiven Anreicherung, Fällung oder Bindung der Nukleinsäuren (**Tabelle 2**), verbunden mit Waschschritten und anschließender Rückgewinnung der gereinigten Nukleinsäure in wässriger Lösung durch Elution oder Rehydrierung.

Weit verbreitete Verfahren nutzen hierfür die **selektive Bindung von Nukleinsäuren an Siliziumverbindungen** (VOGELSTEIN u. GILLESPIE 1979; BOOM et al. 1990), wie Glasflies, Glasmilch oder anderes mineralisches Trägermaterial, in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen und organischer Lösungsmittel. Die Glasmaterialien können ungebunden als Glasmilch (BOOM et al. 1990), als magnetische Partikel (*magnetic beads*) (MUIR et al. 1993; BEAULIEUX et al. 1997) oder als Glasflies, in Zentrifugensäulchen integriert (AYSTA u. COLPAN 1992; COLPAN 1992), eingesetzt werden. Das Waschen der an die Siliziumverbindung gebundenen Nukleinsäuren erfolgt durch geeignete Waschpuffer mit hoher Salzkonzentration. Nach dem Waschen werden mittels eines wässrigen Elutionspuffers mit niedrigem Salzgehalt, im einfachsten Falle reinem Wasser, die Nukleinsäuren vom Silica-Trägermaterial eluiert.

Das Prinzip der selektiven Bindung wird ebenfalls beim Einsatz von **Anionenaustauschern** genutzt. Durch die Kombination von Wasch- und Elutionsschritten werden die gereinigten Nukleinsäuren gewonnen (SEBESTIAN u. SIEBER 1991; COLPAN u. SCHORR 1995).

Weitere Verfahren beruhen auf der selektiven Fällung bzw. Anreicherung von Probenbestandteilen. Durch Zentrifugation und Abtrennung des Überstandes wird die Nukleinsäure von den unerwünschten Probenbestandteilen abgetrennt und kann dann noch weiteren Waschschritten unterworfen werden:

Bei der **Phenol-Chloroform-Extraktion** werden die Proteine durch Phenol und Chloroform ausgefällt und mit den Fetten in der organischen Phase angereichert, während die Nukleinsäuren nach Zentrifugation in der wässrigen Phase verbleiben (CHOMCZYNSKI u.

SACCHI 1987). Das Chloroform kann durch Bromochlorpropan ersetzt werden (CHOMCZYNSKI u. MACKEY 1995). Die Eiweiße und andere Probenbestandteile können auch durch **Salzpräzipitation** mit Kochsalz (Purescript) (NICOLAIDES u. STOECKERT 1990; LAHIRI et al. 1992) oder Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (DO u. ADAMS 1991) selektiv gefällt und nach anschließender Zentrifugation aus der Probe entfernt werden. Die Nukleinsäuren lassen sich mittels Isopropanol (CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1987) oder Ethanol (WALLACE 1987) bei einer bestimmten Salzkonzentration aus den Lösungen präzipitieren und können dann mittels ethanolhaltiger Waschlösung gewaschen werden. Bei einer Fällung mit organischen Lösungsmitteln wie Isopropanol oder Ethanol werden auch Polysaccharide mitgefällt, die, wie z. B. Heparin, die anschließende RT-PCR stören können. Durch Einsatz von Lithiumchlorid (MANNING 1991) oder CTAB (DO u. ADAMS 1991) kann eine selektive Fällung der RNA bzw. Polysaccharide erreicht und somit die RNA von den Polysacchariden abgetrennt werden. Bei geringen RNA-Konzentrationen kann die Fällung ineffektiv sein. Es werden dann spezielle Substanzen, sogenannte Carrier, wie Hefe-RNA, zelluläre RNA, synthetische Polynukleotide oder Muschelglykogen, als Präzipitationshilfen zugesetzt (JACKSON et al. 1991; WINSLOW u. HENKART 1991).

Nach Trocknung der gewaschenen und sedimentierten RNA wird diese in Puffer oder Wasser wieder in Lösung gebracht und steht dann für den Einsatz in der RT-PCR zur Verfügung.

**Tabelle 2** Übersicht über die wichtigsten Prinzipien zur Trennung der RNA von anderen Probenbestandteilen

<b>Methode</b>	<b>Referenzen</b>
Bindung an Siliziumverbindungen	VOGELSTEIN u. GILLESPIE 1979; BOOM et al. 1990; COLPAN 1992
Anionenaustauscher	SEBESTIAN u. SIEBER 1991; COLPAN u. SCHORR 1995
Phenol-Chloroform-Extraktion	CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1987
Salzpräzipitation	NICOLAIDES u. STOECKERT 1990; LAHIRI et al. 1992

### **3 Material und Methoden**

Rezepturen für Medien, Puffer, Lösungen sowie sonstige Chemikalien und genutzte Geräte bzw. Gebrauchsgegenstände werden mit Angabe des Herstellers im Anhang aufgeführt.

#### **3.1 Modellpathogene**

Der BVDV-Stamm NADL (GUTEKUNST u. MALMQUIST 1963) und der KSPV-Stamm Alfort/187 (DAHLE u. LIESS 1995) stammten aus der Sammlung des Instituts für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover bzw. aus dem EU-Referenzlabor für Klassische Schweinepest, Hannover. Der Gelbfieberimpfstamm 17D (THEILER u. SMITH 1937) wurde von Dr. H.-J. Marschall, Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien - ABC Schutz, Munster, bezogen.

##### **3.1.1 Vermehrung und Titration des BVDV-Stammes NADL**

Die Vermehrung des BVD-Virusstammes NADL erfolgte auf fetalen Kälbernierenzellen, der primären Zellkulturlinie FKN-412, 4. Passage, die am Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule hergestellt worden war. Dazu wurde aus einer 50 ml Gewebekulturflasche mit konfluentem FKN-412-Zellrasen das Nährmedium durch sorgfältiges Abgießen entfernt, der Zellrasen mit 10 ml Versen-Trypsin-Lösung gewaschen und bis zur Ablösung der Zellen bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 6 ml Nährmedium, das zu gleichen Teilen aus EMEM und ELA bestand, wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und auf drei neue 50 ml Gewebekulturflaschen mit je 10 ml Nährmedium verteilt. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C im CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank waren die Kulturen nahezu konfluent. Das Nährmedium wurde sorgfältig abgesaugt, und der Zellrasen wurde mit serumfreiem Nährmedium und danach mit PBS gewaschen. Jede Kultur wurde mit einem ml eines NADL-Virusstocks aus dem Institut für Virologie der Tierärztliche Hochschule Hannover, der einen Titer von 10<sup>6</sup> KID<sub>50</sub>/ml aufwies, inokuliert. Die Adsorptionszeit betrug 2 h bei 37 °C, wobei

die Kulturen alle 15 min zur besseren Verteilung des Virus auf dem Zellrasen geschwenkt wurden. Danach wurden je Kultur 25 ml Nährmedium mit einem Zusatz von 5 % Rinderserum dazugegeben. Mit Einsetzen des zytopathischen Effekts ca. 48 h nach Infektion wurde die Kultur entweder zur RNA-Isolierung eingesetzt, oder das Virus wurde zur Herstellung einer Stammlösung geerntet und titriert. Für die Virusernte wurde der Zellkulturüberstand in ein steriles 50 ml- Glaszentrifugenröhrchen überführt. Der in der Kulturflasche verbliebene Zellrasen wurde zum Freisetzen zellgebundener Viruspartikel einem Gefrier-Tau-Zyklus unterzogen, indem er 30 min bei -80 °C eingefroren wurde. Das getaute Medium-Zellgemisch wurde zu dem bereits vorher abgenommenen virushaltigen Zellkulturüberstand in das Zentrifugenglas gegeben und 20 min bei 300 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Portionen zu 1 ml in sterile Glasröhrchen mit Schraubdeckel verteilt und bei -80 °C eingefroren. Der Virustiter wurde nach Auftauen einer der Portionen in der Mikrotiter-Zellkulturmethode durch Immunfärbung bestimmt (HOLM-JENSEN, 1981; HYERA et al., 1987) und nach KAERBER (1931) berechnet.

### **3.1.2 Vermehrung und Titration des KSPV-Stammes Alfort/187**

Der KSPV-Stamm Alfort 187 wurde im EU-Referenzlabor für Klassische Schweinepest auf Zellen einer im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule klonierten, permanenten Schweinenierenzelllinie PK (15) vermehrt und titriert. Titrierter Alfort 187 haltiger Zellkulturüberstand wurde vom EU-Referenzlabor für Klassische Schweinepest in das Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule überführt und dort bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **3.1.3 Vermehrung und Titration des Gelbfiebervirusstammes 17D**

Die Vermehrung des Gelbfiebervirusimpfstammes 17D erfolgte auf primären Hühnerembryofibroblastenzellen. Diese wurden aus 9-10 Tage bebrüteten SPF-Eiern wie folgt gewonnen:

Die Eier wurden mit Ethanol abgewischt, an der Luftkammerseite aufgeklopft und mit einer sterilen Schere eröffnet. Mit einer sterilen Pinzette wurde vorsichtig die Schalenhaut abgenommen. Der Embryo wurde mit einer Pinzette am Hals erfasst, aus der Eischale herausgezogen und in eine sterile Petrischale überführt. In der Petrischale wurden zügig Kopf, Flügel und Ständer abgetrennt sowie Leber, Magen, Darm und Herz entfernt. Der Rest der Gewebe wurde in einen 50 ml-Erlenmeyerkolben überführt und dort mittels Schere zerkleinert. Mit etwa 20 ml PBS und Magnetrührstab wurde das Gewebehomogenisat 5 min lang gerührt und der Erlenmeyerkolben schräggestellt. Nach Absinken der groben Bestandteile wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Zur Gewinnung von Einzelzellen wurden das Gewebehomogenisat mit 20 ml 0,4 % Versen-Trypsin-Lösung versetzt und 5-10 min lang auf dem Magnetrührer gequirrt. Danach wurde der Erlenmeyerkolben wieder schräggestellt und abgewartet, bis sich die groben Gewebeteile absetzt hatten. Der Überstand wurde vorsichtig durch eine vierlagige sterile Gaze in einen vorbereiteten gekühlten 500 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml fetalem Kälberserum gefiltert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis kaum noch grobe Bestandteile sichtbar waren. Der Kolben mit den Zellen wurde während der Aufarbeitung bei 4 °C gekühlt. Die fertige Zellsuspension wurde in 50 ml Glaszentrifugenröhrchen überführt und die Zellen bei 450 x g 10 min lang bei 10 °C abzentrifugiert, in Nährmedium, das aus EMEM mit einem 5 % Zusatz von fetalem Kälberserum bestand, resuspendiert und auf 250 ml Gewebekulturflaschen verteilt. Nach 2-4 tätiger Bebrütung bei 37 °C hatte sich ein dichter Zellrasen gebildet.

Die konfluenten Gewebekulturflaschen wurden randvoll mit Nährmedium gefüllt und zum Wehrwissenschaftlichen Institut für Schutztechnologien, Munster/Örtze, überführt, wo die Zellen eingefroren bzw. zur Vermehrung des Gelbfieberimpfstammes 17D verwendet wurden.

Bei Herrn Dr. H.-J. Marschall im Wehrwissenschaftlichen Institut für Schutztechnologien erfolgte die Vermehrung und Titration des Gelbfiebervirusimpfstammes 17D. 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstand wurde an das Institut für Virologie zurückverbracht und dort bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 3.2 Probenmaterialien

### 3.2.1 BVDV haltiges Probenmaterial

BVDV haltiges Probenmaterial wurde freundlicherweise durch die Diagnostikabteilung des Institutes für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurde von Herrn Dr. K. Eicken, Ovelgönne, Blut, Vollmilch und Lebergewebe von persistent mit BVDV infizierten Tieren gewonnen und an das Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover geschickt. In **Tabelle 3** findet sich eine Aufstellung mit der Angabe von Menge, Herkunft, Temperatur bei der Lagerung und Verwendungszweck.

**Tabelle 3:** Übersicht über Menge, Herkunft, Lagerung und Verwendung BVDV haltigen Probenmaterials

<b><i>BVDV-Proben-Nr.</i></b>	<b><i>Probenmaterial</i></b>	<b><i>Herkunft</i></b>	<b><i>Lagerung</i></b>	<b><i>Verwendung</i></b>
<b>1</b>	mit EDTA gerinnungsgehemmtes Rindervollblut ca. 5 ml	Diagnostikabteilung des Instituts für Virologie, Probeneingangs-Nr. 2327/1998	4 °C	Erprobung der Trizol-Standard-Methode
<b>2</b>	mit Lithiumheparinat gerinnungsgehemmtes Rindervollblut ca. 5 ml	Diagnostikabteilung des Instituts für Virologie, Probeneingangs-Nr. 2331/1998	4 °C	Erprobung der Trizol-Standard-Methode
<b>3</b>	mit EDTA gerinnungsgehemmtes Rindervollblut ca. 40 ml	Dr. K. Eicken, persistent mit BVDV-infiziertes Tier	4 °C	Vergleich der RNA-Isolierungs-methoden
<b>4</b>	mit Lithiumheparinat gerinnungsgehemmtes Rindervollblut ca. 40 ml	Dr. K. Eicken, persistent mit BVDV-infiziertes Tier	4 °C	Vergleich der RNA-Isolierungs-methoden
<b>5</b>	Vollmilch ca. 8 ml	Diagnostikabteilung des Instituts für Virologie, Probeneingangs-Nr. 4137/1999	-20 °C	Erprobung der Trizol-Standard-Methode

<i><b>BVDV- Proben- Nr.</b></i>	<i><b>Probenmaterial</b></i>	<i><b>Herkunft</b></i>	<i><b>Lager- ung</b></i>	<i><b>Verwendung</b></i>
<b>6</b>	Vollmilch ca. 20 ml	Dr. K. Eicken, persistent mit BVDV- infiziertes Tier	-20 °C	Vergleich der RNA- Isolierungs-methoden
<b>7</b>	Vollmilch konserviert mit Natriumazid ca. 20 ml	Dr. K. Eicken, persistent mit BVDV- infiziertes Tier	-20 °C	Vergleich der RNA- Isolierungs-methoden
<b>8</b>	Lebergewebe ca. 30 cm <sup>3</sup>	Dr. K. Eicken, persistent mit BVDV- infiziertes Tier	7 °C	Vergleich der RNA- Isolierungs-methoden
<b>9</b>	fetales Kälberserum ca 250 µl	Diagnostikabteilung des Instituts für Virologie, Probe 580/1	-20 °C	Erprobung der Trizol- Standard-Methode
<b>10</b>	fetales Kälberserum ca. 250 µl	Diagnostikabteilung des Instituts für Virologie, Probe 580/2	-20 °C	Erprobung der Trizol- Standard-Methode

### 3.2.2 KSPV haltiges Probenmaterial

KSPV haltiges Probenmaterial ist freundlicherweise vom EU-Referenzlabor für Klassische Schweinepest bereitgestellt worden. Es handelte sich dabei um Blut und Organproben, die in der Diagnostik positiv waren. In **Tabelle 4** ist das KSPV haltige Probenmaterial mit der Angabe von Menge, Herkunft, Temperatur bei der Lagerung und Verwendungszweck aufgeführt.

**Tabelle 4:** Übersicht über Menge, Herkunft, Lagerung und Verwendung KSPV haltigen Probenmaterials

<i><b>KSPV- Proben- Nr.</b></i>	<i><b>Probenmaterial</b></i>	<i><b>Herkunft</b></i>	<i><b>Lager- ung</b></i>	<i><b>Verwendung</b></i>
<b>1</b>	mit EDTA gerinnungsgehemmtes Schweineblut	EU-Referenzlabors für Klassische Schweinepest, Tier 7, Versuch V98/1	4 °C	Erprobung der Trizol- Standard-Methode
<b>2</b>	Milz ca. 10 cm <sup>3</sup>	EU-Referenzlabors für Klassische Schweinepest, Tier 3, Versuch V98/1	-20 °C	Erprobung der Trizol- Standard-Methode u. Gewebehomo- genisierung



<i><b>KSPV- Proben- Nr.</b></i>	<i><b>Probenmaterial</b></i>	<i><b>Herkunft</b></i>	<i><b>Lager- ung</b></i>	<i><b>Verwendung</b></i>
<b>3</b>	Hodengewebe ca. 10 cm <sup>3</sup>	EU-Referenzlabors für Klassische Schweinepest, Tier 3, Versuch V98/1	-20 °C	Erprobung der Trizol-Standard-Methode u. Gewebehomogenisierung
<b>4</b>	Lymphknoten ca. 10 cm <sup>3</sup>	EU-Referenzlabors für Klassische Schweinepest, Probe vom 17.03.1998, CSF 484	-80 °C	Erprobung der Trizol-Standard-Methode u. Gewebehomogenisierung
<b>5</b>	Tonsille ca. 10 cm <sup>3</sup>	EU-Referenzlabors für Klassische Schweinepest, Probe vom 17.03.1998, CSF 484	-80 °C	Erprobung der Trizol-Standard-Methode u. Gewebehomogenisierung

### **3.2.3 17D-Virus haltiges Probenmaterial**

Probenmaterial, das den Gelbfieberevirusstamm 17D enthielt, stand nicht zur Verfügung.

Daher wurden die Materialien künstlich mit definierten Virusmengen kontaminiert.

### **3.2.4 Negatives Probenmaterial**

Probenmaterial, das keines der jeweils mit dem Probenmaterial verwendeten Modellpathogene enthielt, wurde als negative Kontrollen, zur Verdünnung positiver Proben und zur Herstellung künstlich kontaminierter Proben eingesetzt. In **Tabelle 5** sind das Probenmaterial mit Herkunft, Lagerungstemperatur und Verwendung aufgeführt.

In **Tabelle 6** sind die in den Autoklaven des Institutes für Pathologie eingebrachten Tierarten sowie Desinfektionsmittel aufgeführt. Das Material wurde 20 min bei 125 °C und 1,5 -1,8 bar autoklaviert und anschließend gefiltert. Mit autoklaviertem Abwasser ist das Filtrat bezeichnet, das für die Versuche verwendet worden ist.

**Tabelle 5:** Übersicht über Menge, Herkunft, Lagerung und Verwendung Modellpathogen freien Probenmaterials

<i>Probenmaterial</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Lagerung</i>	<i>Verwendung</i>
mit EDTA gerinnungsgehemmtes Rindervollblut ca. 80 ml	Institut für Reproduktionsmedizin	4 °C	negative Kontrolle; künstliche Kontamination mit 17D; Verdünnung BVDV haltigen Blutes
mit Lithiumheparinat gerinnungsgehemmtes Rindervollblut ca. 80 ml	Institut für Reproduktionsmedizin	4 °C	negative Kontrolle; künstliche Kontamination mit 17D-Virus; Verdünnung BVDV haltigen Blutes
Eberejakulat, spermienreiche Fraktion ca. 30 ml	Institut für Reproduktionsmedizin	4 °C	Gewinnung von Seminalplasma; künstliche Kontamination mit Alfort 187
Vollmilch 1 l	im Handel gekauft, Hansano frische Landmilch, mindestens 3,7 % Fettgehalt, pasteurisiert und homogenisiert, Hansano Milchhof e.G., 30916 Isernhagen	4 °C bzw. -20 °C	negative Kontrolle; Verdünnung BVDV haltiger Milch
Lebergewebe ca. 60 cm <sup>3</sup>	im Handel gekauft, Rindsleber	7 °C	negative Kontrolle; Verdünnung BVDV haltiger Leberhomogenisate
autoklaviertes Abwasser 2 l	Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover	4 °C	negative Kontrolle; künstliche Kontamination mit 17D-Virus

**Tabelle 6:** Übersicht über im Autoklavieransatz enthaltene Tierkörper und Desinfektionsmittel

<i>Tierkörper</i>	<i>Desinfektionsmittel</i>
Chamäleon	Calgonit-Sterizid, Tischdesinfektionsmittel
Elefant	Desmanol, Händedesinfektionsmittel
Ente	NFADA, Instrumentendesinfektionsmittel
Hunde	Orbivet, Stiefeldesinfektionsmittel
Kaninchen	Tegodor 73, 2 %
Katzen	
Leguan	
Pferd	
Rentier	
Rinder	
Schaf	
Schwein	
Springbock	
Tigerpython	
Ziege	

### **3.3 Vorbereitung der Proben für die RNA-Isolierung**

#### **3.3.1 Zellkulturüberstand**

Für die RNA-Isolierung wurden  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihen 17D-Virus, NADL und Alfort 187 haltiger Zellkulturüberstände mit EMEM in 10 ml Reagenzgläsern hergestellt:

Um von 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand mit einem Titer von  $4 \times 10^5$  KID<sub>50</sub>/ml auf eine ganze  $\log_{10}$ -Stufe zu kommen, wurden einmal 3000  $\mu$ l EMEM vorgelegt und 1000  $\mu$ l 17D Virus haltiger Zellkulturüberstand dazugegeben und auf einem Schüttler gut gemischt.

Für die weiteren Verdünnungen wurden pro Verdünnungsstufe 5400  $\mu$ l EMEM vorgelegt und jeweils 600  $\mu$ l aus der vorherigen Verdünnungsstufe zugefügt und auf einem Schüttler gut gemischt.

Ausgehend von den Ausgangstitern der verwendeten Virus haltigen Zellkulturüberstände wurden so Verdünnungsreihen bis zu kalkulierten Titern von  $10^{-2}$  KID<sub>50</sub>/ml hergestellt.

Für den Vergleich von RNA-Isolierungsmethoden mit 17D-Virus haltigen Zellkulturüberständen wurden aus der Verdünnung mit einem kalkulierten Titer von einer KID<sub>50</sub>/ml noch Verdünnungen von 0,5 KID<sub>50</sub>/ml und 0,25 KID<sub>50</sub>/ml hergestellt, indem

zweimal 3000 µl EMEM vorgelegt und mit jeweils 3000 µl aus der vorherigen Verdünnungstufe gemischt worden sind.

Die Verdünnungsreihen wurden entweder direkt für die RNA-Isolierung eingesetzt oder in Portionen von 1 ml bei NADL und Alfort 187 in 1,6 ml Mikroreaktionsgefäße bzw. in Portionen von 130 µl in 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße abgefüllt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### **3.3.2 Fetales Kälberserum**

Für die Erprobung der Trizol-Standard-Methode wurden BVDV positive Proben fetalen Kälberserums (BVDV-Proben-Nr. 9 und 10) unmittelbar nach dem Auftauen in einem Eisbad zur RNA-Isolierung eingesetzt.

### **3.3.3 Vollblut**

Zur Erprobung der Trizol-Standard-Methode wurden Vollblutproben, die BVDV (BVDV-Proben-Nr. 1 und 2) und KSPV (KSPV-Proben-NR. 1) enthielten und mit EDTA (BVDV-Proben-Nr. 1; KSPV-Proben-NR. 1) bzw. Lithiumheparinat (BVDV-Proben-Nr. 2) gerinnungsgehemmt waren, direkt für die RNA-Isolierung verwendet.

Für den Vergleich der RNA-Isolierungsmethoden mit Vollblut als Probenmaterial kam sowohl mit 17D-Virus künstlich kontaminiertes als auch BVDV haltiges Vollblut zum Einsatz.

Mit 17D-Virus künstlich kontaminierte Vollblutproben wurden wie folgt hergestellt:

In 5 ml Gefäßen mit Schraubverschluss wurden einmal 1875 µl und fünfmal je 2250 µl negatives Vollblut gerinnungsgehemmt mit EDTA bzw. Lithiumheparinat vorgelegt. In das erste Gefäß wurden 625 µl 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstand mit einem Titer von  $4 \times 10^5$  KID<sub>50</sub>/ml gegeben. Anschließend erfolgte eine log<sub>10</sub>-Verdünnung durch Übertragung von jeweils 250 µl 17D-Virus haltigem Material in das nächste negative Röhrchen bis zu einem kalkulierten Titer von einer KID<sub>50</sub>/ml. Die Verdünnungen 10<sup>5</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10 und

1 KID<sub>50</sub>/ml wurden zu Portionen von 130 µl auf 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße verteilt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

BVDV haltige Vollblutproben wurden folgendermaßen vorbereitet:

In 5 ml Gefäßen mit Schraubverschluss wurden viermal je 2250 µl negatives Vollblut gerinnungsgehemmt mit EDTA bzw. Lithiumheparinat vorgelegt. 250 µl BVDV-positiven Blutes (BVDV-Proben-Nr. 3 bzw. 4) wurden zu den ersten negativen 2250 µl gegeben. Anschließend wurde eine log<sub>10</sub>-Verdünnung durch Weitergabe von jeweils 250 µl BVDV-haltigem Vollblut bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-4</sup> hergestellt. Unverdünntes BVDV-haltiges Vollblut und die Verdünnungen 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-4</sup> wurden zu Portionen von 130 µl auf 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße verteilt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

#### **3.3.4 Vollmilch**

Zur Erprobung der Trizol-Standard-Methode wurde eine BVDV positive Vollmilchprobe (BVDV-Proben-Nr. 5), nachdem sie in einem Eisbad aufgetaut worden ist, ohne weitere Behandlung für die RNA-Isolierung eingesetzt.

Für den Vergleich der RNA-Isolierungsmethoden wurden neben unverdünnten Milchproben (BVDV-Proben-Nr. 6 und 7) Verdünnungsreihen mit BVDV negativer Milch verwendet. In 10 ml Reagenzgläsern ohne bzw. mit 2,5 mg Natriumazid wurden je 9 ml BVDV-negative Milch vorgelegt. In das erste Reagenzglas wurden 1 ml unverdünnte BVDV-haltige Milch (BVDV-Proben-Nr. 6) bzw. unverdünnte mit Natriumazid konservierte BVDV-haltige Milch (BVDV-Proben-Nr. 7) gegeben und nach gutem Mischen durch Weitergabe von jeweils 1 ml BVDV-haltiger Milch in das jeweils nächste Reagenzglas mit BVDV-negativer Milch log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihen bis 10<sup>-4</sup> hergestellt. Unverdünnte BVDV haltige Proben und die Verdünnungen 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-4</sup> wurden zu Portionen von 130 µl auf 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße verteilt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

### 3.3.5 Sperma und Seminalplasma

Durch Absamung eines Ebers aus dem Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule wurde Ebersperma frisch gewonnen. Die spermareiche Fraktion wurde in das Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Das Seminalplasma wurde durch Zentrifugation von 40 ml der spermienreichen Fraktion bei 3500 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 10 min gewonnen. Künstlich mit dem KSPV-Stamm Alfort 187 kontaminierte Vollsperma- und Seminalplasmaproben wurden wie folgt hergestellt:

In 5 ml Gefäßen mit Schraubdeckelverschluss wurden 9 mal je 2250 µl negatives Vollsperma bzw. Seminalplasma vorgelegt. Zu dem ersten Röhrchen wurden 250 µl Alfort 187 haltiger Zellkulturüberstand mit einem Titer von  $10^8$  KID<sub>50</sub>/ml gegeben. Anschließend erfolgte eine Verdünnung in Zehnerschritten durch Übertragung von jeweils 250 µl Alfort 187 haltigem Material in das nächste negative Röhrchen bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^{-1}$  KID<sub>50</sub>/ml. Die Verdünnungen mit einem kalkulierten Titer von  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ , 1, und  $10^{-1}$  KID<sub>50</sub>/ml wurden zu Portionen von 130 µl auf 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße verteilt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

### 3.3.6 Autoklaviertes Abwasser

Autoklaviertes Abwasser wurde für den Vergleich von RNA-Isolierungsmethoden durch Zusatz von 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand künstlich mit dem Gelbfiebervirusimpfstamm 17D kontaminiert. Anschliessend wurden log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihen wie folgt hergestellt:

In 1,6 ml Mikroreaktionsgefäßen wurden einmal 750 µl und viermal je 900 µl autoklaviertes Abwasser vorgelegt. In das erste Mikroreaktionsgefäß wurden 250 µl 17D-Virus haltigen Zellkulturüberstandes mit einem Titer von  $4 \times 10^5$  KID<sub>50</sub>/ml gegeben. Anschließend erfolgte eine Verdünnung in Zehnerschritten durch Übertragung von jeweils 100 µl 17D-Virus haltigem Material in das nächste 17D-Virus negative Mikroreaktionsgefäß bis zu einem kalkulierten Titer von 10 KID<sub>50</sub>/ml. Probenmaterial mit kalkulierten Titern von  $10^5$ ,  $10^3$  und

10 KID<sub>50</sub>/ml wurden unmittelbar nach Herstellung der Proben für die RNA-Isolierung eingesetzt.

### **3.3.7 KSPV haltiges Organmaterial**

KSPV haltige Lymphknoten-, Tonsillen-, Milz- und Hodengewebebeobproben (KSPV-Proben-Nr. 2 bis 5) wurden wie folgt zur RNA-Isolierung vorbereitet:

Gewebestückchen, die zwischen 10 und 50 mm<sup>3</sup> groß waren, wurden von den noch nicht vollständig getauten Gewebeproben mit Hilfe von Skalpellklingen abgeschnitten. Ein Teil der Gewebestückchen wurde in Parafilmabschnitte von 1 cm x 1 cm gewickelt, in flüssigen Stickstoff getaucht und danach im Parafilm mit dem Stempel einer Kunststoffspritze auf der Arbeitsplatte zerdrückt. Vom homogenisierten Material wurde mit einer Pipettenspitze soviel wie möglich aufgenommen und direkt für die RNA-Isolierung in der Trizol-Standard-Methode verwendet.

Alternativ erfolgte die Aufarbeitung von Organproben durch Homogenisierung in PBS, MES-Puffer oder Trizol. Erfolgte die Homogenisierung mit dem Handhomogenisiergerät Polytron PT 1200 C wurden die Gewebestückchen mit ca. 1 ml Flüssigkeit in ein 1,6 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. Danach wurde bis zum Erreichen eines bei PBS und MES-Puffer fleischfarbenen, bei Trizol bräunlichen Überstandes mit bis zu 25000 UpM homogenisiert, bei 900 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand direkt für die RNA-Isolierung in die Trizol-Standard-Methode eingesetzt.

Erfolgte die Homogenisierung der Gewebeproben von Hand mittels Einmalpistillen wurden die Gewebestückchen in die mit den Mikropistillen ausgelieferten 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße gegeben. Dazu kamen 500-1000 µl Flüssigkeit. Mit dem Pistill wurde die Probe homogenisiert, bis der Überstand milchig bis fleischfarben aussah. Danach wurde niedertourig etwa 10 min bei 900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für die RNA-Präparation genutzt.

### 3.3.8 Lebergewebe

Lebergewebe wurde für den Vergleich von RNA-Isolierungsmethoden wie folgt beschrieben vorbereitet:

Jeweils ein BVDV positives und fünf BVDV negative Rinderlebergewebsstückchen wurden auf einer Mikrowaage zu 10 mg in 1,6 ml Mikroreaktionsgefäße eingewogen. Dazu wurden bei Einsatz der Trizol-Standard-Methode 250 µl Trizol bzw. bei Verwendung des Machery&Nagel Nucleo Spin II Kits 250 µl Puffer RA1 gegeben und mittels Mikropistill homogenisiert. Dann wurde kurz anzentrifugiert und 200 µl des Überstandes der positiven Probe bzw. 180 µl des Überstandes aus negativem Probenmaterial in ein neues 1,6 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Es wurden Verdünnungen bis zu  $10^{-4}$  durch die Überführung von je 20 µl BVDV-haltigem Material zu den nächsten 180 µl BVDV negativem Überstand hergestellt. Für die RNA-Isolierung kamen jeweils 100 µl des Überstandes des unverdünnten positiven Leberhomogenisats bzw. der Verdünnungen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  zum Einsatz.

### 3.3.9 Positive Kontrollproben

Für den Vergleich der RNA-Isolierungsmethoden mit 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand kam als positive Kontrolle unverdünnter 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstand mit einem Titer von  $4 \times 10^5$  KID<sub>50</sub>/ml zum Einsatz.

Für die Untersuchung komplexer Probenmaterialien wurden Verdünnungsreihen 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstände für die künstlich mit 17D-Virus kontaminierten Proben mit einem Titer von verwendet. Verdünnungen NADL-Virus haltigen Zellkulturüberstandes mit einem Titer von  $10^4$  KID<sub>50</sub>/ml dienten als positive Kontrollen bei der Arbeit mit Proben, die Pestiviren enthielten. Die jeweiligen Zellkulturüberstände wurden zu 130 µl in 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße portioniert und bis zur weiterer Verwendung bei -80 °C eingefroren.



### **3.3.10 Negative Kontrollproben**

Als negative Proben wurden mit EDTA gerinnungsgehemmtes Rindervollblut, mit Lithiumheparinat gerinnungsgehemmtes Rindervollblut, Vollmilch, Vollmilch konserviert mit Natriumazid, Eberovollsperma, Eberseminalplasma sowie DEPC-Wasser in Portionen zu 130 µl bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Die negative mit Natriumazid konservierte Vollmilch wurde hergestellt, indem 10 ml negativer Vollmilch in ein 10 ml Reagenzglas gegeben wurden, in dem 2,5 mg Natriumazid vorgelegt worden waren. Für die Untersuchung der RNA-Isolierungsmethoden mit künstlich mit 17D-Virus kontaminiertem autoklaviertem Abwasser wurde das unbehandelte autoklavierte Abwasser als negative Kontrolle verwendet. Bei der Untersuchung der RNA-Isolierung aus BVDV haltigem Lebergewebe diente der Überstand des Lebergewebehomogenisates aus BVDV negativem Lebergewebe als Negativprobe.

Das Probenmaterial war als Pestivirus- bzw. 17D-Virus negativ deklariert und ist vor Einsatz als Negativprobe auf ein negatives Resultat nach RNA-Isolierung mittels Trizol-Standard-Methode und anschließender RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms bzw. zum Nachweis von Pestivirusgenomen getestet worden.

## **3.4 RT-PCRs zum Genomnachweis von Pestiviren und des 17D-Virusgenoms**

### **3.4.1 Primer**

Für den Nachweis der Pestivirusgenome von BVDV und KSPV wurden die *Primer* BVD 2 und BVD 3, mit denen eine Basensequenz des Nichtstrukturproteins NS2-3 aller bisher untersuchten Pestiviren amplifiziert wird, ausgewählt (GREISER-WILKE et al. 1993). Bei dem BVD-Virusstamm NADL wird ein 672 bp großes Fragment amplifiziert; bei nichtzytopathogenen BVDV und bei KSPV hat das entsprechende Fragment eine Größe von 402 bp (GREISER-WILKE et al. 1993). Alternativ wurden die Panpesti-*Primer* Pest 2 und Pest 3 (HOFMANN et al. 1994) eingesetzt, die je nach Pestivirusstamm ein zwischen 148 und 159 bp großes Fragment der 5' nicht translatierten Region (5'-NTR) amplifizieren.

*Primer* für den Nachweis des Genoms des Gelbfieberevirusimpfstammes 17 D wurden nach CHOW et al. (1993) ausgewählt und anhand eines Sequenzvergleichs mit der 17D-Nukleotidsequenz variable bzw. nicht passende Nukleotide durch die entsprechenden spezifischen Basen ersetzt. Es wird ein 473 bp großes Stück im NS3 Gen amplifiziert.

Im Folgenden sind die einzelnen *Primer*-Sequenzen dargestellt:

**BVD-2:**

23 Basen, Position 4937-4960 des NADL-Genoms:

5' gcA gAT TTT gAA gAA AgA cAc TA 3'

**BVD-3:**

18 Basen, Position 5609-5591 des NADL-Genoms:

5' TTg gTg TgT gTA Agc ccA 3'

**Pest2:**

21 Basen, Position 350-370 des Alfort 187-Genoms:

5' TcAAcTccATgTgccATgTAc 3'

**Pest3**

19 Basen, Position 216-234 des Alfort 187-Genoms:

5' gTggAcgAgggcATgcccA 3'

**17D1:**

17 Basen; Position 4976-4992 des Gelbfieberimpfstamm 17D-Genoms

5' ggc AcT TcA ggA TcT cc 3'

**17D3:**

17 Basen; Position 5432-5448 des Gelbfieberimpfstamm 17D-Genoms

5' AAA Tgg gcT TcA Tcc AT 3'

### 3.4.2 RT-PCR

In Anlehnung an die RT-PCR-Protokolle nach HOFMANN et al. (1994) und GREISER-WILKE et al. (1995) wurden eigene RT-PCR-Protokolle zum Nachweis des 17D-Virusgenoms bzw. der Pestivirusgenome entwickelt. Für die RT-PCR wurde eine Konzept gewählt, bei dem die RT getrennt von der PCR durchgeführt wird. Um einen möglichst

großen Einfluß der RNA-Isolierung auf die nachfolgenden enzymatischen Reaktionen zu erhalten, wurden 8 µl RNA für eine RT eingesetzt. Außerdem wurde gegenüber der RT bei GREISER-WILKE et al. (1995) die DTT-Konzentration im RT-Ansatz auf die vom Hersteller empfohlene Konzentration erhöht. Eine spezielle Optimierung der RT erfolgte nicht. Die Rezepte und Volumina für die Mastermixe sowie das Thermocyclerprogramm zur Durchführung der RT sind den **Tabellen 7 bis 9** entnehmbar.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung des RT-Mastermix 1

<i>Reagenzien</i>	<i>eingesetztes Volumen</i>
5 x first strand buffer	4,0 µl
dNTPs	4,0 µl

RT-Mastermix 1 für jeweils 10 Proben wurde in einem 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß bei -20 °C bis zur späteren Verwendung eingefroren. Von dem RT-Mastermix 1 wurden 8 µl in ein 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß vorgelegt. Dazu wurden 8 µl des RNA-Isolates gegeben und der Ansatz durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und danach sofort in ein Eisbad gestellt.

**Tabelle 8:** Zusammensetzung des RT-Mastermix 2

<i>Reagenzien</i>	<i>eingesetztes Volumen</i>
0,1 M DTT	1,75 µl
Random <i>Primer</i> (100 µM)	1,0 µl
RNase-Inhibitor	0,25 µl
MMLV-reverse Transkriptase	1,0 µl

Nachdem der RT-Mastermix 2 durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt wurde, wurden 4 µl von diesem zum RT-Ansatz gegeben und ebenfalls gut gemischt. Das Thermocyclerprogramm für die reverse Transkription bestand aus folgenden Schritten (**Tabelle 9**).

**Tabelle 9:** Thermocyclerprogramm für die RT

<i>Programmschritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Anlagerung der Hexamere	22 °C	5 min
Reverse Transkription	37 °C	15 min
Reverse Transkription	42 °C	30 min
Inaktivierung der reversen Transkriptase	99 °C	7 min
Warten bis Entnahme	4 °C	unendlich

Bis zur Entnahme aus dem Gerät erfolgte eine Kühlung der cDNA-Ansätze im Thermocycler bei 4 °C. Erfolgte kein unmittelbarer Einsatz der cDNA, wurde diese bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

### 3.4.3 PCR zum Nachweis des 17 D-Virusgenoms

Die PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms wurde unter Verwendung der Tth-Polymerase und mit RNA, die mit der Trizol-Standard-Methode aus Verdünnungen 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstände gewonnen wurde, optimiert. Dafür wurden in dem Rezept für den PCR-Mastermix (**Tabelle 10**) verschiedene Magnesiumchlorid- und *Primer*-Konzentrationen erprobt. In dem dazugehörigen Thermocycler-PCR-Programm (**Tabelle 11**) wurden Anlagerungstemperaturen und Zykluszahlen variiert. Die Optimierung erfolgte in der Reihenfolge Anlagerungstemperatur, Magnesiumchloridkonzentration, Zykluszahl und Primerkonzentrationen, wobei von bestimmten Ausgangswerten ausgegangen worden ist. Nach Optimierung eines Parameters wurde der als optimal ermittelte Wert für die weiteren Optimierungen verwendet. Die Anlagerungstemperaturen variierten zwischen 50 °C, 53 °C, 56 °C und 59 °C. Für die Magnesiumchloridkonzentrationen wurden Werte zwischen 1,5 mM, 2,5 mM, 3,5 mM und 4,5 mM pro PCR-Ansatz erprobt. Als Zykluszahlen wurden 25, 30, 35, 40 und 45 Zyklen eingesetzt. Die Konzentration der *Primer* lag pro *Primer* bei 100 pmol, 50 pmol, 25 pmol und 10 pmol je PCR-Ansatz.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des PCR-Mastermix

<i>Reagenzien</i>	<i>eingesetztes Volumen</i>	<i>Ausgangswert vor Optimierung</i>
<b>Magnesiumchlorid</b> (25 mM-Lösung)	variabel	1,5 mM
<b>20 x Tth-Puffer</b>	2,25 µl	
<b>dNTPs</b> (je 2,5 mM)	4,0 µl	
<b>Primer</b> 17D1	variabel	50 pmol
<b>Primer</b> 17D3	variabel	50 pmol
<b>Tth-Polymerase</b> (5U/µl)	0,25 µl	
<b>DNase-/RNase-freies Wasser</b>	ad 45 µl	

PCR-Mastermixe für 10 Proben wurden ohne Tth-Polymerase in 0,5 ml Mikroreaktionsgefäßen angesetzt. Wurden die PCR-Mastermixe nicht sofort verwendet, wurden sie bei -20 °C eingefroren und vor Verwendung in einem Eisbad aufgetaut. Direkt vor Einsatz eines PCR-Mastermixes wurde die Tth-Polymerase zugesetzt und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Anschließend wurden von dem PCR-Mastermix je 45 µl in ein 0,5 µl Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und je 5 µl cDNA zugegeben. Danach wurde das in Tabelle 11 dargestellte Thermocyclerprogramm ausgeführt wobei die Anlagerungstemperatur vor der Optimierung 53 °C betrug und die Zykluszahl 35 war.

**Tabelle 11:** Thermocyclerprogramm für die PCR

<i>Programmschritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Länge</i>	<i>Zykluszahl</i>		
<b>initiale Denaturierung</b>	95 °C	2 min			
Beginn Zyklus	variabel				
<b>Denaturierung</b>				95 °C	30 sek
<b>Anlagerung</b>				variabel	3 min bzw. 1 min (ab dem 6. Zyklus)
<b>Verlängerung</b>				72 °C	1 min
Ende Zyklus					
<b>finale Verlängerung</b>	72 °C	10 min			
<b>Warten bis Entnahme</b>	4 °C	unendlich			

### 3.4.4 Erprobung unterschiedlicher DNA-Polymerasen und von HotStart-Verfahren

Nach Optimierung des RT-PCR-Protokolls zum Nachweis des 17D-Virusgenoms unter Verwendung der Tth-Polymerase wurden drei weitere Polymerasen und HotWaxMg<sup>++</sup>Beads erprobt und das Thermocyclerprogramm entsprechend den Herstellerangaben modifiziert. Als Polymerasen wurden die Taq-Polymerase von Promega, die Taq-Polymerase von Appligene Onco und die HotStarTaq-Polymerase von Qiagen eingesetzt. Neben der HotStarTaq-Polymerase wurden Wachskügelchen, die Magnesiumchlorid enthielten (HotWaxMg<sup>++</sup>Beads, Invitrogen) für das HotStart-Verfahren verwendet. Für die Taq-Polymerase von Promega wurden im PCR-Mastermix die Magnesiumchloridlösung und der 20 x Tth-Puffer durch die von Promega mit der Polymerase mitgelieferten Reagenzien ersetzt. Für die Erprobung der Taq-Polymerase von Appligene Onco wurde nur der 20 x Tth-Puffer durch den Inkubationspuffer 10 x C ausgetauscht. Bei Einsatz der HotStarTaq-Polymerase von Qiagen wurden die mitgelieferte Magnesiumchloridlösung und der zugehörige 10 x PCR-Puffer verwendet. Im Thermocyclerprogramm wurde zur Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase die Zeit für die initiale Denaturierung auf 15 min verlängert.

Die HotWaxMg<sup>++</sup>Beads wurden verwendet, indem im PCR-Mastermix das Volumen an Magnesiumchloridlösung durch DNase-/RNase-freies Wasser ersetzt wurde. Zusätzlich wurde ein HotWaxMg<sup>++</sup>Bead jeweils zu einem kompletten PCR-Ansatz gegeben. Um eine optimale Freisetzung des Magnesiumchlorids durch Schmelzen des HotWaxMg<sup>++</sup>Beads zu gewährleisten, wurde im PCR-Programm die Zeit für die initiale Denaturierung auf 5 min verlängert.

### 3.4.5 RT-PCR-Protokolle zum Nachweis von Pestivirusgenomen

Basierend auf der optimierten RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms wurden RT-PCR-Protokolle zum Nachweis von Pestivirusgenomen unter Verwendung der *Primer* BVD 2/3 und Pest 2/3 etabliert. Im Protokoll für den PCR-Mastermix wurde der *Primer* 17D1 durch den *Primer* BVD 2 bzw. Pest 2 und der *Primer* 17D3 durch den *Primer* BVD 3 bzw. Pest 3 ersetzt. Für das *Primer*-Paar BVD 2/3 war die optimale Anlagerungstemperatur für den verwendeten Thermocycler bereits bekannt. Die Anlagerungstemperatur im

Thermocyclerprogramm wurde für das *Primer*-Paar BVD 2/3 auf 55 °C geändert. Für das *Primer*-Paar Pest 2/3 musste die optimale Anlagerungstemperatur für den verwendeten Thermocycler noch bestimmt werden. Als Anlagerungstemperaturen wurden 50 °C, 55 °C, 60 °C und 63 °C erprobt.

### **3.4.6 Bestimmung der Nachweisgrenzen der etablierten RT-PCR-Protokolle**

Die Nachweisgrenzen der etablierten RT-PCR-Protokolle wurden mittels RNA bestimmt, die mit der Trizol-Standard-Methode (siehe unten) aus Verdünnungsreihen 17D-Virus, NADL-Virus und Alfort 187 haltiger Zellkulturüberstände gewonnen worden waren. Die RNA wurde in die jeweiligen RT-PCR-Protokolle eingesetzt und bestimmt bis zu welcher KID<sub>50</sub>/ml Verdünnung im Agarosegel ein PCR-Produkt sichtbar war.

### **3.4.7 Visualisierung der PCR-Produkte im Agarosegel**

Agarose für 1,5 %, 2 % bzw. 3 % (m/V) Gele wurde in einen Erlenmeyerkolben abgewogen, mit dem entsprechendem Volumen TBE-Puffer gemischt und im Mikrowellenherd erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach kurzer Abkühlung wurde die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftbläschen bildeten. Nach vollständiger Erstarrung der Agarose wurde der Kamm entfernt. Die Gele wurden stets kurz vor Gebrauch angesetzt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet.

Auf einem ca. 1 cm breiten Parafilm-Streifen wurden in kurzen Abständen jeweils 4 µl Probenpuffer pipettiert. Diese wurden mit je 20 µl PCR-Reaktionsgemisch vermischt und in die Geltaschen überführt. Als Längenstandard wurden in eine Tasche 1,5 µl 100 bp-Längenmarker gemischt mit 20 µl TBE-Puffer und 4 µl Probenpuffer aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden bei ca. 140 Volt solange im Agarosegel elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt, bis die sichtbare Methylenblaufraktion des Probenpuffers sich etwa 1 cm vor Ende des Agarosegels befand. Danach erfolgte eine Anfärbung in einer Ethidiumbromidlösung über 30 min und eine Entfärbung über mindestens 10 min in Wasser.

Zur Protokollierung wurden die Gele unter UV-Licht bei 254 nm Wellenlänge mit einem Bildverarbeitungssystem erfasst, ausgedruckt und auf Diskette gespeichert.

### **3.4.8 Überprüfung der Spezifität des 17D-RT-PCR-Produktes**

Das entstandene PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym Alu I geschnitten und die entstandenen Fragmente nach Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Hierzu wurden 20 µl des PCR-Produktes mit 2,5 µl des Enzyms Alu I und 2,5 µl des zugehörigen Puffers 5 h bei 37 °C in einem 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 min auf 65 °C erhitzt, um das Restriktionsenzym zu inaktivieren. Die Größe der Fragmente konnte anhand eines Größenmarkers im Agarosegel ermittelt und mit den zu erwartenden Fragmentlängen verglichen werden. Die Alu I-Schnittstellen des PCR-Produktes der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenomes liegen hinter dem 135. und 199. Basenpaar, so dass bei einem spezifischen Amplifikat drei Fragmente mit 64, 135 und 274 Basenpaaren zu erwarten waren.

## **3.5 Methoden zur Isolierung von RNA**

### **3.5.1 Erstellung einer Marktübersicht über kommerziell erhältliche RNA-Isolierungskits**

Es wurde eine Marktübersicht mittels Literatur- und Internetrecherche, Sichtung von Katalogen und Kontaktaufnahme zu Vertriebs- und Herstellerfirmen durchgeführt. Für die internationale Internetrecherche wurde die Suchmaschine <http://www.excite.com> verwendet. Für das deutschsprachige Internet erfolgte die Suche mit Hilfe der Metasuchmaschine <http://www.metager.de>. Als Suchworte wurden die Begriffe RNA, Ribonukleinsäure, Isolierung, Extraktion, Reinigung, Kit, PCR, RT-PCR, Methoden und Molekularbiologie sowie *ribonucleic acid*, *isolation*, *extraction*, *purification*, *methods* und *molecular biology* verwendet.



Es wurden Methoden zur Isolierung bzw. Probenvorbereitung von Gesamt-RNA bzw. viraler RNA für den Einsatz in Nukleinsäureamplifikationstechniken erfasst. Soweit möglich wurde aus den Herstellerangaben und den konkreten Protokollen ermittelt, welche Prinzipien für den Probenaufschluss und die RNA-Isolierung eingesetzt werden. Zusätzlich wurden die vom Hersteller für die jeweiligen Methoden vorgeschlagenen Probenmaterialien festgestellt.

### **3.5.2 Etablierung und Optimierung der Trizol-Standard-Methode**

Die Trizol-Standard-Methode basiert auf dem Prinzip der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (CHOMCZYNSKI u. SACCHI, 1987). Neben dem Trizolreagens, das Guanidinisothiozyanat, eingestelltes Phenol und einen roten organischen Farbstoff enthält, wurden Chloroform, Isopropanol, 75 % Ethanol, DNase-/RNase-freies Wasser, Pellet-Paint, zelluläre RNA gewonnen mit dem RNeasy Mini Kit aus FKN-Zellen, Bäckerhefen-RNA, Poly A-Lösung und Glykogen zusätzlich benötigt.

Die Optimierung der Trizol-Standard-Methode erfolgte ausgehend von der für Probenmaterialien unterschiedlicher Beschaffenheit geeigneten Arbeitsvorschrift des IVI, Mittelhäusern, Schweiz (HOFMANN, persönliche Mitteilung) unter Verwendung von Verdünnungen NADL-Virus haltigen Zellkulturüberstandes. Die isolierte RNA wurde mit der bei GREISER-WILKE et al. (1995) beschriebenen RT-PCR unter Verwendung der Primer BVD 2/3 amplifiziert. Die einzelnen Arbeitsschritte zur Isolierung von RNA mit der Trizol-Standard-Methode und die zur Optimierung durchgeführten Veränderungen sind im Folgenden detailliert beschrieben:

#### ***1. Versetzen der Probe mit Trizol und Homogenisierung***

250 µl Probe wurden mit 750 µl Trizol durch Schütteln von Hand bei Raumtemperatur gemischt und 5 min inkubiert.

#### **Veränderungen:**

##### ***Probenvolumen:***

- Veränderung von 250 µl auf 50 µl und 100 µl
- Auffüllen mit Aqua bidest bzw. MES-Puffer auf 250 µl

*Inkubationstemperaturen:*

- 25 °C und 37 °C konstant im Brutraum

*Präzipitationshilfen:*

- 10 und 20 µg Glykogen
- 2 µl zelluläre RNA isoliert mittels RNeasy-Mini-Kit aus
- 10, 15 bzw. 30 µg Bäckerhefen-RNA
- 2 µl Pellet-Print

**2. Phasentrennung**

200 µl Chloroform wurden zugegeben, 15 sek von Hand stark geschüttelt und danach 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde bei 12000 x g 15 min bei 4 °C zentrifugiert.

Veränderungen:

- 25 °C und 37 °C konstant im Brutraum

**3. RNA-Präzipitation**

In einem 1,6 ml Mikroreaktionsgefäß wurden 600 µl Isopropanol und 650 µl der nach der Zentrifugation entstandenen farblosen wässrigen Phase gegeben und durch Umschütteln gemischt. Anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte für 10 min eine Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C.

Veränderungen:*Inkubationstemperaturen:*

- 25 °C konstant im Brutraum
- 4 °C konstant im Kühlraum
- -20 °C konstant im -20 °C-Raum

*Präzipitationszeit:*

- Verlängerung von 10 min auf 30 bzw. 60 min

*Zentrifugationszeit:*

- Ausdehnung von 10 min auf 30 min

*Präzipitationshilfen zugesetzt zum Isopropanol-wässrige Phase-Gemisch:*

- 0,5 µl; 1 µl und 2 µl Pellet Print

- 10 µg, 20 µg, 30 µg und 150 µg Glykogen
- 5 µg bzw. 15 µg Bäckerhefen-RNA
- 6 µl Poly (A)-Lösung

#### **4. Waschen der RNA**

Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und anschließend das Sediment mit 1 ml 75 % Ethanol durch starkes Schütteln mit einem elektrischen Schüttler gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 7500 x g wurde der Überstand verworfen.

##### Veränderungen:

- Wiederholung des Waschschrilles wie oben beschrieben

#### **5. Trocknung und Rehydrierung der RNA in Wasser**

Das Sediment wurde bei offenem Deckel 10 min lang luftgetrocknet. Danach wurde es durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

##### Veränderungen:

##### *Wasservolumen:*

- Reduzierung von 20 µl auf 3 µl und 6 µl
- Vergrößerung von 20 µl auf 50 µl

##### *Vorgehen nach Zugabe des Wassers zur RNA:*

- Inkubation 1 min bei 70 °C und geöffnetem Deckel
- Weglassen des mehrmaligen Auf- und Abpipettierens , mindesten 15 minütige Inkubation in einem Eisbad

### **3.5.3 Optimierte Trizol-Standard-Methode**

In einem Reaktionsgefäß wurden 750 µl Trizol, 150 µl MES-Puffer und 30 µg RNA aus Bäckerhefe vorgelegt und mit 100 µl des Probenmaterials gut vermischt. Der Ansatz wurde 5 min bei 37 °C im Brutraum inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Der Ansatz wurde 15 sek stark von Hand geschüttelt und danach 3 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 min bei 12000 x g. 650 µl der

wässrigen Phase wurden vorsichtig in ein neues 1,6 ml Mikroreaktionsgefäß mit 600 µl Isopropanol überführt. Danach wurden 150 µg Glykogen als weitere Präzipitationshilfe zugesetzt. Es folgte eine Präzipitationszeit von 1 h bei 4 °C im Kühlraum und anschließend eine Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g für 30 min. Danach wurde das Isopropanol abgegossen und zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des restlichen Ethanols wurde das Sediment im Mikroreaktionsgefäß 10 min mit offenem Deckel getrocknet und danach die RNA in 50 µl DNase-/RNase freiem Wasser im Eisbad für wenigstens 15 min gelöst.

#### **3.5.4 Erprobung der universellen Einsetzbarkeit der Trizol-Standard-Methode**

Die universelle Einsetzbarkeit der optimierten Trizol-Standard-Methode wurde mit verschiedenen Probenmaterialien überprüft. Unter Verwendung von 17D-Virus, NADL und Alfort 187 haltigen Zellkulturüberständen wurden die erreichbaren Nachweisgrenzen in Verbindung mit den RT-PCRs zum Nachweis des 17D-Virusgenoms bzw. von Pestivirusgenomen mit den Primern BVD 2/3 und Pest 2/3 bestimmt.

Anschließend erfolgte die Erprobung BVDV und KSPV haltiger klinischer Probenmaterialien unter Verwendung der RT-PCR-Protokolle zum Nachweis von Pestiviren.

Als flüssige Probenmaterialien kamen mit EDTA- bzw. Lithiumheparinat gerinnungsgehemmte Blutproben aus der BVDV-Diagnostik des Institutes für Virologie (BVDV-Proben-Nr. 1 und 2), Proben fetalen Kälberserums (BVDV-Proben-Nr. 9 und 10) und Vollmilch (BVDV-Proben-Nr. 5), sowie eine KSPV haltige mit EDTA gerinnungsgehemmte Blutprobe (KSPV-Proben-Nr. 1) aus dem EU-Referenzlabor für KSP der Tierärztlichen Hochschule zum Einsatz. Die Eignung der Trizol-Standard-Methode für die RNA-Isolierung aus Organmaterial wurde mit KSPV haltigen Lymphknoten-, Milz-, Tonsillen- und Hodengewebe (KSPV-Proben-Nr. 2 bis 5) untersucht.

### **3.5.5 Trizol-Standard-Methode kombiniert mit RNABind**

Anstelle der RNA-Präzipitation wurde die RNA mit einem RNA-bindenden Harz, RNABind, unter Anwendung des Prinzips der Bindung von RNA unter Hochsalzbedingungen und bei Anwesenheit organischer Lösungsmittel (BOOM et al. 1990) präpariert und gereinigt. Zusätzlich wurden Chloroform, Isopropanol, 75 % Ethanol, Bäckerhefe und DNase-/RNase-freies Wasser benötigt.

In ein 1,6 ml Reaktionsgefäß wurden 750 µl Trizol, 150 µl MES-Puffer und 30 µg RNA aus Bäckerhefe gegeben und mit 100 µl des Probenmaterials gut vermischt. Der Ansatz wurde 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Der Ansatz wurde 15 sek gut von Hand geschüttelt und danach 3 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 min bei 12000 x g. 650 µl des wässrigen Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß mit 325 µl Isopropanol überführt und 32,5 µl RNABind dazugegeben. Das Gemisch wurde bis zur Ausbildung einer homogenen milchigen Färbung auf einem Schüttler gemischt und anschließend 5 min stehen gelassen. Danach wurde 5 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Sediment wurde zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Danach wurde das entstandene Sediment 10 min getrocknet und die RNA in 50 µl DNase-/RNase-freiem Wasser resuspendiert. Direkt vor der Weiterverarbeitung wurde die RNA-Präparation stets kurz anzentrifugiert, um so wenig wie möglich RNABind mitzunehmen.

### **3.5.6 Trizol-Standard-Methode kombiniert mit Genereleaser**

Neben den bei der Trizol-Standard-Methode eingesetzten Reagenzien kam zusätzlich Genereleaser zum Einsatz. Der Genereleaser bindet nach Erhitzung Inhibitoren.

750 µl Trizol, 150 µl MES-Puffer und bei zellarmen Probenmaterialien 30 µg Hefe-RNA wurden in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 100 µl des Probenmaterials gut vermischt. Der Ansatz wurde 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Der Ansatz wurde 15 sek gut von Hand geschüttelt und danach 3 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 min bei 12000 x g.

650 µl des wässrigen Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß mit 600 µl Isopropanol überführt und 150 µg Glykogen als weitere Präzipitationshilfe zugegeben. Durch Umschütteln wurden wässrige Phase, Isopropanol und Glykogen gemischt. Es folgte eine Präzipitationszeit bei 4 °C für eine h. Anschließend wurde 30 min bei 12000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und das entstandene Sediment zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des restlichen Ethanol wurde das Mikroreaktionsgefäß 10 min mit offenem Deckel stehen gelassen. Daraufhin wurden 30 µl DNase-/RNase-freies Wasser und 20 µl gut resuspendierter Genereleaser zugegeben. Das Mikroreaktionsgefäß wurde 15 min in ein Eisbad gestellt, um eine schonende Rehydrierung der RNA zu ermöglichen. Vor Weiterverwendung der RNA-Präparation wurde diese durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut homogenisiert, so dass gleiche Mengen Genereleaser in die Folgereaktionen eingetragen wurden.

### **3.5.7 RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen**

Im RNeasy Mini Kit waren folgende Komponenten enthalten:

- Puffer RLT (Lysispuffer)
- Puffer RW1 (Waschpuffer)
- Puffer RPE (Waschpuffer)
- RNase freies Wasser
- RNeasy-Säulchen
- zwei 2 ml Auffanggefäße
- ein 1,5 ml Reaktionsgefäß

Zusätzlich wurden Ethanol, β-Mercaptoethanol und ein 1,6 ml Reaktionsgefäß benötigt.

Das Kit basiert auf dem Prinzip, dass Nukleinsäuren in Gegenwart eines chaotropen Salzes an Glasoberflächen binden. Ein anschließender Waschvorgang entfernt die Verunreinigungen. (VOGELSTEIN u. GILLESPIE 1979; BOOM et al. 1990; COLPAN 1992).

In Anlehnung an die Originalanleitung des RNeasy Mini Kits wurde folgendermaßen RNA isoliert. 400 µl Puffer RLT und 4 µl β-Mercaptoethanol wurden in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, 100 µl Probe zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Danach wurden 400 µl 70 % Ethanol zur Probe hinzugefügt und alles durch starkes Schütteln mit einem elektrischen Schüttler gut gemischt. Die RNeasy-Säule wurde in ein 2 ml Auffanggefäß gegeben und mit 700 µl des Probenansatzes beladen. Es wurde bei 7500 x g 15 sek zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Anschließend wurde der verbliebene Rest an Probenansatz auf die RNeasy-Säule gegeben und wiederum 15 sek bei 7500 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. 700 µl Puffer RW1 wurden auf die RNeasy-Säule aufgebracht und bei 7500 x g 15 sek zentrifugiert. Durchfluß und Auffanggefäß wurden verworfen und die RNeasy-Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben. 500 µl Puffer RPE wurden zugegeben und bei 7500 x g 15 sek zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 500 µl Puffer RPE. Danach wurde 2 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert, um den Puffer RPE vollständig zu entfernen. Die RNeasy-Säule wurde anschließend vorsichtig in ein steriles 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. 50 µl RNase-freies Wasser wurden auf die RNeasy-Säule pipettiert und 1 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert.

### **3.5.8 RNA-Isolierung mit dem QIAamp Viral RNA-Kit der Firma Qiagen**

Aus dem QIAamp Viral RNA-Kit standen folgende Komponenten zur Verfügung:

- Puffer AVL mit Carrier-RNA (Lysis- und Bindepuffer)
- Puffer AW (Waschpuffer)
- QIAamp-Säule
- RNase-freies Wasser
- zwei 2ml Auffanggefäße

Weiterhin wurden Ethanol und zwei 1,6 ml Reaktionsgefäße benötigt.

Die Nukleinsäuren wurden in Anwesenheit eines chaotropen Salzes an eine Glasmembran gebunden. Der Lysis- und Bindpuffer enthielt PolyA als Carriersubstanz, um die Gewinnung von Nukleinsäuren aus niedrigkonzentrierten Proben zu verbessern. Ein anschließender Waschvorgang entfernt die Verunreinigungen (VOGELSTEIN u. GILLESPIE 1979; BOOM et al. 1990; COLPAN 1992).

Ausgehend von der Originalanleitung des QIAamp Viral RNA Kits wurde folgendermaßen RNA isoliert. RNase-freies Wasser wurde in einem Wasserbad auf 80 °C Celsius erhitzt. 400 µl Puffer AVL mit Carrier-RNA wurden in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, 100 µl Probe zugegeben und durch starkes Schütteln mit einem elektrischen Schüttler gut gemischt. Danach stand der Isolierungsansatz 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 400 µl reinen Ethanol zur Probe hinzugefügt und alles durch starkes Schütteln mit einem elektrischen Schüttler gut gemischt. Die QIAamp-Säule wurde in ein zwei ml Auffanggefäß gegeben und mit 630 µl des Probenansatzes beladen. Es wurde bei 6000 x g 1 min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Anschließend wurde der verbliebene Rest an Probenansatz auf die QIAamp-Säule gegeben und wiederum 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Durchfluß und das Auffanggefäß wurden verworfen. 500 µl Puffer AW wurden auf die QIAamp-Säule pipettiert und bei 6000 x g 1 min zentrifugiert. Der Durchfluß und das Auffanggefäß wurden erneut verworfen und die QIAamp-Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben. Es folgte die Zugabe von 500 µl AW und 3 min Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit. Die QIAamp-Säule wurde 10 min bei 80 °C in einem Wärmeschrank getrocknet. Danach wurde die QIAamp-Säule in ein neues 1,6 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. 50 µl auf 80 °C erhitzten RNase-freien Wassers wurden auf die QIAamp-Säule pipettiert und 1 min bei 6000 x g zentrifugiert.

### **3.5.9 RNA-Isolierung mit dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit**

Das Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit enthielt folgende Komponenten:

- Puffer RA1 (Lysis- und Bindepuffer)
- Puffer RA2 (Waschpuffer)
- Puffer RA3 (Waschpuffer)
- RNase-freies Wasser
- Nucleo Spin Säule
- zwei 2ml Auffanggefäße



Zusätzlich benötigt wurden Ethanol,  $\beta$ -Mercaptoethanol und zwei 1,6 ml Reaktionsgefäße. Das beim Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit eingesetzte Prinzip nutzte die Bindung von Nukleinsäuren an Glasfaseroberflächen, wie bei den Kits der Firma Qiagen besprochen.

Mit dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit wurde entsprechend der Vorschrift "Isolierung aus biologischen Flüssigkeiten" RNA isoliert. 400  $\mu$ l Puffer RA1 und 4  $\mu$ l  $\beta$  Mercaptoethanol wurden in einem 1.6 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. 100  $\mu$ l Probe wurden hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Anschließend wurden 250  $\mu$ l Puffer LM hinzugefügt und der Isolierungsansatz auf einem elektrischen Schüttler geschüttelt. Die Nucleo Spin Säule wurde in ein 2 ml Auffanggefäß gegeben und mit 750  $\mu$ l RNA-Isolierungsansatz beladen. Anschließend wurde 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und 750  $\mu$ l Puffer RA2 auf die Nucleo Spin Säule gegeben. Es folgte 1 min Zentrifugation bei 8000 x g. Der Durchfluß wurde entsorgt. 500  $\mu$ l Puffer RA3 wurden auf die Nucleo Spin Säule pipettiert und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die letzten 3 Schritte wurden wiederholt. Danach wurden Durchfluß und Auffanggefäß verworfen und die Nucleo Spin Säule in ein neues 2 ml Auffanggefäß umgesetzt. und 1 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert, um den Puffer RA 3 vollständig zu entfernen. Danach wurde die Nucleo Spin Säule in ein neues 1,6 ml Reaktionsgefäß überführt und 50  $\mu$ l RNase freies Wasser dazu gegeben. Die RNA wurde durch 1 min Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit eluiert.

### **3.5.10 RNA-Isolierung mit den Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit**

Von Machery&Nagel wurde das Nucleo Spin RNA Kit vom Markt genommen und durch das Nucleo Spin RNA II Kit ersetzt. Diesem Kit fehlte der Puffer LM, der durch 96 % Ethanol, das mittels reinem Ethanol und DNase-/RNase-freiem Wasser hergestellt wurde, ersetzt worden ist. Das Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit enthielt zusätzlich DNase I und den dazugehörigen Reaktionspuffer.

Das eingesetzte Herstellerprotokoll lautete wie folgt:

400  $\mu$ l Puffer RA1 und 4  $\mu$ l  $\beta$  Mercaptoethanol wurden in einem 1,6 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. 100  $\mu$ l Probe wurden hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren

gut gemischt. Anschließend wurden 250 µl 96 % Ethanol hinzugefügt und der Isolierungsansatz auf einem Schüttler geschüttelt. Die Nucleo Spin Säule wurde in ein 2 ml Auffanggefäß gegeben und mit 750 µl RNA-Isolierungsansatz beladen. Anschließend wurde 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Nucleo Spin Säule in ein neues Auffanggefäß überführt und 1 min bei maximaler Zentrifugengeschwindigkeit zentrifugiert. 10 µl rekonstituierter DNase I und 90 µl DNase-Reaktionspuffer wurden miteinander gemischt und davon 95 µl direkt auf die Nucleo Spin Säulchen-Membran pipettiert und 15 min bei 24 °C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Puffer RA2 auf die Nucleo Spin Säule gegeben. Es folgte 1 min Zentrifugation bei 8000 x g. Danach wurden Durchfluß und Auffanggefäß verworfen und die Nucleo Spin Säule in ein neues 2 ml Auffanggefäß umgesetzt. 600 µl Puffer RA3 wurden auf die Nucleo Spin Säule pipettiert und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde entsorgt. 250 µl Puffer RA3 wurden auf die Nucleo Spin Säule pipettiert und 2 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die Nucleo Spin Säule vorsichtig in ein neues 1,6 ml Reaktionsgefäß überführt und 50 µl RNase freies Wasser dazugegeben. Die RNA wurde durch 1 min Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit eluiert.

### **3.5.11 RNA-Isolierung mit dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit mit dem Puffer RAV**

Es wurden dieselben Reagenzien wie beim Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit eingesetzt. Nur der Puffer RA1 wurde durch den Poly A als Carrier enthaltenden Lysis- und Bindepuffer RAV ersetzt.

Die RNA-Isolierung erfolgte wie unter RNA-Isolierung mit dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit beschrieben nur wurde der Puffer RA1 durch den vom Hersteller extra gelieferten Puffer RAV mit Carrier ersetzt.

### **3.5.12 RNA-Isolierung mit den Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kits mit Bäckerhefen-RNA**

Neben den unter Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit aufgeführten Reagenzien kam zusätzlich Bäckerhefen-RNA zum Einsatz. Diese diente als Carrier-Substanz. Die RNA-Isolierung nach den Standardprotokollen des Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit bzw. des Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit wurde durch den zusätzlichen Einsatz von 30 µg RNA aus Bäckerhefe modifiziert, indem zu den 400 µl Puffer RA1 und den 4 µl β-Mercaptoethanol zusätzlich 30 µg RNA aus Bäckerhefe in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß vorgelegt wurden. Ansonsten wurde die RNA, wie unter RNA-Isolierung mit Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit bzw. Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit beschrieben, präpariert.

### **3.5.13 RNA-Isolierung mit dem Purescript Kit der Firma Biozym**

Das Purescript-Kit enthielt folgende Reagenzien:

- RBC-Lysis-Solution (Erythrozyten lysierende Lösung)
- Cell-Lysis-Solution (Zellen lysierende Lösung)
- Protein-DNA-Precipitation Solution (Protein und DNA präzipitierende Lösung)
- RNA-Hydration-Solution (RNA-Hydratisierungs-Lösung)

Weiterhin wurden Isopropanol, Ethanol und Glykogen eingesetzt.

Das Prinzip des Purescript-Kits basiert auf einer Lyse des Probenmaterials mittels eines Detergenz. Eiweiße und DNA wurden durch eine Salzpräzipitation von der RNA abgetrennt (NICOLAIDES u. STOECKERT 1990; LAHIRI et al. 1992).

In Anlehnung an das PureScript-Protokoll für die RNA-Isolierung aus Körperflüssigkeiten wurde wie folgt vorgegangen:

500 µl Cell Lysis Solution wurden in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. 100 µl Probe wurden zugegeben und der Isolierungsansatz 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 5 sek mit einem elektrischen Schüttler stark geschüttelt. Danach kam der Ansatz für 5 min zu 65 °C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 200 µl Protein-DNA Precipitation Solution zum Lysat gegeben und dieses Gemisch 10 mal sanft umgeschüttelt. Anschließend

stand der Ansatz 5 min in einem Eisbad. Anschließend wurde 6 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 600 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Anschließend wurden 150 µg Glykogen zugesetzt und 50 mal sanft umgeschüttelt. Danach wurde 3 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 600 µl 70 % Ethanol durch mehrmaliges Umschütteln das entstandene Sediment gewaschen. Dann wurde 1 min bei 12000 x g zentrifugiert und Ethanolreste sorgfältig entfernt. Das verbliebene Sediment wurde 10 min mit offenem Deckel getrocknet und anschließend 50 µl Hydration Solution zugegeben. Die Rehydrierung erfolgte 30 min in einem Eisbad. Vor Gebrauch wurde 5 sek auf einem Schüttler geschüttelt, herunterzentrifugiert und anschließend mehrmals gut auf- und abpipettiert.

#### **3.5.14 RNA-Isolierung mit dem Purescript Kit der Firma Biozym modifiziert**

Die Purescript-Methode wurde ausgehend von den Inkubations- und Zentrifugationszeiten der Trizol-Standard-Methode wie folgt modifiziert:

500 µl Cell Lysis Solution wurden in ein 1,6 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. 100 µl Probe wurden zugegeben und der Isolierungsansatz 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 5 sek mit einem elektrischen Schüttler stark geschüttelt. Danach kam der Ansatz für 5 min zu 65 °C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 200 µl Protein-DNA Precipitation Solution zum Lysat gegeben und dieses Gemisch 10 mal sanft umgeschüttelt. Anschließend stand der Ansatz 5 min in einem Eisbad. Danach wurde 15 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 600 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Anschließend wurden 150 µg Glykogen zugesetzt und 50 mal sanft umgeschüttelt. Es folgte eine einstündige Wartezeit bei 4 °C. Danach wurde 30 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 600 µl 70 % Ethanol durch mehrmaliges Umschütteln das entstandene Sediment gewaschen. Dann wurde 1 min bei 12000 x g zentrifugiert und Ethanolreste sorgfältig entfernt. Das verbliebene Sediment wurde 10 min mit offenem Deckel getrocknet und anschließend 50 µl Hydration Solution zugegeben. Die Rehydrierung erfolgte 30 min in einem Eisbad. Vor Gebrauch wurde 5 sek mit einem

elektrischen Schüttler stark geschüttelt, herunterzentrifugiert und anschließend mehrmals gut auf- und abpipettiert.

### **3.5.15 Vergleich der RNA-Isolierungskits und -methoden mit 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand**

Eine Auswahl kommerziell erhältlicher Kits, die optimierte Trizol-Standard-Methode und Modifikationen wurden mit 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand vergleichend im Hinblick auf Nachweisgrenze der RT-PCR, Handhabung, Zeitaufwand und Kosten untersucht. Für die RNA-Isolierung wurden die Verdünnungen mit  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ , 1, 0,5 und 0,25 KID<sub>50</sub>/ml sowie nicht virushaltiges EMEM eingesetzt. Als Positive Kontrolle wurde 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstand mit einem Titer von  $4 \times 10^5$  KID<sub>50</sub>/ml verwendet. Als weitere negative Kontrolle wurde DEPC-Wasser eingesetzt. Für den Vergleich der unterschiedlichen RNA-Isolierungsverfahren wurden die bei den kommerziellen Kits mitgelieferten Protokolle an eine einheitliche Probeneinsatzmenge von 100 µl angepasst. Weiterhin wurde das Volumen, mit welchem die isolierte RNA eluiert bzw. in dem die isolierte RNA resuspendiert wurde, auf 50 µl festgelegt.

Bei jeder RNA-Isolierungsmethode wurden stets 8 Proben gleichzeitig aufgearbeitet. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurden nie mehrere Mikroreaktionsgefäße oder Zentrifugationssäulchen gleichzeitig geöffnet. Ebenso wurde bei allen Arbeitsschritten zwischen den einzelnen Proben immer die Pipettenspitze gewechselt. 8 µl des RNA-Isolats wurden direkt nach der RNA-Isolierung für die cDNA-Synthese eingesetzt. Der verbleibende Rest wurden bei -20 °C für weitere Anwendungen gelagert. Die Amplifikation der isolierten RNA erfolgte mit der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms. Alle RT-PCR-Reaktionen wurden in einem Eisbad angesetzt. Probenmaterial und verwendete Reagenzien wurden in einem Eisbad aufgetaut und bis zu ihrem Einsatz in diesem gelagert. Zur Vermeidung von Kontamination wurden RNA-Isolierung, die RT-PCR-Reaktionen und die Visualisierung der PCR-Produkte in unterschiedlichen Labors auf getrennten Etagen durchgeführt. Entstandener Abfall wurde sofort nach Beendigung eines Arbeitsschrittes in Kunststofftüten entsorgt.

Jede RNA-Isolierung wurde mindestens dreimal wiederholt.

Mit Hilfe einer Uhr wurde die Zeit von der Vorbereitung der Lysispuffer bis zur weiterverarbeitbaren RNA-Präparation einschließlich aller Inkubations- und Zentrifugationszeiten bestimmt. Aus den jeweils gemessenen Zeiten wurde für jede RNA-Isolierungsmethode ein Durchschnittswert errechnet. Weiterhin wurden die Anzahl an Pipettier- und Zentrifugationsschritten erfasst. Die Kosten für eine einzelne RNA-Isolierung wurden aus den jeweiligen Kitpreisen zuzüglich der Kosten für Pipettenspitzen, für Mikroreaktionsgefäße und für zusätzlich notwendige Reagenzien ermittelt.

In **Tabelle 12** sind die vergleichend untersuchten RNA-Isolierungsmethoden und die Hauptfunktionsprinzipien derselben dargestellt.

**Tabelle 12:** Übersicht über die verwendeten RNA-Isolierungsmethoden und ihre Hauptfunktionsprinzipien

<b>Methoden/Kit-Bezeichnung</b>	<b>Hauptfunktionsprinzipien</b>
Trizol-Standard-Methode	saure Guanidinisothiozyanat- <b>Phenol-Chloroform-Extraktion</b> , Isopropanolfällung der RNA
Trizol-Standard-Methode kombiniert mit RNA-Bind	saure Guanidinisothiozyanat- <b>Phenol-Chloroform-Extraktion</b> , RNA-bindendes Harz
Trizol-Standard-Methode kombiniert mit Genereleaser	saure Guanidinisothiozyanat- <b>Phenol-Chloroform-Extraktion</b> , Isopropanolfällung der RNA, Inhibitoren bindendes Substrat
RNeasy mini Kit der Firma Qiagen	Lyse mittels chaotropem Salz, reversible <b>Bindung der RNA an Siliziummaterial</b>
QIAamp Viral RNA-Kit der Firma Qiagen	Lyse mittels chaotropem Salz, reversible <b>Bindung der RNA an Siliziummaterial</b> , Poly A als Hilfssubstanz
Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit	Lyse mittels chaotropem Salz, reversible <b>Bindung der RNA an Siliziummaterial</b>
Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit modifiziert mit Herstellerpuffer RAV	Lyse mittels chaotropem Salz, reversible <b>Bindung der RNA an Siliziummaterial</b> , Poly A als Hilfssubstanz
Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kits mit Bäckerhefen-RNA	Lyse mittels chaotropem Salz, reversible <b>Bindung der RNA an Siliziummaterial</b> , Bäckerhefen-RNA als Hilfssubstanz
Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit	Lyse mittels chaotropem Salz, Abbau der DNA mit DNase I, reversible <b>Bindung der RNA an Siliziummaterial</b>
Purescript Kit der Firma Biozym	Lyse mittels Detergentien, <b>Salzpräzipitation</b> der Proteine und DNA, Isopropanolfällung der RNA

### 3.5.16 RNA-Isolierung aus komplexen Probenmaterialien

Für die RNA-Isolierung aus komplexen Probenmaterialien wurden die **Trizol-Standard-Methode**, das **Machery & Nagel Nucleo Spin II Kit** sowie die **Purescript-Methode** nach **Herstellerprotokoll** und **modifiziert** eingesetzt. Bei zellarmen Probenmaterialien, d.h. Seminalplasma, autoklaviertem Abwasser und Zellkulturüberständen wurden bei der **Trizol-Standard-Methode** und beim **Machery & Nagel Nucleo Spin II Kit** zusätzlich zum Probenmaterial 30 µg Bäckerhefen-RNA als Hilfssubstanz eingesetzt.

Als Positive Kontrolle wurde bei Einsatz von mit 17D-Virus künstlich kontaminiertem Probenmaterial 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstand und bei BVDV bzw. KSPV haltigen Probenmaterialien NADL-Virus haltiger Zellkulturüberstand jeweils mit einem Titer von  $10^4$  KID<sub>50</sub>/ml verwendet. Als Negativproben wurden entsprechend dem verwendeten virushaltigen Probenmaterial mit EDTA bzw. mit Lithiumheparinat gerinnungsgehemmtes Rindervollblut, Vollmilch, Vollmilch konserviert mit Natriumazid, Ebervollsperma, Eberseminalplasma sowie als weitere negative Kontrolle DEPC-Wasser eingesetzt. Rindervollblut, Sperma, Seminalplasma und autoklaviertes Abwasser wurden künstlich mit Virus kontaminiert. Als klinisches Probenmaterial wurde mit EDTA bzw. mit Lithiumheparinat gerinnungsgehemmtes Rindervollblut, Vollmilch, Vollmilch konserviert mit Natriumazid sowie Lebergewebehomogenisat untersucht. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 100 µl. Bis auf das autoklavierte Abwasser und das Lebergewebehomogenisat waren alle Proben vor der RNA-Isolierung bei -80 °C eingefroren. Bei der Aufarbeitung von autoklaviertem Abwasser wurde dieses direkt nach der künstlichen Kontamination mit dem Gelbfiebertvirusimpfstamm 17D zur RNA-Isolierung eingesetzt. Das verwendete Lebergewebehomogenisat wurde unverzüglich für die RNA-Gewinnung verwendet.

In **Tabelle 13** sind die künstlich kontaminierten Probenmaterialien und in **Tabelle 14** die klinischen Probenmaterialien, die kalkulierte Viruskonzentration bzw. Verdünnung, die damit getesteten RNA-Isolierungsmethoden und die jeweils eingesetzten RT-PCR-Protokolle aufgeführt.



**Tabelle 13:** Übersicht über die für die vergleichenden Untersuchungen eingesetzten künstlich kontaminierten Proben, eingesetzte Viruskonzentrationen, damit getestete RNA-Isolierungsmethoden und verwendete RT-PCR-Protokolle

<b>Probenmaterial</b>	<b>eingesetzte kalkulierte Viruskonzentrationen</b>	<b>getestete RNA-Isolierungsmethoden</b>	<b>RT-PCR-Protokolle</b>
<b>Vollblut EDTA</b> künstlich kontaminiert mit 17D-Virus	$10^5$ , $10^3$ , $10^2$ , 10, 1 KID <sub>50</sub> /ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol- Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis des <b>17D</b> -Virusgenoms
<b>Vollblut Heparin</b> künstlich kontaminiert mit 17D-Virus	$10^5$ , $10^3$ , $10^2$ , 10, 1 KID <sub>50</sub> /ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol- Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis des <b>17D</b> -Virusgenoms
<b>autoklaviertes Abwasser</b> künstlich kontaminiert mit 17D-Virus	$10^5$ , $10^3$ , 10 KID <sub>50</sub> /ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol-Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis des <b>17D</b> -Virusgenoms
<b>Vollsperma</b> künstlich kontaminiert mit dem KSPV-Stamm Alfort 187	$10^3$ , $10^2$ , 10, 1, $10^{-1}$ KID <sub>50</sub> /ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol-Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> <li>• Purescript modifiziert</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren unter Verwendung der Primer <b>Pest2/3</b>
<b>Seminalplasma</b> künstlich kontaminiert mit dem KSPV-Stamm Alfort 187	$10^3$ , $10^2$ , 10, 1, $10^{-1}$ KID <sub>50</sub> /ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol-Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> <li>• Purescript modifiziert</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren unter Verwendung der Primer <b>Pest2/3</b>

**Tabelle 14:** Übersicht über die für die vergleichenden Untersuchungen eingesetzten klinischen Probenmaterialien, eingesetzte Verdünnungen, damit getestete RNA-Isolierungsmethoden und verwendete RT-PCR-Protokolle.

<b>Probenmaterial</b>	<b>eingesetzte Proben / Verdünnungen</b>	<b>getestete RNA-Isolierungsmethoden</b>	<b>RT-PCR-Protokolle</b>
<b>Vollblut EDTA, BVDV haltig</b>	unverdünnt, $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol-Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> <li>• Purescript</li> <li>• Purescript modifiziert</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren unter Verwendung der Primer <b>BVD 2/3</b>
<b>Vollblut Heparin, BVDV haltig</b>	unverdünnt, $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol-Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> <li>• Purescript</li> <li>• Purescript modifiziert</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren unter Verwendung der Primer <b>BVD 2/3</b>
<b>Vollmilch, BVDV haltig</b>	unverdünnt, $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol-Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> <li>• Purescript</li> <li>• Purescript modifiziert</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren unter Verwendung der Primer <b>BVD 2/3</b>
<b>Vollmilch konserviert mit Natriumazid, BVDV haltig</b>	unverdünnt, $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol-Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren unter Verwendung der Primer <b>BVD 2/3</b>
<b>Lebergewebe, BVDV haltig</b>	unverdünnt, $10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trizol-Standard-Methode</li> <li>• Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II</li> </ul>	RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren unter Verwendung der Primer <b>BVD 2/3</b>

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vermehrung und Titration der Modellpathogene

Zellkulturüberstände der Modellviren wurden nach der Titration portioniert und bei -80 °C gelagert. Die ermittelten Titer betragen:

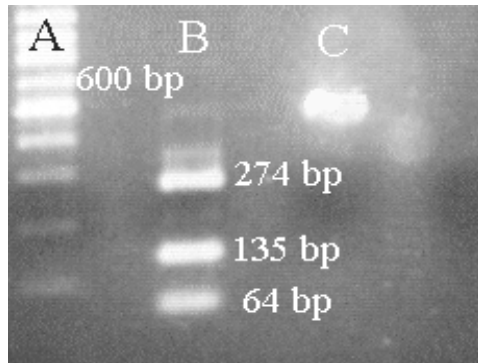
- BVDV, Stamm NADL:  $10^7$  KID<sub>50</sub>/ml
- KSPV, Stamm Alfort 187:  $10^8$  KID<sub>50</sub>/ml
- Gelbfieberevirus, Impfstamm 17D: 4 x  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml

### 4.2 Entwicklung und Optimierung der RT-PCR-Protokolle

Für die vergleichende Untersuchung von RNA-Isolierungskits-/methoden unter Verwendung von mit 17D-Virus, NADL-Virus oder Alfort 187 künstlich kontaminierten Proben bzw. BVDV bzw. KSPV haltigen klinischem Probenmaterial mussten RT-PCR-Protokolle zum Nachweis des 17D-Virusgenoms und zum Nachweis von Pestvirusgenomen entwickelt bzw. optimiert werden.

Zuerst wurde unter Verwendung von RNA, die mit der Trizol-Standard-Methode (siehe unten) aus Verdünnungen 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstände gewonnen worden war, eine RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms etabliert und das verwendete PCR-Protokoll optimiert. Die RT wurde ohne weitere Optimierungen verwendet. Nach der Erprobung unterschiedlicher Anlagerungstemperaturen, Magnesiumchloridkonzentrationen, Zykluszahlen und *Primer*-Konzentrationen erwiesen sich für die Anlagerungstemperatur 53 °C, für die Magnesiumchloridkonzentration 3,5 mM pro PCR-Ansatz, 40 Zyklen und eine Primerkonzentration von 10 pmol je *Primer* bezogen auf einen PCR-Ansatz für die PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms als optimal. Die Spezifität des mit der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms amplifizierten Produktes wurde über das spezifische Schnittmuster nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym Alu I nachgewiesen (**Abbildung 3**).

**Abbildung 3:** Elektropherogramm der Schnittprodukte nach Behandlung des Amplifikationsproduktes der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenomes mit dem Restriktionsenzym Alu I



**A:** 100 bp-Marker

**B:** Restriktionsschnittmuster des mit der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms amplifizierten Produktes

**C:** ungeschnittenes RT-PCR-Produkt

Für die *Primer Pest 2/3* wurde als optimale Anlagerungstemperatur 63 °C ermittelt. Bei Einsatz der *Primer BVD 2/3* betrug die optimale Anlagerungstemperatur 55 °C. Die optimierte Zusammensetzung der PCR-Mastermixe ist in **Tabelle 15** und die optimierten Thermocyclerprogramme sind in **Tabelle 16** dargestellt, wobei bei der PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms der *Primer 17D1* als *Primer 1* und der *Primer 17D3* als *Primer 2* für den PCR-Mastermix verwendet wurde. Entsprechend kamen der *Primer BVD 2* als *Primer 1* und der *Primer BVD 3* als *Primer 2* sowie *Primer Pest 2* als *Primer 1* und *Pest 3* als *Primer 2* bei den RT-PCRs für den Nachweis von Pestivirusgenomen zum Einsatz.

**Tabelle 15:** Optimierte Zusammensetzung der PCR-Mastermixe für die PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms mit den *Primern 17D1* und *17D3* und zum Nachweis von Pestivirusgenomen unter Verwendung der *Primer BVD 2* und *BVD 3* bzw. *Pest 2* und *Pest 3*:

<i>Reagenzien</i>	<i>eingesetztes Volumen</i>	optimale Konzentration im PCR-Ansatz
<b>Magnesiumchlorid</b> (25 mM-Lösung)	7 µl	<b>3,5 mM</b>
<b>20 X Tth-Puffer</b>	2,25 µl	
<b>dNTPs</b> (je 2,5 mM)	4,0 µl	
<i>Primer 1</i>	0,1 µl	<b>10 pmol</b>
<i>Primer 2</i>	0,1 µl	<b>10 pmol</b>
<b>Tth-Polymerase</b> (5U/µl)	0,25 µl	
<b>DNase-/RNase-freies Wasser</b>	ad 45 µl	

**Tabelle 16:** Thermocyclerprogramme für die PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms mit den *Primern* 17D1 und 17D3 und zum Nachweis von Pestivirusgenomen unter Verwendung der *Primer* BVD 2 und BVD 3 bzw. Pest 2 und Pest 3:

<b>Programmschritt</b>	<b>Temperatur bei Verwendung der Primer 17D1/17D3</b>	<b>Temperatur bei Verwendung der Primer BVD2/BVD3</b>	<b>Temperatur bei Verwendung der Primer Pest2/Pest3</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zykluszahl</b>
<b>initiale Denaturierung</b>	95 °C	95 °C	95 °C	2 min	
Beginn Zyklus					
<b>Denaturierung</b>	95 °C	95 °C	95 °C	30 sek	40
<b>Anlagerung</b>	53 °C	55 °C	63 °C	3 min bzw. 1 min (ab 6. Zyklus)	
<b>Verlängerung</b>	72 °C	72 °C	72 °C	1 min	
Ende Zyklus					
<b>finale Verlängerung</b>	72 °C	72 °C	72 °C	10 min	
<b>Warten bis Entnahme</b>	4 °C	4 °C	4 °C	unendlich	

Bei Verwendung von RNA, die mit der optimierten Trizol-Standard-Methode (siehe unten) aus 17D-Virus haltigen Zellkulturüberständen bzw. aus Zellkulturüberständen mit NADL-Virus oder Alfort 187 für den RT-PCR-Nachweis gewonnen worden war, wurden jeweils Nachweisgrenzen in der RT-PCR von wenigstens einer  $KID_{50}/ml$  virushaltigem Zellkulturüberstand erreicht. Die Nachweisgrenzen in der RT-PCR waren reproduzierbar und variierten zwischen unterschiedlichen Versuchen um maximal eine  $\log_{10}$ -Verdünnungsstufe.

Wurde dieselbe cDNA sowohl mit der PCR zum Nachweis von Pestivirusgenomen unter Verwendung der *Primer* BVD 2/3 bzw. der *Primer* Pest 2/3 amplifiziert, so wurden die gleichen Nachweisgrenzen in der RT-PCR erreicht. Die Intensität der Bande des PCR-Produktes von der niedrigsten positiven Verdünnung war mit den *Primern* Pest 2/3 etwas stärker als bei den *Primern* BVD 2/3. Gleiches wurde bei der Erprobung der Trizol-Standard-Methode mit komplexeren BVDV bzw. KSPV haltigen Probenmaterialien festgestellt. Es gelang stets ein Nachweis des entsprechenden Pestivirusgenoms, wobei die Intensität des mit den *Primern* Pest 2/3 amplifizierten Genomabschnitts etwas stärker war, als bei der Amplifikation mit den *Primern* BVD 2/3.

#### 4.2.1 Erprobung unterschiedlicher DNA-Polymerasen und von HotStart-Verfahren

Während für den Vergleich der einzelnen RNA-Isolierungskits/-methoden die Nachweisgrenze und Spezifität der entwickelten PCRs als ausreichend angesehen wurden, sollten im Hinblick auf die Untersuchung von komplexen Probenmaterialien versucht werden, die RT-PCR durch Erprobung weiterer Polymerasen und Anwendung von HotStart-Verfahren zur Reduzierung unspezifischer Amplifikate weiter zu verbessern.

Unter Verwendung von cDNA, die aus RNA-Isolaten von Verdünnungen 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstände hergestellt worden war, wurden das Protokoll der PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms mit den als optimal ermittelten Werten für Anlagerungstemperatur, Magnesiumchloridkonzentration, Zykluszahl und *Primer*-Konzentrationen an den Einsatz der Taq-Polymerasen von Promega und Appligene Oncor, der HotStarTaq-Polymerase von Qiagen und von HotWaxMg<sup>++</sup>Beads adaptiert und das Thermocyclerprogramm entsprechend den Herstellerangaben modifiziert.

Bei allen getesteten Polymerasen und bei Verwendung der HotWaxMg<sup>++</sup>Beads war im Elektrophoresebild jeweils nur die spezifische Bande bei 473 bp erkennbar. Die erreichte Nachweisgrenze lag bei Einsatz der Taq-Polymerase von Promega bei 10 KID<sub>50</sub>/ml. Die Intensität der spezifischen Bande im Agarosegel war sehr schwach. Mit der Taq-Polymerase von Appligene-Oncor, der HotStarTaq-Polymerase von Qiagen und bei Verwendung der HotWaxMg<sup>++</sup>Beads lag die erreichte Nachweisgrenze in der RT-PCR bei einer KID<sub>50</sub>/ml. Das beste Resultat wurde mit der HotStarTaq-Polymerase von Qiagen erzielt, bei der die Leuchtintensität der spezifischen Bande im Agarosegel am stärksten war. Das schwächste Ergebnis wies das PCR-Amplifikat auf, das mit der Taq-Polymerase von Appligene Oncor vermehrt worden war. Dazwischen lag das Ergebnis des PCR-Ansatzes unter Verwendung der HotWaxMg<sup>++</sup>Beads, deren Einsatz sich als arbeitstechnisch problematisch erwies. Am Ende der PCR-Reaktion hatte sich nach Abkühlung auf 4 °C eine schwer zu durchstoßende Wachsschicht über dem PCR-Ansatz ausgebildet. Vor der Agarosegelelektrophorese musste der PCR-Ansatz noch einmal erwärmt werden, um die Wachsschicht durchdringen und das PCR-Produkt entnehmen zu können.

### **4.3 RNA-Isolierung**

#### **4.3.1 Marktübersicht über kommerziell erhältliche RNA-Isolierungskits**

Auf dem deutschen Markt gab es zum Zeitpunkt der Beendigung der Marktrecherchen Ende 1999 24 Anbieter von kommerziellen Kits zur Isolierung von Gesamt- bzw. viraler RNA. Die Gesamtzahl angebotener Kits betrug 66. Die Kits basierten auf wenigen Prinzipien. Zum Probenaufschluss verwendeten fast alle Kits chaotrope Substanzen bzw. organische Lösungsmittel oder entsprechende Kombinationen. Nur bei drei Kits kamen Detergentien für den Probenaufschluss zum Einsatz, die außer beim Purescript RNA Isolierungskit noch mit chaotropen Substanzen bzw. organischen Lösungsmitteln kombiniert eingesetzt wurden. Die mechanische Probenbehandlung war nur bei den Fast Prep for RNA Kits der Firma BIO 101 vorgesehen. Der Probenaufschluss durch Wärme- bzw. Mikrowellenbehandlung wurde beim Genereleaser von Eurogentec verwendet. Zur Trennung der RNA von unerwünschten Probenbestandteilen setzten 29 Kits Protokolle ein, die auf der sauren Phenol-Chloroform-Extraktion beruhten. 18 Kits basierten auf der selektiven Bindung der RNA an Siliziumverbindungen. Zwei Kits kombinierten die Phenol-Chloroform-Extraktion mit der Bindung der RNA an Siliziumverbindungen. Drei Kits nutzten für den Trennvorgang Anionenaustauscher. Das Purescript RNA Isolierungskit basierte auf der selektiven Salzpräzipitation von Proteinen und DNA. Drei Kits nutzten Lithiumchlorid zur selektiven Fällung der RNA. Bei 12 Kits war es nicht möglich, vollständige Informationen über die verwendeten Methoden zu ermitteln. Fast alle Methoden waren für den universellen Einsatz mit unterschiedlichsten Zellen und Geweben vorgesehen. Manche Kits waren an Flüssigkeiten, Vollblut oder Pflanzen als Probenmaterial speziell adaptiert (**Tabelle 17**).

**Tabelle 17:** Übersicht über in Deutschland Ende 1999 kommerziell erhältliche Kits zu Isolierung von Gesamt- und viraler RNA mit Angaben zu Anbieter, Produktbezeichnung, Verfahren zum Probenaufschluss und zur RNA-Isolierung und zum vorgeschlagenen Probenmaterial

<i>Anbieter</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Probenaufschluss</i>	<i>RNA-Isolierung</i>	<i>Probenmaterial</i>
<b>Ambion the RNA-Company</b>	RNAqueous	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen
	ToTally RNA	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
<b>Amersham (jetzt Amersham Pharmacia Biotech)</b>	REX total RNA extraction kit	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen
	USB DNA/RNA isolation kit	Einsatz chaotroper Reagenzien, Detergentieneinsatz	?	Zellen
<b>Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH</b>	RNAClean	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe
	RNA Clean LS	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	flüssige Proben
	TriStar	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe



<i>Anbieter</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Probenaufschluss</i>	<i>RNA-Isolierung</i>	<i>Probenmaterial</i>
<b>Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH</b>	Tristar LS	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	flüssige Proben
	PCR-Clean	?	?	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
<b>BIO 101</b>	RNaid Kits	Detergentieneinsatz, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion, Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen, Gewebe
	Total RNA Safe Kit	?	?	Zellen, Gewebe
	Fast Prep for RNA Kits	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel, mechanische Behandlung	Phenol-Chloroform-Extraktion, Bindung an Siliziumverbindungen	Bakterien, Hefen, Pilze, Algen, tierisches und pflanzliches Gewebe
<b>Biometra</b>	RNARedKit	Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion,	Vollblutproben
	Optiprep.1 RNA Präparation	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe
<b>Biozym</b>	Purescript RNA Isolierungskit	Detergentieneinsatz	Salzpräzipitation	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
<b>Boehringer Mannheim (jetzt Roche Diagnostics)</b>	TriPure Isolation Reagent	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe, flüssige Proben

<i>Anbieter</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Probenaufschluss</i>	<i>RNA-Isolierung</i>	<i>Probenmaterial</i>
<b>Boehringer Mannheim (jetzt Roche Diagnostics)</b>	High Pure RNA Isolation Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen
	High Pure RNA Tissue Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen, DNase I-Behandlung	Gewebe
	High Pure Viral RNA Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen, Poly A als Hilfssubstanz	flüssige Proben
<b>Clontech</b>	Atlas Pure RNA Isolation Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion, DNase I-Behandlung	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
	Extract-A-Plant RNA Isolation Kit	?	LiCl, selektive Präzipitation	Pflanzen
	Micro-Scale Total RNA Separator	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
	NucleoBond RNA/DNA Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Anionenaustauscher	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
	Nucleo Spin RNA Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
	<b>Dianova</b>	RiboMag Total RNA	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen, Einsatz magnetischer Kügelchen
Ribosol Plus		?	Phenolersatz	Zellen

<i>Anbieter</i>	<i>Produkt- bezeichnung</i>	<i>Probenauf- schluss</i>	<i>RNA- Isolierung</i>	<i>Probenmaterial</i>
<b>Dianova</b>	total RNA Isolation Reagent	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol- Chloroform- Extraktion	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
<b>Eurogentec</b>	Genereleaser	Wärmebe- handlung oder Mikrowellenb ehandlung	Bindung von PCR- Inhibitoren, selektive Freisetzung der RNA	Zellen, flüssige Proben
	RNAInstaPure	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol- Chloroform- Extraktion	Zellen, Gewebe
	RNAInstaPure LS	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol- Chloroform- Extraktion	flüssige Proben
	TRi-InstaPure	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol- Chloroform- Extraktion	Zellen, Gewebe
	TRi-InstaPure LS	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol- Chloroform- Extraktion	flüssige Proben
<b>Gibco-Life Technologies</b>	Trizol Reagent	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol- Chloroform- Extraktion	Zellen, Gewebe

<i>Anbieter</i>	<i>Produkt-bezeichnung</i>	<i>Probenauf-schluss</i>	<i>RNA-Isolierung</i>	<i>Probenmaterial</i>
<b>Gibco-Life Technologies</b>	Trizol LS Reagent	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	flüssige Proben
	GlassMax RNA Micro-isolation System	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen, Gewebe
<b>Invitrek</b>	InviSorbRNA I Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	?	Zellen, Gewebe
	InviSorbRNA II Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	?	Zellen, Gewebe
	InviSorb Twin Prep DNA/RNA Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	?	Zellen, Gewebe
<b>Invitrogen</b>	S.N.A.P. Total RNA-Isolation Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen
<b>Machery&amp;Nagel</b>	NucleoBond RNA/DNA Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Anionen-austauscher	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
	Nucleo Spin RNA Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
<b>NatuTec</b>	EZNA Total RNA Miniprep-Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen, Gewebe, Bakterien
<b>Pan</b>	PAN RNA Kit II	?	?	Zellen, Gewebe
	PAN DNA/RNA Kit	?	?	Zellen, Gewebe
<b>Peqlab</b>	peqGold RNA Pure	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe

<i>Anbieter</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Probenaufschluss</i>	<i>RNA-Isolierung</i>	<i>Probenmaterial</i>
<b>Peqlab</b>	peqGold RNA Pure FL	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	flüssige Proben
	Perfect RNA	?	?	Zellen, Gewebe
	Rapid RNA	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion, Bindung an eine RNA-bindende Substanz	Zellen, Gewebe, flüssige Proben
	TriFast	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe
	TriFast FI	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	flüssige Proben
<b>Pharmacia (jetzt Amersham Pharmacia Biotech)</b>	QuickPrep Total RNA Extraction Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien,	LiCl, selektive Präzipitation, isopygnische Zentrifugation	Zellen, Gewebe, Pflanzen
	RNA Extraction Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien,	LiCl, selektive Präzipitation, isopygnische Zentrifugation	Zellen, Gewebe, Pflanzen
<b>Promega</b>	RNAgents Total RNA-Isolation System	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen, Gewebe, Pflanzen
	SV Total RNA Isolation System	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen, Gewebe

<i>Anbieter</i>	<i>Produktbezeichnung</i>	<i>Probenaufschluss</i>	<i>RNA-Isolierung</i>	<i>Probenmaterial</i>
<b>Qiagen</b>	QIAamp Blood and Tissue Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Blut, Gewebe
	QIAamp HCV Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	virushaltige flüssige Proben (Serum)
	QIAamp Viral RNA Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	virushaltige flüssige Proben
	RNeasy Kits (Mini, Midi, Maxi)	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen, Gewebe, Bakterien, Hefen
	RNeasy Blood Mini Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Vollblut, Zellen, Gewebe, Bakterien, Hefen
	RNeasy Plant Mini Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Pflanzen, Zellen, Gewebe, Bakterien, Hefen
	Qiagen RNA/DNA Kits (Mini, Midi, Maxi)	Einsatz chaotroper Reagenzien	Anionenaustauscher	Zellen, Gewebe
<b>Roth</b>	RothiQuick Kit	Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen; Gewebe
<b>Schleicher&amp; Schuell</b>	Elutip-R	?	Anionenaustauscher	Zellen, Gewebe
<b>Stratagene</b>	RNA Isolation Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Zellen
	Micro RNA Isolation Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien, Einsatz organischer Lösungsmittel	Phenol-Chloroform-Extraktion	Gewebe
<b>Talent</b>	Total Quick RNA Kit	Einsatz chaotroper Reagenzien	Bindung an Siliziumverbindungen	Zellen, Gewebe

? Daten nicht verfügbar

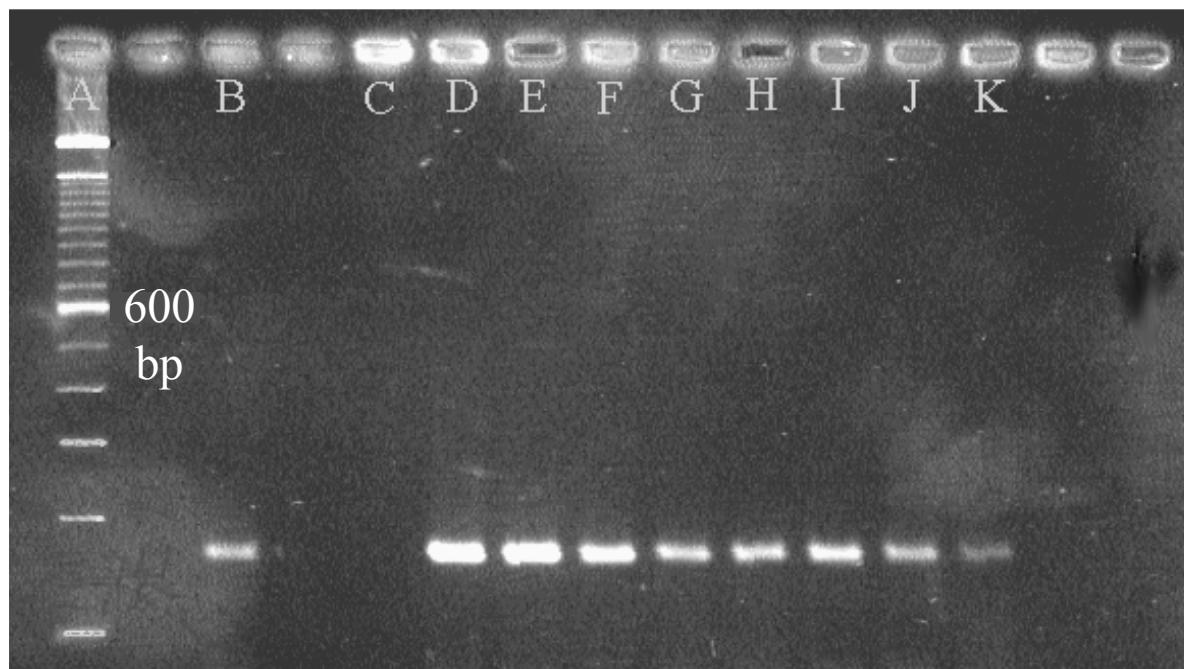
### 4.3.2 Etablierung und Optimierung der Trizol-Standard-Methode zur RNA-Isolierung

Für den Vergleich verschiedener RNA-Isolierungsmethoden mit unterschiedlichen Probenmaterialien sollte auf Basis einer sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des Trizol-Reagens eine universell einsetzbare RNA-Isolierungsmethode etabliert werden, die aus allen verwendeten Probenmaterialien die Gewinnung einer für den Nachweis in der RT-PCR ausreichenden Menge viraler RNA ermöglicht. Dieses als Trizol-Standard-Methode bezeichnete Protokoll wurde mit Zellkulturüberständen, die das NADL-Virus enthielten, und der RT-PCR zum Nachweis von Pestivirusgenomen nach GREISER-WILKE et al. (1995) optimiert.

Zur Steigerung der Nachweisgrenze erfolgte eine schrittweise Optimierung des Protokolls der Trizol-Methode. Als optimal für die Trizol-Standard-Methode erwies sich die im Methodenteil unter 3.5.3. beschriebene Verfahrensweise.

Bei Einsatz von 17D-Virus, NADL und Alfort 187 haltigen Zellkulturüberständen lagen die Nachweisgrenzen in Verbindung mit den unter 4.2. beschriebenen RT-PCRs zum Nachweis des 17D-Virusgenoms bzw. von Pestivirusgenomen mit den Primern BVD 2/3 und Pest 2/3 bei einer  $KID_{50}$ /ml. **Abbildung 4** zeigt exemplarisch die bei Einsatz von KSPV-Stamm Alfort 187 haltigem Zellkulturüberstand mit der RT-PCR zum Nachweis von Pestivirusgenomen unter Verwendung der *Primer* Pest 2/3 erreichte Nachweisgrenze.

**Abbildung 4:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte aus RNA, die mit der Trizol-Standard-Methode aus Verdünnungen Alfort 187 haltigen Zellkulturüberstandes mit kalkulierten Titern gewonnen wurde.



<b>A:</b> 100 bp-Marker	<b>B:</b> positive Kontrolle	<b>C:</b> negative Kontrolle	<b>D:</b> $10^6$ KID <sub>50</sub> /ml
<b>E:</b> $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>F:</b> $10^4$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>G:</b> $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>H:</b> $10^2$ KID <sub>50</sub> /ml
<b>I:</b> 10 KID <sub>50</sub> /ml	<b>J:</b> 1 KID <sub>50</sub> /ml	<b>K:</b> $10^{-1}$ KID <sub>50</sub> /ml	

#### 4.3.3 Erprobung der Trizol-Standard-Methode mit komplexen Probenmaterialien

Anschließend erfolgte die Erprobung mit weiteren 17D-Virus, BVDV und KSPV haltigen Probenmaterialien unter Verwendung der unter 4.2. beschriebenen RT-PCR-Protokolle.

Um die Eignung der Trizol-Standard-Methode zur RNA-Isolierung aus Vollblutproben zu untersuchen, wurden mit EDTA- bzw. Lithiumheparinat gerinnungsgehemmte Blutproben (BVDV-Proben-Nr. 1 und 2) sowie eine KSPV haltige mit EDTA gerinnungsgehemmten Blutprobe (BVDV-Proben-Nr. 1) für die RNA-Isolierung mit der Trizol-Standard-Methode eingesetzt. Aus der isolierten RNA konnte mittels RT-PCR bei Verwendung der Primerpaare BVD 2/3 und Pest 2/3 das jeweilige Virusgenom in der RT-PCR nachgewiesen werden. Ebenso gelang der Nachweis des BVDV-Genoms aus fetalem Kälberserum (BVDV-Proben-Nr. 9 und 10) mit der RT-PCR zum Nachweis von Pestivirusgenomen mit den Primern BVD



2/3 als Beispiel für zellarmes Probenmaterial. Zur Überprüfung der Trizol-Standard-Methode mit Vollmilch kam Vollmilch eines persistent infizierten Rindes (BVDV-Proben-Nr. 5 ) zum Einsatz. Das BVDV-Genom konnte bei Anwendung der *Primer* BVD 2/3 und Pest 2/3 mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die Eignung der Trizol-Standard-Methode für die RNA-Isolierung aus Organmaterial wurde mit KSPV haltigen Lymphknoten, Milz, Tonsille und Hoden (KSPV-Proben-Nr. 2 bis Proben-Nr. 5) untersucht. Das KSPV-Genom konnte aus allen Organproben mit der RT-PCR unter Verwendung der *Primer* Pest 2/3 nachgewiesen werden, wobei in Abhängigkeit von der Viruskonzentration im jeweiligen Organ unterschiedlich starke Banden im Agarosegel sichtbar wurden.

In den durchgeführten Untersuchungen erwiesen sich die Anwendung flüssigen Stickstoffs und des Handhomogenisiergerätes Polytron PT 1200 C (Kinematica AG) für die Aufarbeitung großer Probenzahlen als nicht praktikabel. Das Zerdrücken gefrorenen Organmaterials in Parafilm ermöglichte es nicht, definierte Mengen homogenisierten Materials in die RNA-Isolierung zu überführen. Außerdem wurde teilweise Flüssigkeit aus dem Parafilm herausgedrückt, der die Arbeitsfläche verschmutzte. Beim Handhomogenisiergerät Polytron PT 1200 C bestand durch die eingesetzten Drehzahlen von bis zu 25000 UpM ein hohes Risiko der Bildung von Aerosolen. Wegen der Größe der Geräteanordnung war der Einsatz unter einer Sicherheitswerkbank schwierig. Weiterhin war der Aufwand zur Reinigung des Homogenisierkopfes zwischen zwei Proben sehr hoch. Anstelle des elektrisch betriebenen Homogenisators wurden mit Erfolg Einmal-Mikropistille eingesetzt. Die Effizienz des Homogenisiervorgang war um so besser, je weniger Probenmaterial eingesetzt worden war. Die stärksten Banden im Elektrophoresebild ergaben sich nach Homogenisierung des Materials in Trizol.

#### **4.3.4 Vergleichende Untersuchung der RNA-Isolierungsmethoden**

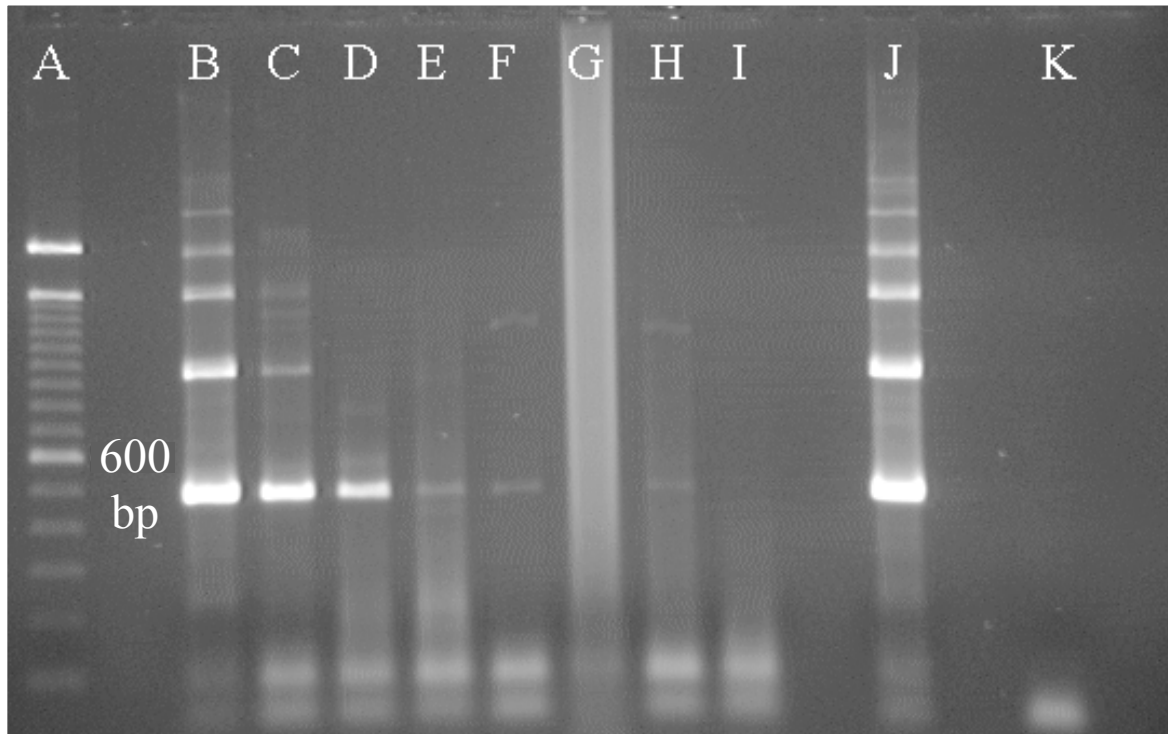
Alle RNA-Isolierungsmethoden wurden mindestens dreimal mit dem entsprechenden Probenmaterial durchgeführt. Die isolierte RNA wurde unmittelbar in die RT-PCR eingesetzt und die Nachweisgrenze in der RT-PCR im gefärbten Agarosegel dokumentiert. Diese variierte bei den Wiederholungen um nicht mehr als eine  $\log_{10}$ -Stufe. Es wird jeweils die

schlechtere Nachweisgrenze in der RT-PCR in den folgenden Ergebnissen genannt und in den Abbildungen dargestellt. Bei fast allen RNA-Isolierungsmethoden fiel die Intensität der PCR-Banden homogen mit absteigender  $KID_{50}/ml$  bzw. Verdünnung des eingesetzten Materials. Bei der Trizol-Standard-Methode und 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand kam es vereinzelt im Bereich unter einer  $KID_{50}/ml$  dazu, dass Banden bei 0,5 oder 0,25  $KID_{50}/ml$  auftraten, die stärker als bei einer  $KID_{50}/ml$  waren. Da bis zu einer  $KID_{50}/ml$  der Abfall homogen und die mituntersuchten negativen Kontrollen kein PCR-Produkt aufwiesen, wurden diese Ansätze nicht wiederholt, da als Ursache nicht Kontamination sondern eher Amplifikation im Bereich der Nachweisgrenze in der RT-PCR beim sporadischen Auftreten vereinzelter Virusmoleküle als Ursache angenommen wurde.

#### **4.3.5 Vergleich der unterschiedlichen RNA-Isolierungsmethoden aus 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand**

Mit der **Trizol-Standard-Methode** isolierte RNA ergab in der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms eine Nachweisgrenze von unter einer  $KID_{50}/ml$ . Im Elektrophoresebild fielen gelegentlich bei den höheren Konzentrationen unspezifische Banden bei 900 und 1500 bp auf (**Abbildung 5**). Der Zeitaufwand für die Isolierung von RNA aus 8 Proben betrug etwa 4 h und 30 min. Die Kosten für eine RNA-Isolierung betrugen etwa 4,35 DM. Als besondere materiell-technische Anforderungen wurden eine Zentrifugiermöglichkeit bei 4 °C, ein Abzug sowie spezielle Behälter für den Gefahrgutabfall benötigt (**Tabelle 18**).

**Abbildung 5:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte aus RNA, die mit der Trizol-Standard-Methode aus Verdünnungen 17D-Virus haltigen Zellkulturüberstandes gewonnen wurde.



<b>A:</b> 100 bp-Marker	<b>B:</b> $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>C:</b> $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>D:</b> $10^2$ KID <sub>50</sub> /ml
<b>E:</b> 10 KID <sub>50</sub> /ml	<b>F:</b> 1 KID <sub>50</sub> /ml	<b>G:</b> 0,5 KID <sub>50</sub> /ml	<b>H:</b> 0,25 KID <sub>50</sub> /ml
<b>I:</b> negative Kontrolle	<b>J:</b> positive Kontrolle	<b>K:</b> DEPC-Wasser	

Um die Zeit des Präzipitationsschrittes einzusparen, wurde die **Trizol-Standard-Methode mit RNABind**, einem RNA bindenden Harz, kombiniert. Mit der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms wurde eine Nachweisgrenze von  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml erreicht. Unspezifische Banden traten nicht auf. Von der Handhabung erwies sich **RNABind** als schwierig. Beim Abnehmen von Überständen nach Zentrifugation wurde sehr leicht das Sediment zerstört. Beim Resuspendieren in DNase-/RNase-freiem Wasser bildete sich eine Art Haut auf der Oberfläche, so dass RNABind trotz vorherigem Anzentrifugieren in den RT-Ansatz mitgenommen wurde. Für die Isolierung von 8 Proben wurden etwa 2 h 30 min benötigt. Die

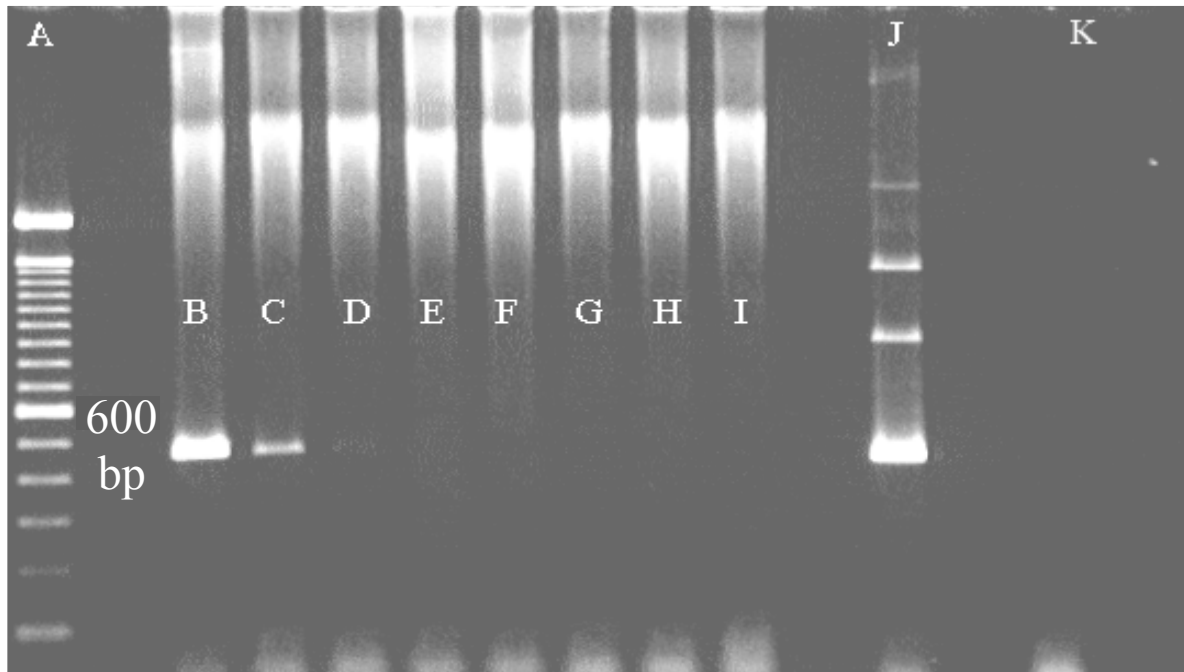
Kosten für eine RNA-Isolierung lagen bei 5,05 DM. Es waren dieselben zusätzlichen Geräte wie bei der Trizol-Standard-Methode erforderlich (**Tabelle 18**).

Im Hinblick auf den Einsatz der **Trizol-Standard-Methode** mit Materialien, die größere Mengen Inhibitoren enthalten, wurde der **Einsatz von Genereleaser** erprobt. Es handelt sich dabei um ein vom Hersteller nicht näher spezifiziertes Material, das nicht entfernte Inhibitoren binden soll. Die Nachweisgrenze in der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms betrug 10 KID<sub>50</sub>/ml. Die unspezifischen Banden bei 900 und 1500 bp waren im Elektrophoresebild fast nicht erkennbar. Der Preis für eine RNA-Isolierung lag bei etwa 5,20 DM. Die gerätetechnischen Anforderungen entsprachen denen der Trizol-Standard-Methode (**Tabelle 18**).

Mit dem **RNeasy Mini Kit** isolierte RNA ergab in der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms eine Nachweisgrenze von 10<sup>3</sup> KID<sub>50</sub>/ml. Im Elektrophoresebild war nur die spezifische Bande erkennbar. Der Zeitaufwand für die Isolierung von RNA aus 8 Proben betrug etwa 2 h. Die Kosten für eine RNA-Isolierung betragen etwa 8,10 DM. Besondere zusätzliche Geräte wurden nicht benötigt (**Tabelle 18**).

Bei der RNA-Isolierung mit dem **QIAamp Viral RNA-Kit** lag die Nachweisgrenze der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms bei 10<sup>2</sup> KID<sub>50</sub>/ml. Die entsprechende Bande war im Elektrophoresebild stets nur sehr schwach erkennbar. Im höhermolekularen Bereich erstreckte sich bis zu den Geltaschen ein stark leuchtender Hintergrund (**Abbildung 6**). Für die Isolierung von 8 Proben wurden etwa 2 h benötigt. Eine RNA-Isolierung kostete etwa 6,45 DM. Als zusätzliche Geräte wurden ein Wasserbad mit 80 °C und ein Wärmeschrank mit 80 °C benötigt (**Tabelle 18**).

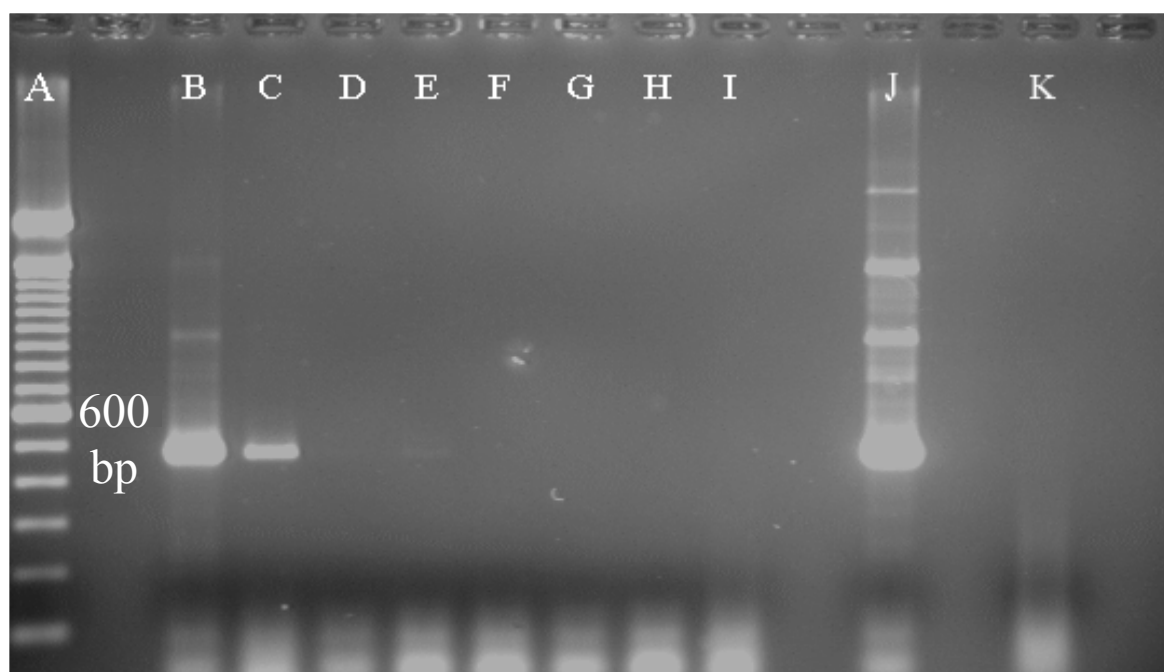
**Abbildung 6:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte aus RNA, die mit dem QIAamp Viral RNA Kit aus Verdünnungen 17D-Virus haltigen Zellkulturüberstandes gewonnen wurde.



<b>A:</b> 100 bp-Marker	<b>B:</b> $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>C:</b> $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>D:</b> $10^2$ KID <sub>50</sub> /ml
<b>E:</b> 10 KID <sub>50</sub> /ml	<b>F:</b> 1 KID <sub>50</sub> /ml	<b>G:</b> 0,5 KID <sub>50</sub> /ml	<b>H:</b> 0,25 KID <sub>50</sub> /ml
<b>I:</b> negative Kontrolle	<b>J:</b> positive Kontrolle	<b>K:</b> DEPC-Wasser	

Wurde das **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit** für die RNA-Isolierung eingesetzt, konnte mit der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms bis zu einem kalkulierten Virustiter von  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml ein positives Signal detektiert werden. Bei einem Titer von  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml wurde bei etwa 900 bp eine unspezifische Bande festgestellt (**Abbildung 7**). Der Zeitaufwand für die Isolierung von 8 Proben betrug etwa 1 h und 30 min. Der Preis für eine RNA-Isolation belief sich auf etwa 7,75 DM. Zusätzliche Geräte wurden nicht benötigt (**Tabelle 18**).

**Abbildung 7:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte aus RNA, die mit dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit aus Verdünnungen 17D-Virus haltigen Zellkulturüberstandes gewonnen wurde.



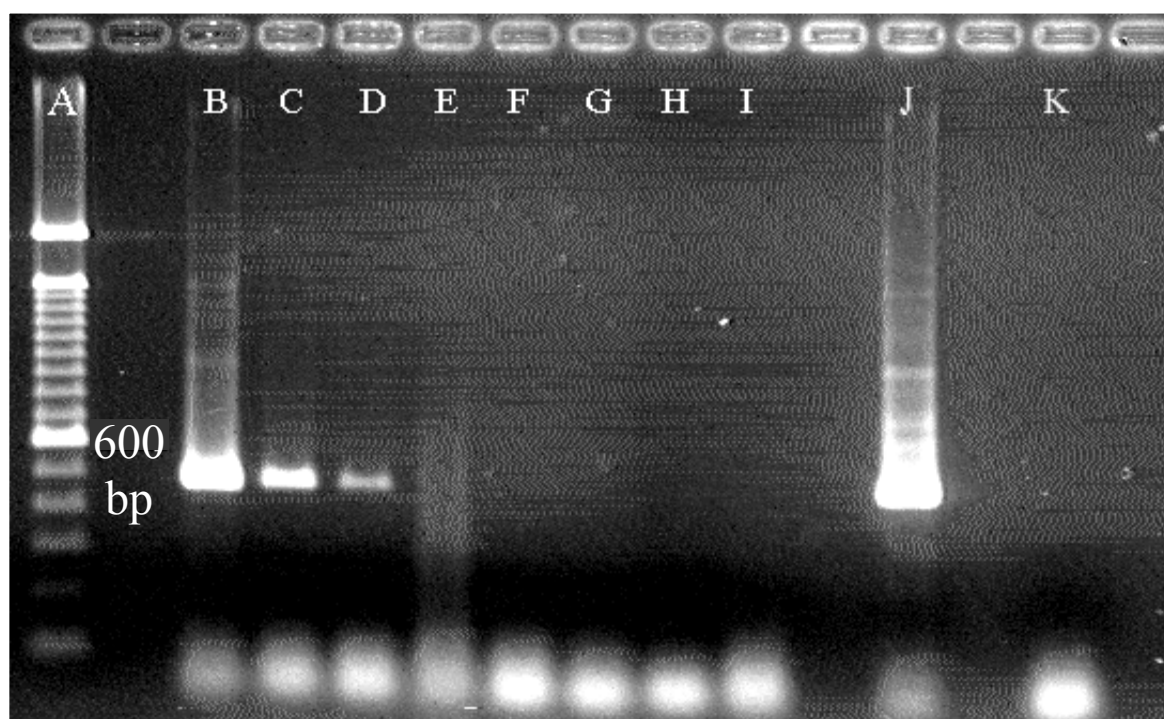
**A:** 100 bp-Marker      **B:**  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml      **C:**  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml      **D:**  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml  
**E:** 10 KID<sub>50</sub>/ml      **F:** 1 KID<sub>50</sub>/ml      **G:** 0,5 KID<sub>50</sub>/ml      **H:** 0,25 KID<sub>50</sub>/ml  
**I:** negative Kontrolle    **J:** positive Kontrolle    **K:** DEPC-Wasser

Um die Nachweisgrenze in der RT-PCR zu steigern, wurde der Puffer RA 1 des **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit** durch den vom Hersteller zusätzlich gelieferten Poly A haltigen **Puffer RAV** ersetzt. Bei Einsatz der isolierten RNA in der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms betrug die Nachweisgrenze  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml. Im höhermolekularen Bereich erstreckte sich im Agarosegel wie beim **QIAamp Viral RNA-Kit** ein bis zu den Geltaschen reichender stark leuchtender Hintergrund. Für die Isolierung von 8 Proben war ein Aufwand von etwa 1 h und 30 min nötig. Die Kosten betragen etwa 7,75 DM. Besondere zusätzliche Geräte waren nicht erforderlich (**Tabelle 18**).

Außerdem wurde das **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit** mit Zusatz von **Bäckerhefe-RNA** erprobt. Die Nachweisgrenze der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms lag regelmäßig bei  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml (**Abbildung 8**). Sporadisch war auch bei 10 KID<sub>50</sub>/ml eine

schwache Bande im Elektrophoresebild sichtbar. Unspezifische Banden traten nicht auf. Der Preis für eine RNA-Isolierung betrug 7,95 DM. Es waren keine zusätzlichen Geräte erforderlich. (Tabelle 18)

**Abbildung 8:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte aus RNA, die mit dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit unter Zusatz von RNA aus Bäckerhefe aus Verdünnungen 17D-Virus haltigen Zellkulturüberstandes gewonnen wurde.



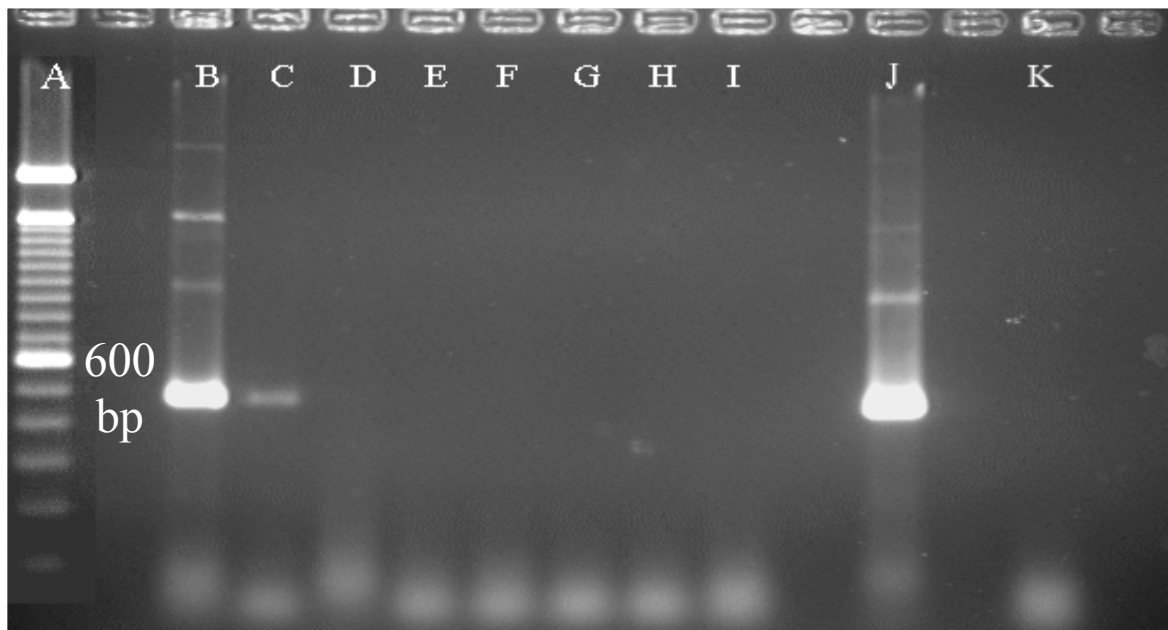
<b>A:</b> 100 bp-Marker	<b>B:</b> $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>C:</b> $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>D:</b> $10^2$ KID <sub>50</sub> /ml
<b>E:</b> 10 KID <sub>50</sub> /ml	<b>F:</b> 1 KID <sub>50</sub> /ml	<b>G:</b> 0,5 KID <sub>50</sub> /ml	<b>H:</b> 0,25 KID <sub>50</sub> /ml
<b>I:</b> negative Kontrolle	<b>J:</b> positive Kontrolle	<b>K:</b> DEPC-Wasser	

Inzwischen ist das Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit vom Hersteller durch das **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** mit einem geringfügig veränderten Protokoll und zusätzlichem DNA-Abbau mittels DNase I ersetzt worden. Mit diesem Kit lag die Nachweisgrenze der RT-PCR für das 17D-Virusgenom bei  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml. Die Intensität der Banden im Agarosegel entsprach denen beim Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit. Unspezifische Banden wurden nicht festgestellt. Der Zeitaufwand für die Isolierung von 8 Proben erhöhte sich durch die DNase I-Behandlung auf etwa 1 h und 50 min. Der Preis für

eine RNA-Isolation blieb gegenüber dem Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit mit 7,75 DM unverändert (**Tabelle 18**).

Bei Einsatz der mit dem **Purescript-Kit** isolierten RNA in die RT-PCR für das 17D-Virusgenom lag die Nachweisgrenze bei  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml, wobei die entsprechende Bande im Elektrophoresebild stets sehr schwach gewesen ist (**Abbildung 9**). Der Zeitaufwand für die Isolierung von 8 Proben betrug etwa 2 h. Eine RNA-Isolierung kostete etwa 3,85 DM. Als zusätzliches Gerät war ein Wasserbad mit einer Temperatur von 65 °C erforderlich (**Tabelle 18**).

**Abbildung 9:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte aus RNA, die mit dem Purescript Kit aus Verdünnungen 17D-Virus haltigen Zellkulturüberstandes gewonnen wurde



<b>A:</b> 100 bp-Marker	<b>B:</b> $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>C:</b> $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>D:</b> $10^2$ KID <sub>50</sub> /ml
<b>E:</b> 10 KID <sub>50</sub> /ml	<b>F:</b> 1 KID <sub>50</sub> /ml	<b>G:</b> 0,5 KID <sub>50</sub> /ml	<b>H:</b> 0,25 KID <sub>50</sub> /ml
<b>I:</b> negative Kontrolle	<b>J:</b> positive Kontrolle	<b>K:</b> DEPC-Wasser	

**Tabelle 19** faßt die mit den einzelnen Methoden/ Kits in der RT-PCR erreichten Nachweisgrenzen zusammen.



**Tabelle 18:** Übersicht über Zeit-, Kosten- und Geräteaufwand sowie Anzahl an Pipettierschritten bei den einzelnen RNA-Isolierungsmethoden

<i> Methode </i>	<i> Zeit für 8 Proben </i>	<i> Anzahl Pipettierschritte </i>	<i> Anzahl an Zentrifugationen </i>	<i> zusätzlich benötigte Geräte </i>	<i> Kosten für eine RNA-Isolierung </i>
<b>Trizol-Standard-Methode</b>	4h30min	12	5	Zentrifuge bei 4 °C Abzug Gefahrstoff-behälter	4,35 DM
<b>Trizol-Standard-Methode mit RNABind</b>	2h30min	13	6	Zentrifuge bei 4 °C Abzug Gefahrstoff-behälter	5,05 DM
<b>Trizol-Standard-Methode und Genereleaser</b>	4h40min	13	5	Zentrifuge bei 4 °C Abzug Gefahrstoff-behälter	5,20 DM
<b>Rneasy Mini Kit</b>	2h	10	6	-	8,10 DM
<b>QIAamp Viral RNA-Kit</b>	2h	8	5	80 °C Wasserbad 80 °C Trockenschrank	6,45 DM
<b>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA Kit</b>	1h30min	9	6	-	7,75 DM
<b>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA mit PufferRAV</b>	1h30min	9	6	-	7,75 DM
<b>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA mit Hefen RNA</b>	1h35min	10	6	-	7,95 DM
<b>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II Kit</b>	1h50min	10	6		7,75 DM
<b>Purescript-Kit</b>	2h	9	5	65° C Wasserbad	3,85 DM

**Tabelle 19:** Zusammenfassende Darstellung der mit den einzelnen RNA-Isolierungsmethoden in der RT-PCR zur Amplifikation des 17D-Virusgenoms erreichten Nachweisgrenzen

<i>Method</i>	<i>Nachweisgrenze (KID<sub>50</sub>/ml)</i>							
	<i>10<sup>5</sup></i>	<i>10<sup>3</sup></i>	<i>10<sup>2</sup></i>	<i>10<sup>1</sup></i>	<i>1</i>	<i>0,5</i>	<i>0,25</i>	<i>negativ</i>
<b>Trizol-Standard-Methode</b>	+++	+++	+++	+++	+	+/-	+/-	-
<b>Trizol-Standard-Methode mit RNABind</b>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<b>Trizol-Standard-Methode und Genereleaser</b>	+++	++	++	+	-	-	-	-
<b>Rneasy Mini Kit</b>	+++	+	-	-	-	-	-	-
<b>QIAamp Viral RNA-Kit</b>	+++	+	+/-	-	-	-	-	-
<b>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA Kit</b>	+++	++	-	-	-	-	-	-
<b>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA mit PufferRAV</b>	+++	+	-	-	-	-	-	-
<b>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA mit Hefen RNA</b>	+++	++	+	+/-	-	-	-	-
<b>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II Kit</b>	+++	++	-	-	-	-	-	-
<b>Purescript-Kit</b>	++	+	-	-	-	-	-	-

#### 4.3.6 Komplexe Probenmaterialien

Zur RNA-Isolierung aus den komplexen Probenmaterialien Vollblut, Milch, Sperma und Seminalplasma, autoklaviertes Abwasser und Lebergewebe wurden die Trizol-Standard-Methode, das Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit sowie teilweise das Purescript-Script Kit der Firma Biozym mit und ohne Modifikationen vergleichend eingesetzt. Die auf der sauren Guanidinisothiozyanat- Phenol-Chloroformextraktion beruhende **Trizol-Standard-Methode** erbrachte im Hinblick auf die Nachweisgrenze in der RT-PCR die besten Ergebnisse, wobei teilweise unspezifische Banden in der Elektrophorese sichtbar waren.

Mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit**, das auf der Bindung von Nukleinsäuren an Glasmaterial beruht, gelang aus allen Probenmaterialien mit Ausnahme von Sperma und Seminalplasma ein Nachweis der jeweiligen Virusgenome. Die Nachweisgrenze in der RT-PCR war jedoch um bis zu 3 Zehnerpotenzen schlechter als bei der Trizol-Standard-Methode. Es traten bei Verwendung der mit diesem Kit isolierten RNA sporadisch wenige unspezifische Banden auf.

Das **Purescript-Kit** der Firma Biozym, das auf Salzpräzipitation der Proteine und DNA und anschließender Isopropanolfällung der RNA beruht, erbrachte mit den komplexen Probenmaterialien die schlechtesten Resultate. Bei Einsatz des Originalprotokolls wurden gefällte Probenbestandteile teilweise mit in die RNA-Präparation überführt. Es kam zu sporadischen Ausfällen der PCR und die RT-PCR-Ergebnisse waren nicht reproduzierbar. Nach **Modifikation** des Originalprotokolls des **Purescript-Kits** in Hinblick auf verlängerte Zentrifugations- und Präzipitationszeiten waren die Ergebnisse reproduzierbar. Nur aus unverdünntem BVDV-haltigem EDTA-Vollblut gelang der Nachweis des BVDV-Genoms in der RT-PCR. Bei allen übrigen Probenmaterialien waren die RT-PCR-Ergebnisse bei Einsatz der mit diesem Kit isolierten RNA stets negativ. Wegen der schlechten Handhabbarkeit und der geringen Nachweisgrenze in der RT-PCR wurde die auf dem Purescript-Kit beruhenden Methoden für die vergleichenden Untersuchungen der RNA-Isolierung aus künstlich mit 17D-Virus kontaminierten Vollblutproben, autoklaviertem Abwasser und BVDV haltigem Lebergewebehomogenisat nicht mehr eingesetzt.

Eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse mit künstlich kontaminierten Probenmaterialien findet sich in **Tabelle 20** und mit klinischen Probenmaterialien in **Tabelle 21**. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

**Tabelle 20:** Nachweisgrenzen in der RT-PCR nach RNA-Isolierung aus künstlich kontaminierten komplexen Probenmaterialien

<i>Probenmaterial</i>	<i>Trizol-Standard-Methode</i>	<i>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II Kit</i>	<i>Purescript Herstellerprotokoll</i>	<i>Purescript modifiziert</i>
<b>Vollblut EDTA</b> künstlich kontaminiert mit 17D-Virus	10 <sup>2</sup> KID <sub>50</sub> /ml unspez. Amp.	10 <sup>5</sup> KID <sub>50</sub> /ml	nicht untersucht	nicht untersucht
<b>Vollblut Heparin</b> künstlich kontaminiert mit 17D-Virus	negativ	10 <sup>5</sup> KID <sub>50</sub> /ml	nicht untersucht	nicht untersucht
<b>autoklaviertes Abwasser</b> künstlich kontaminiert mit 17D-Virus	10 <sup>3</sup> KID <sub>50</sub> /ml unspez. Amp.	10 <sup>5</sup> KID <sub>50</sub> /ml unspez. Amp.	nicht untersucht	nicht untersucht
<b>Vollsperma</b> künstlich kontaminiert mit dem KSPV-Stamm Alfort 187	10 <sup>2</sup> KID <sub>50</sub> /ml	negativ wenig unspez. Amp.	nicht untersucht	negativ viel unspez. Amp.
<b>Seminalplasma</b> künstlich kontaminiert mit dem KSPV-Stamm Alfort 187	10 <sup>2</sup> KID <sub>50</sub> /ml	negativ wenig unspez. Amp.	nicht untersucht	negativ viel unspez. Amp.

**Tabelle 21:** Nachweisgrenzen in der RT-PCR nach RNA-Isolierung aus komplexen klinischen Proben

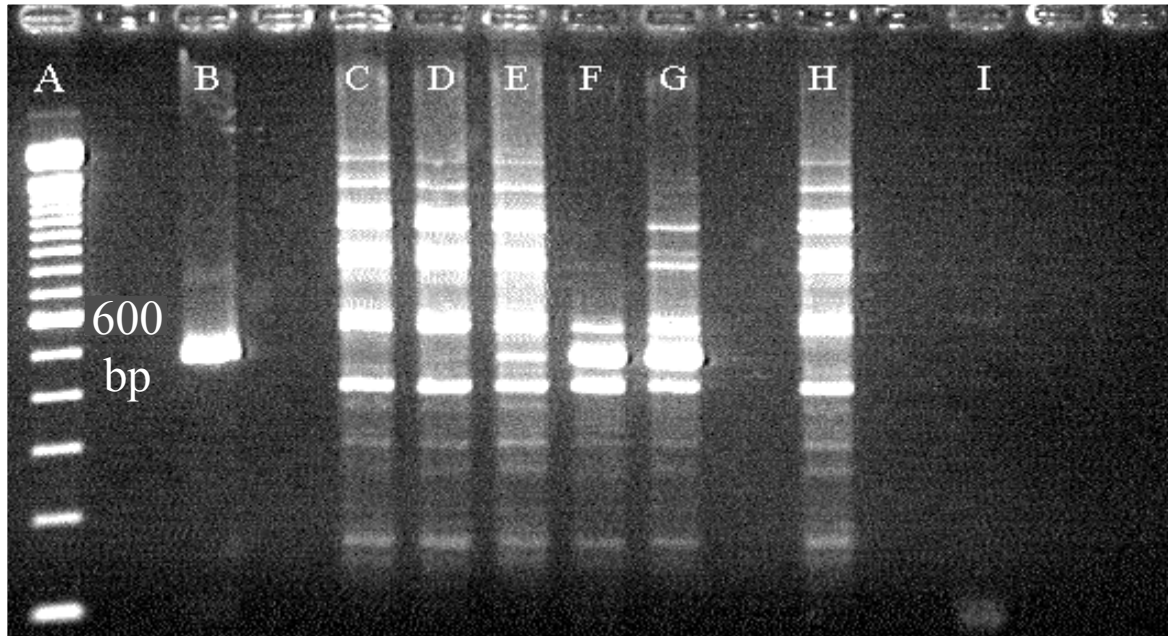
<i>Probenmaterial</i>	<i>Trizol-Standard-Methode</i>	<i>Machery&amp;Nagel Nucleo Spin RNA II Kit</i>	<i>Purescript Herstellerprotokoll</i>	<i>Purescript modifiziert</i>
<b>Vollblut EDTA,</b> BVDV haltig	$10^{-4}$ unspez. Amp.	$10^{-1}$	nicht reproduzierbar	unverdünnt
<b>Vollblut Heparin,</b> BVDV haltig	unverdünnt	$10^{-1}$	nicht reproduzierbar.	negativ
<b>Vollmilch,</b> BVDV haltig	$10^{-3}$	unverdünnt	negativ sehr wenig unspez. Amp.	negativ sehr wenig unspez. Amp.
<b>Vollmilch konserviert</b> mit Natriumazid, BVDV haltig	$10^{-3}$	unverdünnt	nicht untersucht	nicht untersucht
<b>Lebergewebe,</b> BVDV haltig	$10^{-3}$ unspez. Amp.	$10^{-2}$ sehr wenig unspez. Amp.	nicht untersucht	nicht untersucht

#### 4.3.7 Vollblutproben

##### 4.3.7.1 Mit 17D-Virus künstlich kontaminierte Vollblutproben

Aus mit **17D-Virus** künstlich kontaminiertem **Blut**, das mit **EDTA** gerinnungsgehemmt war, konnte mit der **Trizol-Standard-Methode** bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml ein spezifisches RT-PCR-Produkt festgestellt werden. Gleichzeitig traten mehrere unspezifische Banden auf, die jedoch auch im nicht 17D-Virus haltigen Material detektiert werden konnten (**Abbildung 10**).

**Abbildung 10:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mittels Trizol-Standard-Methode aus 17D-Virus haltigem EDTA-Blut.



**A:** 100 bp-Marker      **B:** positive Kontrolle      **C:** 1 KID<sub>50</sub>/ml      **D:** 10 KID<sub>50</sub>/ml  
**E:** 10<sup>2</sup> KID<sub>50</sub>/ml      **F:** 10<sup>3</sup> KID<sub>50</sub>/ml      **G:** 10<sup>5</sup> KID<sub>50</sub>/ml      **H:** negative Kontrolle  
**I:** DEPC-Wasser

Mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** gelang der Nachweis des 17D-Virusgenoms aus **Blut**, das mit **17D-Virus** künstlich kontaminiert und mit **EDTA** gerinnungsgehemmt war, bis zu einem kalkulierten Titer von 10<sup>5</sup> KID<sub>50</sub>/ml. Dabei traten keine unspezifischen Banden auf.

Bei Einsatz von mit **Lithiumheparinat** gerinnungsgehemmten **Blut**, das mit **17D-Virus** künstlich kontaminiert worden war, konnte mit der **Trizol-Standard-Methode** nur einmal das **17D-Virusgenom** bis zu einem kalkulierten Titer von 10<sup>5</sup> KID<sub>50</sub>/ml in der RT-PCR nachgewiesen werden. Bei den Wiederholungen war das RT-PCR-Ergebnis stets negativ. Unspezifische Banden wurden nicht festgestellt.

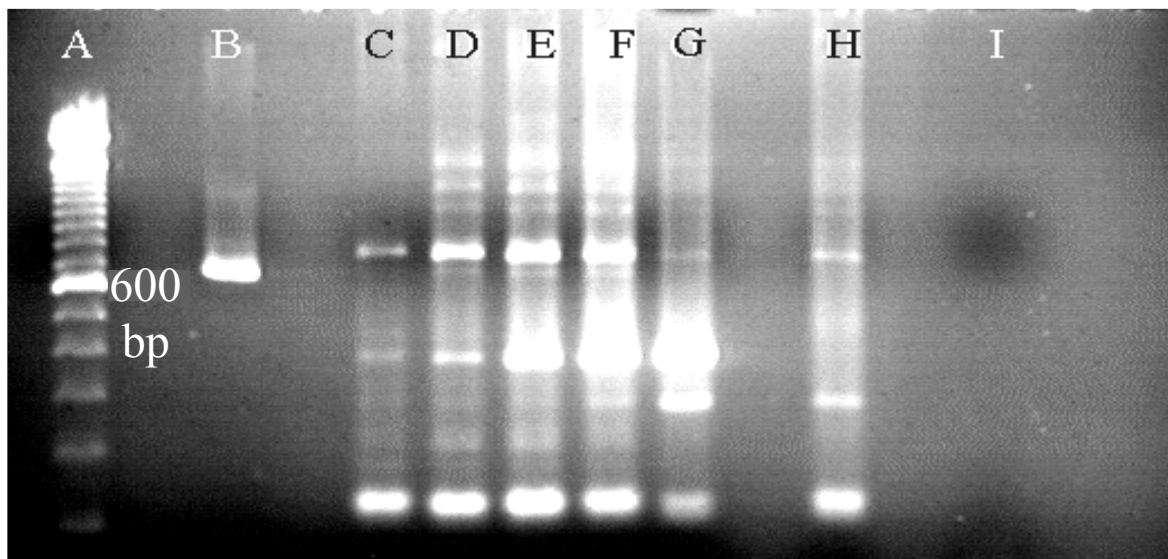
Mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** wurde eine Nachweisgrenze von 10<sup>5</sup> KID<sub>50</sub>/ml nach Isolierung der RNA aus **17D-Virus haltigem Lithiumheparinat-Blut** erreicht. Unspezifische Banden traten nicht auf.

#### 4.3.7.2 BVDV haltige Vollblutproben

Zusätzlich zu den künstlich kontaminierten Vollblutproben wurde Blut von einem persistent mit BVDV infizierten Tier für die Untersuchungen verwendet.

Aus **BVDV haltigem EDTA-Blut** konnte bis zu einer Verdünnung von  $10^{-4}$  das **BVDV-Genom** nach Isolierung mit der **Trizol-Standard-Methode** nachgewiesen werden, wobei im Elektrophoresebild wie bei dem mit 17D-Virus künstlich kontaminiertem Blut unspezifische Banden auftraten (**Abbildung 11**).

**Abbildung 11:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mittels Trizol-Standard-Methode aus BVDV haltigem EDTA-Blut



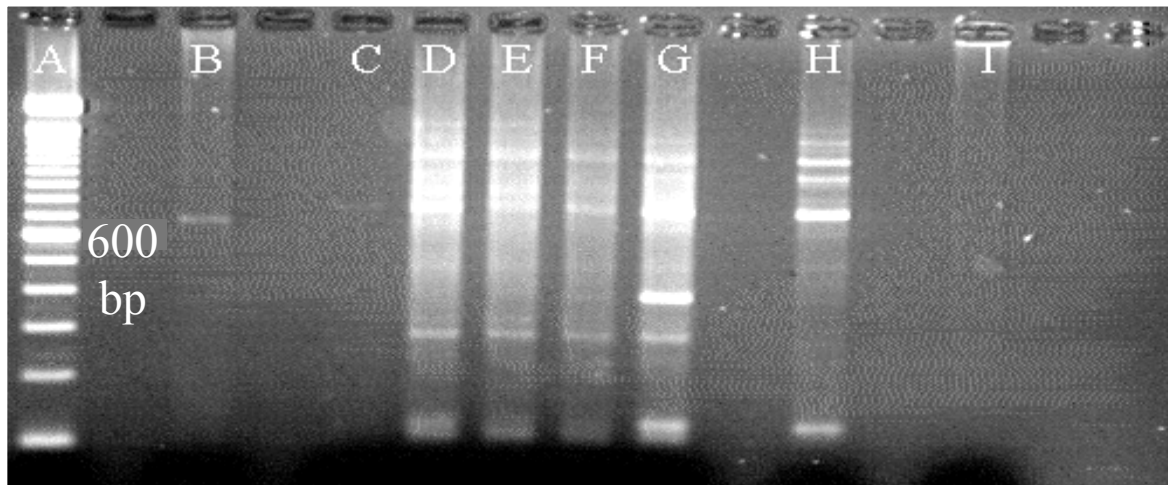
<b>A:</b> 100 bp-Marker	<b>B:</b> positive Kontrolle	<b>C:</b> 1:10000	<b>D:</b> 1:1000
<b>E:</b> 1:100	<b>F:</b> 1:10	<b>G:</b> unverdünnt	<b>H:</b> negative Kontrolle
<b>I:</b> DEPC-Wasser			

Mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** war ein Nachweis des BVDV-Genoms aus **BVDV haltigem EDTA-Blut** bis zu einer Verdünnung von  $10^{-1}$  mittels RT-PCR möglich. Unspezifische Banden wurden nicht festgestellt.

Der Einsatz der **Purescript-Methode** erwies sich bei **BVDV haltigem EDTA-Blut** als problematisch. Es gelangten wegen mangelnder Konsistenz bzw. nicht ausreichender Sedimentierung Teile des gefällten Probenmaterials in den Überstand. Weiterhin lösten sich die RNA-Sedimente nach dem Waschschrift teilweise auf. Es wurden nur sehr inkonsistente Ergebnisse in der RT-PCR erzielt, wobei nur vereinzelt positive Ergebnisse beobachtet werden konnten. Trotz mehrmaliger Wiederholungen kam es zu keiner Verbesserung der Ergebnisse.

Daraufhin wurde die **Purescript-Methode** durch Verlängerung von Zentrifugations- und Präzipitationszeiten **modifiziert**. Es kam danach teilweise zur Hämolyse und Überführung des roten Farbstoffes in die Isopropanolfällung. Durch vorsichtigeres Umschütteln konnte die Hämolyse vermieden werden. Die Sedimente nach Isopropanolfällung waren schlecht in DNase-/RNase-freiem Wasser löslich. Nach der **Modifikation der Purescript-Methode** gelang der reproduzierbare Nachweis des **BVDV-Genoms** nur aus unverdünntem EDTA-Vollblut (**Abbildung 12**).

**Abbildung 12:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mit der modifizierten Purescript-Methode aus BVDV haltigem EDTA-Blut



**A:** 100 bp-Marker  
**E:** 1:100  
**I:** DEPC-Wasser

**B:** positive Kontrolle  
**F:** 1:10

**C:** 1:10000  
**G:** unverdünnt

**D:** 1:1000  
**H:** negative Kontrolle



Aus **BVDV haltigem mit Lithiumheparinat gerinnungsgehemmten Blut** konnte nach Isolierung mit der **Trizol-Standard-Methode** nur aus unverdünntem Lithiumheparinat-Blut das BVDV-Genom nachgewiesen werden. Unspezifische Banden traten nicht auf.

Mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** wurde das BVDV-Genom aus **BVDV-haltigem Lithiumheparinat-Blut** mittels RT-PCR bis zu einer Verdünnung von  $10^{-1}$  nachgewiesen, wobei im Elektrophoresebild nur das spezifische Amplifikat sichtbar war.

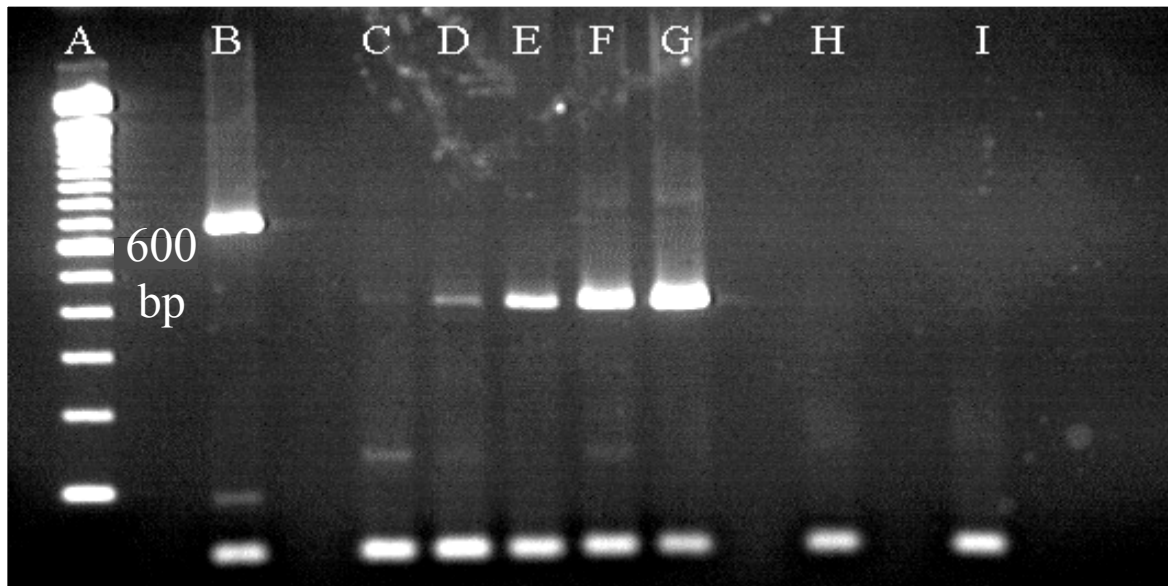
Auch bei **BVDV haltigem Lithiumheparinat-Blut** erwies sich der Einsatz der **Purescript-Methode** als problematisch. Bei PCR-Ergebnisse waren wie bei EDTA-Blut inkonsistent. Positive Banden traten gelegentlich im Elektrophoresebild bis zu einer Verdünnung von  $10^{-2}$  auf.

Nach Einsatz des **modifizierten Purescript-Protokolles** kam es vor dem Isopropanolschritt vereinzelt zu Hämolysen. Es war nicht möglich, mit dem modifizierten Purescript-Protokoll das BVDV-Genom aus **BVDV-haltigem Lithiumheparinat-Blut** mittels RT-PCR nachzuweisen.

#### 4.3.8 Vollmilch

Mit der **Trizol-Standard-Methode** konnte das BVDV-Genom mittels RT-PCR unter Verwendung der *Primer BVD 2/3* bis zu einer Verdünnung von  $10^{-3}$  aus **BVDV haltiger Vollmilch** nachgewiesen werden (**Abbildung 13**).

**Abbildung 13:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mittels Trizol-Standard-Methode aus BVDV haltiger Vollmilch.



**A:** 100 bp-Marker      **B:** positive Kontrolle      **C:** 1:10000      **D:** 1:1000  
**E:** 1:100      **F:** 1:10      **G:** unverdünnt      **H:** negative Kontrolle  
**I:** DEPC-Wasser

Bei Einsatz des **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kits** war das Ergebnis der RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren nur aus unverdünnter **BVDV haltiger Vollmilch** positiv. Unspezifische Banden traten nicht auf.

Mit der **Purescript-Methode** konnte kein positives RT-PCR-Signal aus **BVDV haltiger Vollmilch** detektiert werden.

Bei Einsatz der **modifizierten Purescript-Methode** gelang einmal der Genomnachweis aus unverdünnter **BVDV-positiver Vollmilch**. Bei den Wiederholungen war das Ergebnis jedoch stets negativ.

Im Elektrophoresebild waren bei Einsatz der mit dem **Purescript-Kit** isolierten RNA schwache unspezifische Banden sichtbar.

#### 4.3.9 Vollmilch konserviert

Aus Verdünnungen mit **Natriumazid konservierter BVDV haltiger Milch** wurde mittels **Trizol-Standard-Methode** und **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** RNA isoliert und mittels RT-PCR unter Verwendung der Primern BVD 2/3 amplifiziert.

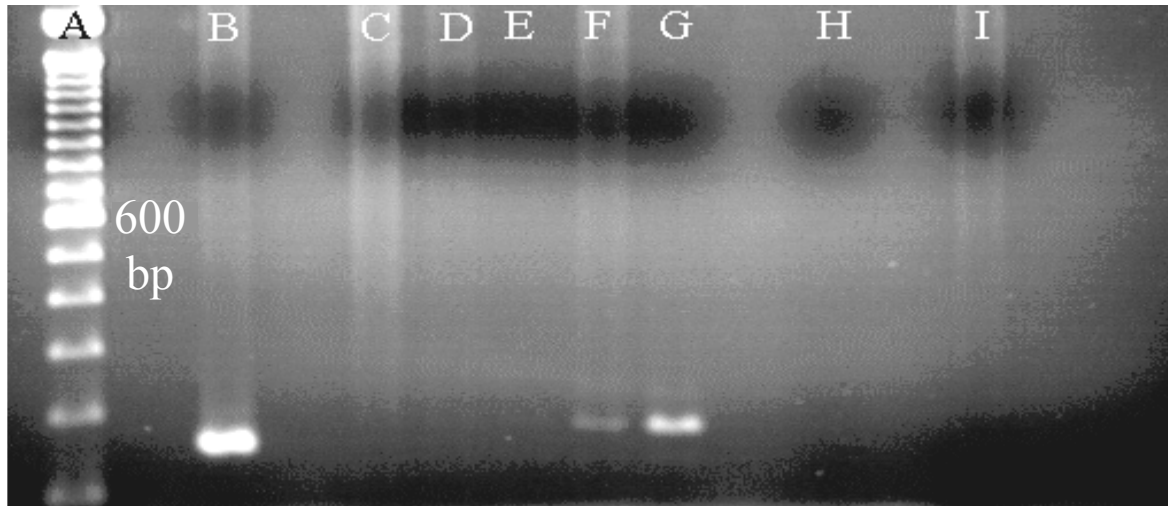
Mit der **Trizol-Standard-Methode** gelang aus mit **Natriumazid konservierter BVDV haltiger Milch** der Nachweis des BVDV-Genoms bis zu einer Verdünnung von  $10^{-3}$ . Im Elektrophoresebild waren nur die spezifischen Banden sichtbar.

Mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** konnte nur aus unverdünnter **mit Natriumazid konservierter Vollmilch** ein positives RT-PCR-Signal erhalten werden. Unspezifische Banden traten nicht auf.

#### 4.3.10 Sperma und Seminalplasma

Mit der **Trizol-Standard-Methode** konnte aus **Vollsperma** mittels RT-PCR das Alfort/187 - Genom bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml nachgewiesen werden. Aus Seminalplasma gelang ebenfalls ein Nachweis bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml. Unspezifische Amplifikate traten nicht auf (**Abbildung 14**).

**Abbildung 14:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mittels Trizol-Standard-Methode aus künstlich mit dem KSPV-Stamm Alfort 187 kontaminiertem Ebersperma.

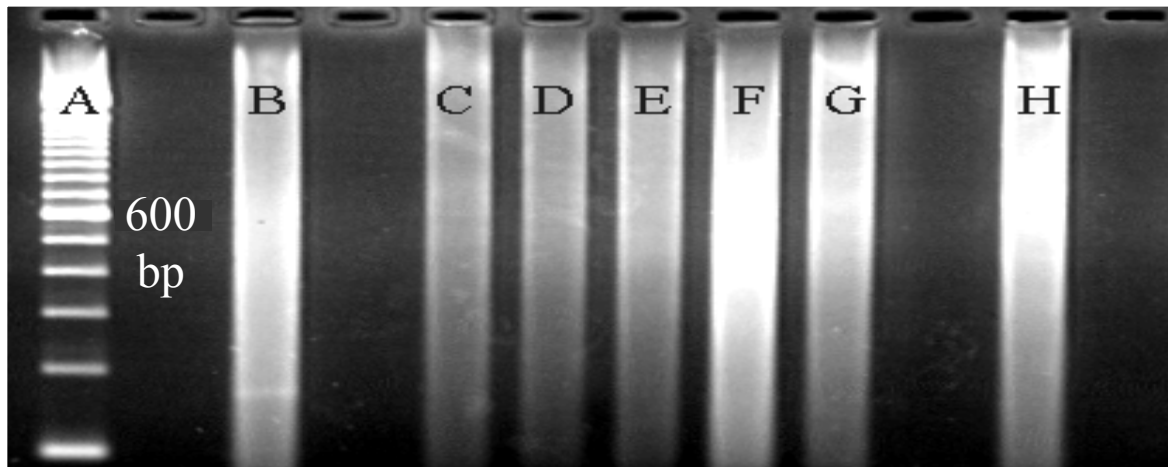


**A:** 100 bp-Marker      **B:** positive Kontrolle      **C:**  $10^{-1}$  KID<sub>50</sub>/ml      **D:** 1 KID<sub>50</sub>/ml  
**E:** 10 KID<sub>50</sub>/ml      **F:**  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml      **G:**  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml      **H:** negative Kontrolle  
**I:** DEPC-Wasser

Mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** und dem **modifizierten Purescript-Protokoll** von Biozym waren die RT-PCR-Ergebnisse sowohl bei **Vollsperma** als auch bei **Seminalplasma** negativ. Bei dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** waren im Elektrophoresebild nur ganz schwache unspezifische Banden erkennbar.

Bei der **modifizierten Purescript-Methode** trat trotz mehrmaligen Wiederholungen und Austausch der Reagenzien ein sich über das gesamte Gel erstreckender, nicht abgrenzbarer Hintergrund auf, so dass nur bei der positiven Kontrolle eine schwache spezifische Bande zu erkennen war (**Abbildung 15**).

**Abbildung 15:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mittels modifizierter Purescript-Methode aus künstlich mit KSPV kontaminiertem Ebersperma.



**A:** 100 bp-Marker      **B:** positive Kontrolle      **C:**  $10^{-1}$  KID<sub>50</sub>/ml      **D:** 1 KID<sub>50</sub>/ml  
**E:** 10 KID<sub>50</sub>/ml      **F:**  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml      **G:**  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml      **H:** negative Kontrolle

#### 4.3.11 Autoklaviertes Abwasser

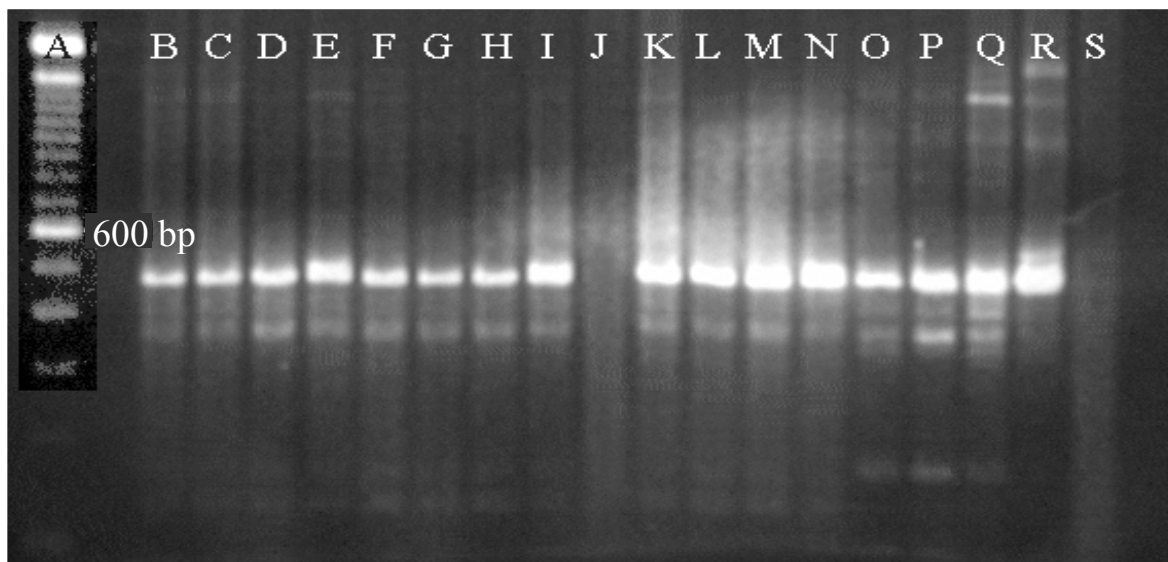
Für die RNA-Isolierung aus autoklaviertem Abwasser wurden die **Trizol-Standard-Methode** und das **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** eingesetzt. Das autoklavierte Abwasser wurde künstlich mit 17D-Virus kontaminiert. Auffällig war bei beiden Methoden eine unspezifische Amplifikation, die nur wenig kleiner als das spezifische PCR-Produkt war und von diesem durch Größenvergleich nicht sicher abgegrenzt werden konnte (**Abbildung 16**). Somit war die Bestimmung des Ergebnisses durch die alleinige Größenfeststellung der entstandenen PCR-Amplifikate aus dem Agarosegel nicht möglich. Jedes PCR-Produkt wurde zur Sicherstellung des Ergebnisses einem Restriktionsschnitt mit dem Enzym Alu I unterzogen. Nur diejenigen PCR-Ansätze, die nach der Restriktion das für das 17D-Genom spezifische Schnittmuster aufwiesen, wurden als positiv gewertet.

Mit der **Trizol-Standard-Methode** isolierter RNA aus autoklaviertem Abwasser wurde mit der RT-PCR zum Nachweis des **17D-Virusgenoms** eine Nachweisgrenze bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml erreicht.

Bei Verwendung von RNA, die mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** aus künstlich mit **17D-Virus kontaminiertem**, autoklaviertem Abwasser gewonnen worden war,

wurde mit der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms eine Nachweisgrenze von  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml erreicht.

**Abbildung 16:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mittels Trizol-Standard-Methode und Machery & Nagel (M&N) Nucleo Spin RNA II Kit aus künstlich mit 17D-Virus kontaminiertem, autoklaviertem Abwasser



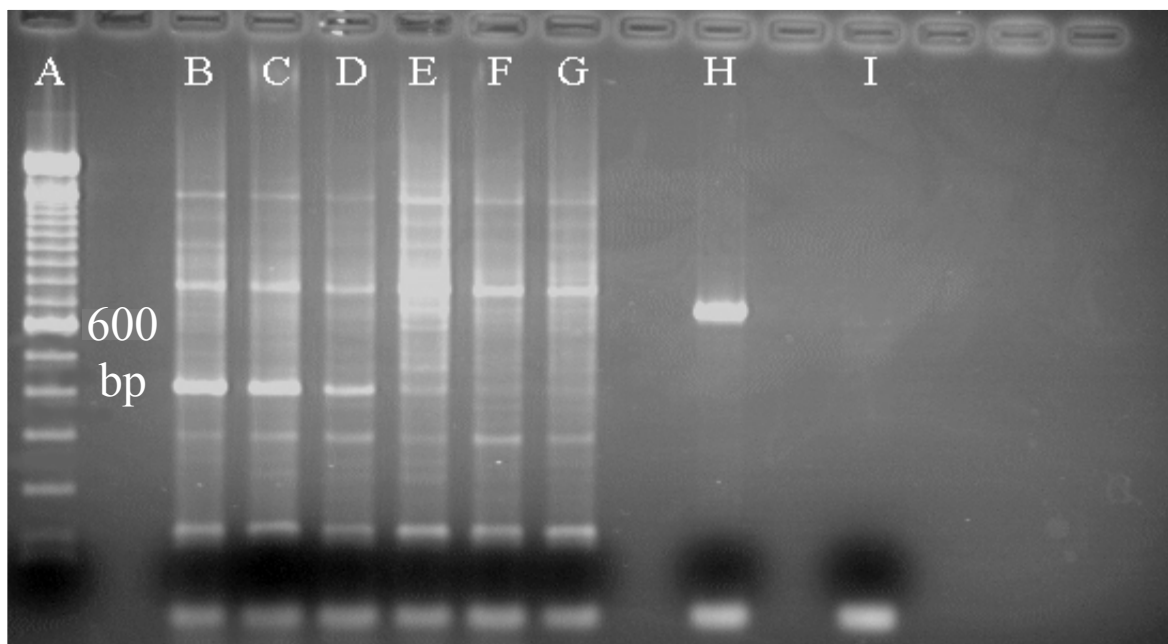
<b>A:</b> 100 bp- Marker	<b>B:</b> M&N negativ	<b>C:</b> M&N $10^1$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>D:</b> M&N $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>E:</b> M&N $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml
<b>F:</b> M&N negativ	<b>G:</b> M&N $10^1$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>H:</b> M&N $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>I:</b> M&N $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>J:</b> DEPC-Wasser
<b>K:</b> Trizol negativ	<b>L:</b> Trizol $10^1$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>M:</b> Trizol $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>N:</b> Trizol $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>O:</b> Trizol negativ
<b>P:</b> Trizo $10^1$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>Q:</b> Trizol $10^3$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>R:</b> Trizol $10^5$ KID <sub>50</sub> /ml	<b>S:</b> DEPC-Wasser	

### 4.3.12 Lebergewebe

Für die RNA-Isolierung aus BVDV haltigem Lebergewebe wurden die **Trizol-Standard-Methode** und das **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** verwendet. Das nicht eingefrorene Lebergewebe ließ sich sowohl in Trizol als auch im Lysispuffer RA1 des Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit mittels Kunststoffpistill gut homogenisieren.

Bei Einsatz von 100 µl Überstand aus homogenisiertem **Lebergewebe** konnte mit der **Trizol-Standard-Methode** bis zu einer Verdünnung von  $10^{-3}$  das BVDV-Genom mittels RT-PCR unter Verwendung der *Primer* BVD 2/3 nachgewiesen werden. Es traten im Elektrophoresebild neben der spezifischen Bande unspezifische Amplifikate auf (**Abbildung 17**).

**Abbildung 17:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mittels Trizol-Standard-Methode aus BVDV-haltigem Lebergewebe



**A:** 100 bp-Marker  
**E:** 1:1000  
**I:** DEPC-Wasser

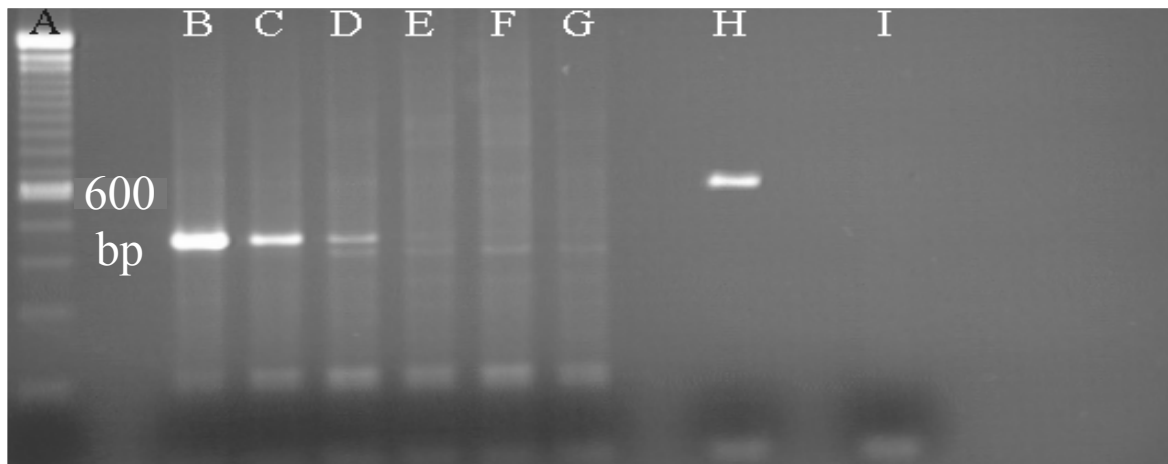
**B:** unverdünnt  
**F:** 1:10000

**C:** 1:10  
**G:** negative Kontrolle

**D:** 1:100  
**H:** positive Kontrolle

Bei Verwendung des **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kits** zur RNA-Isolierung war ein Nachweis des spezifischen BVDV-Genoms mittels RT-PCR bis zu einer Verdünnung von  $10^{-2}$  möglich. Hierbei traten jeweils nur zwei schwache unspezifische Banden bei 400 und 200 bp auf (**Abbildung 18**).

**Abbildung 18:** Elektropherogramm der RT-PCR-Produkte nach RNA-Isolierung mittels Macherey&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit aus BVDV-haltigem Lebergewebe



**A:** 100 bp-Marker  
**E:** 1:1000  
**I:** DEPC-Wasser

**B:** unverdünnt  
**F:** 1:10000

**C:** 1:10  
**G:** negative Kontrolle

**D:** 1:100  
**H:** positive Kontrolle



## **5 Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung verschiedener Methoden zur Gewinnung viraler RNA für den Nachweis in der RT-PCR aus Probenmaterial unterschiedlicher Zusammensetzung und Konsistenz. Die Effizienz der RNA-Isolierung wurde über die in der RT-PCR erreichten Nachweisgrenzen bestimmt. Neben der Nachweisempfindlichkeit wurden die Verwendbarkeit für heterogene Probenmaterialien, Handhabung, Zeitbedarf und Kosten vergleichend untersucht. Der Schwerpunkt bestand in der Untersuchung kommerziell erhältlicher Kits im Vergleich mit einer vorher zu etablierenden Standard-Methode zur RNA-Gewinnung, die unabhängig von der Probenbeschaffenheit einsetzbar sein sollte. Voraussetzungen für die geplanten Untersuchungen waren die Auswahl und Beschaffung geeigneter Modellpathogene und Probenmaterialien sowie die Etablierung der entsprechenden RT-PCRs für den Nachweis der viralen RNA-Genome.

### ***5.1 Auswahl der Modellpathogene***

Als Modellpathogene wurden drei Vertreter der Familie Flaviviridae ausgewählt. Als humanpathogener Erreger wurde Gelbfieber in Form des Gelbfiebervirusimpfstammes 17D eingesetzt. Der Impfstamm ist ungefährlich und unterliegt der biologischen Risikoklasse L1 für Mensch und Tier (ANONYMUS 1990). Er wurde daher zur Minimierung von Infektionsrisiken und zur Vermeidung unnötigen Umganges mit Tierseuchenerregern vor allem für die Versuche mit Zellkulturüberstand und künstlich kontaminierten Probenmaterialien verwendet. Als tierpathogene Viren wurden das BVDV und das KSPV für die Versuche verwendet. Diese Erreger sind für die Veterinärmedizin von erheblicher Bedeutung und es konnte unproblematisch klinisches Probenmaterial aus der Diagnostikabteilung des Institutes für Virologie, dem EU-Referenzlabor für Klassische Schweinpest und aus der tierärztlichen Praxis beschafft werden.

## 5.2 Auswahl der Probenmaterialien

Als Probenmaterialien für die Versuche wurden Zellkulturüberstände, die das Modellvirus enthielten, Vollblut, Vollmilch, Sperma und Seminalplasma, Lebergewebe und autoklaviertes Abwasser eingesetzt. Vollblut, autoklaviertes Abwasser und Sperma bzw. Seminalplasma wurden künstlich mit 17D-Virus bzw. Alfort 187 kontaminiert und in negativem Probenmaterial  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihen hergestellt. Klinische Proben wurden unverdünnt und als  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihen verwendet.

Rücktitrationen aus künstlich kontaminiertem Material bzw. aus Verdünnungen positiver klinischer Proben wurden nur in Einzelfällen durchgeführt. Bei einer Anzahl klinischer Proben ist wegen zytotoxischer oder viruzider Eigenschaften ihrer Bestandteile eine Rücktitration nicht oder nur sehr schwer möglich (Vollblut gerinnungsgehemmt mit EDTA; Sperma; Milch, insbesondere Natriumazid haltig; autoklaviertes Abwasser) (DARCELL u. COULTER 1976; KAHRS et al. 1980), so dass Aussagen über die Infektiösität in der Zellkultur in keiner Relation zu den mittels RT-PCR nachweisbaren viralen Genomen stünden. Die bei BVDV und KSPV zur erwartenden Titer in klinischem Material zwischen  $10^4$  bis  $10^6$  KID<sub>50</sub>/ml waren bekannt (HOFMANN et al. 1994; SANDVIK et al. 1997; BRUSCHKE et al. 1998).

Für die quantitative Einschätzung der Ergebnisse wurde der theoretisch im Untersuchungsmaterial enthaltene Titer ausgehend vom bekannten Titer des eingesetzten Zellkulturüberstandes entsprechend der Verdünnungsstufe kalkuliert. Bei den klinischen Probenmaterialien wurde die Nachweisgrenze in der RT-PCR in Form der erreichten Verdünnungsstufe direkt angegeben. Die Nachweisgrenzen in der RT-PCR in Form von Titern oder Verdünnungsstufen beziehen sich also jeweils nur auf kalkulierte Werte, die ausgehend vom Ausgangstiter des eingesetzten Virus haltigen Zellkulturüberstandes bzw. des unverdünnten Probenmaterials zu werten sind. Da die RT-PCR auch nichtinfektiöse virale RNA nachweist, sind die angegebenen Titer nur Orientierungswerte für den relativen Vergleich der einzelnen RNA-Isolierungsmethoden bzw. RT-PCRs untereinander. Besonders gilt dies für die Nachweisgrenzen, die in KID<sub>50</sub>/ml Probe angegeben werden, da mit einer empfindlicheren RT-PCR (z. B. *nested* PCR) auch mit schlechteren RNA-Isolierungsmethoden höhere Nachweisgrenzen erreicht werden könnten (GRUBER et al.

1993). Da die Relation infektiöser zu nicht infektiösen Partikeln je nach Zeitpunkt der Probenentnahme bzw. Virusernte variieren kann, wurde für die vergleichenden Versuche je Probenmaterial jeweils nur eine Probe bzw. eine Präparation von Zellkulturüberstand, der das jeweilige Modellpathogen enthielt, verwendet und mehrmals untersucht.

Die Angabe der Nachweisgrenze bezogen auf die Probe wurde der in der Literatur zum Teil verwendeten Angabe der Nachweisgrenze in der RT-PCR in g RNA (CHOW et al. 1993) bzw. Viruspartikeln (HILFERNHAUS 1995; NÜBLING 1996) vorgezogen, da die virale RNA in nicht messbaren Konzentrationen vorlag. Eine Bestimmung der Viruspartikel, wie sie z. B. bei Enteroviren elektronenmikroskopisch erfolgen kann, ist wegen der schlechten elektronenmikroskopischen Darstellbarkeit einzelner Flaviviren insbesondere bei den Pestiviren ebenfalls nicht in Betracht gezogen worden (WARD u. KAEBERLE 1984). Für eine quantitative RT-PCR, mit der die Anzahl der amplifizierten Genomäquivalente hätte bestimmt werden können, waren keine geeigneten Kontrollen und Geräte verfügbar. Außerdem sinkt bei der quantitativen RT-PCR durch die Konkurrenz zwischen Zielmolekül und Kontrolle die Nachweisgrenze in der RT-PCR (BRIGHTWELL et al. 1998; SMITH et al. 2000) bzw. der Arbeitsaufwand würde sich durch den parallelen Ansatz mit unterschiedlichen Konzentrationen der Kontrolle deutlich erhöhen.

Bei den künstlich kontaminierten Proben waren die Nachweisgrenzen in der RT-PCR im Vergleich mit klinischem Probenmaterial (Vollblut) schlechter. Neben dem fehlenden Gehalt an in Zellen befindlichen Viren und intrazellulärer viraler RNA kann es nach der künstlichen Kontamination zu einem Abbau von Viren im Probenmaterial oder zu deren Zerstörung (z. B. durch die Desinfektionsmittel in dem autoklavierten Abwasser) und anschließendem Abbau durch RNasen noch vor der eigentlichen RNA-Isolierung gekommen sein. Es wurde daher für die vergleichende Untersuchung weitgehend klinisches Probenmaterial verwendet.

Im Folgenden werden die verwendeten Probenmaterialien und die Gründe für ihre Auswahl näher erläutert.

### **5.2.1 Virushaltiger Zellkulturüberstand**

Virushaltiger Zellkulturüberstand wurde für die Etablierung der Trizol-Standard-Methode, zur Bestimmung der Nachweisgrenzen der RT-PCRs und zum ersten Vergleich der RNA-Isolierungsmethoden eingesetzt. Virushaltiger Zellkulturüberstand wurde ausgewählt, da eine Bestimmung der Virusgehaltes durch Titration einfach möglich war und damit die einzelnen RNA-Isolierungsmethoden vergleichend quantifiziert werden konnten. Virushaltiger Zellkulturüberstand diente weiterhin als Modell für zellarme Probenmaterialien mit einem niedrigen Gehalt zellulärer Proteine und Nukleinsäuren. Als Beispiele seien fetales Kälberserum oder Impfstoffe genannt, bei denen Kontaminationen mit Viren immer wieder ein Problem darstellen (KING u. HARKNESS 1975; NUTTAL et al. 1977).

Zellkulturüberstand ist für den Einsatz in der RT-PCR in bezug auf Inhibitoren unkritisch. Einfaches Erhitzen auf 90 °C zum Freisetzen der viralen RNA stellt bei hohen Virustitern eine ausreichende Probenvorbereitung für die RT-PCR dar (WIRZ et al. 1993). Bei niedrigen Titern erfordert Zellkulturüberstand als zellfreies Probenmaterial und dem daraus resultierenden geringen Gehalt an Fremdnukleinsäuren trotzdem RNA-Isolierungsmethoden mit hoher Ausbeute, was als geeignetes Kriterium für die Vorauswahl von RNA-Isolierungsmethoden angesehen wurde.

### **5.2.2 Vollblut**

Vollblut ist für die Virusdiagnostik ein wichtiges Probenmaterial. Es ist vom lebenden Organismus relativ leicht mit etablierten Verfahren gewinnbar. Bei fast allen durch RNA-Viren verursachten Erkrankungen enthält das Blut zu bestimmten Zeiten das Virus, da das Blut für das Virus häufig Transportmedium bzw. Replikationsort ist.

Vollblut ist ein anspruchsvolles Material für den Einsatz in der RT-PCR, da es RT-PCR inhibierende Komponenten enthält (PANACCIO u. LEW 1991). Die Porphyrinkomponente des Hämoglobins inhibiert die PCR (HIGUCHI 1989). Auch das zur Gerinnungshemmung bei manchen Blutproben eingesetzte Heparin stört die PCR-Reaktion (BEUTLER et al. 1990;

HOLODNIY et al. 1991). Außerdem weisen einige Blutzellen, wie z. B. Granulozyten, einen hohen Gehalt an RNAsen auf (YANG u. MILLER 1985). Bei in der Literatur beschriebenen RT-PCR-Nachweisen kommt daher in den seltensten Fällen Vollblut als Probenmaterial zum Einsatz, sondern es werden Serum oder isolierte weiße Blutzellen (buffy coat) als Probenmaterial eingesetzt (DIAZ DE ARCE et al. 1998; DREW et al. 1999). Trotzdem kann es in Abhängigkeit von der RNA-Isolierungsmethode zu falsch negativen Ergebnissen kommen (DREW et al. 1999). Ebenso sind diese Verfahren von Nachteil, wenn man die genaue Lokalisation des Virus nicht kennt oder nur geringe Gesamttiter im Blut zu erwarten sind. Des Weiteren ist der Arbeitsaufwand durch die zusätzlichen Trenn- und Waschschrte höher. Ziel war es daher, die RNA-Isolierungsmethoden mit Vollblutproben zu testen. Da die meisten Blutproben für andere virologische Testverfahren gerinnungsgehemmt mit EDTA bzw. Lithiumheparinat zur Diagnostik versandt werden, wurde Blut mit den genannten Gerinnungshemmern und kein reines Blut eingesetzt.

### **5.2.3 Vollmilch**

Vollmilch ist ein Lebensmittel, das für die menschliche Ernährung von großer Bedeutung ist und oft ohne vorherige Massnahmen zur Abtötung von Pathogenen direkt konsumiert bzw. weiterverarbeitet wird. Es besteht dadurch das Risiko der Übertragung viraler Zoonosen. Milch kann ebenfalls für die vertikale Übertragung von viralen Erkrankungen von Bedeutung sein (HOPKINS u. DiGIACOMO 1997). Für die Veterinärmedizin ist BVDV haltige Milch zur Zeit in der Diskussion als alternatives Probenmaterial zum Auffinden persistent mit BVDV infizierter Tiere im Rahmen von Bestandssanierungen (RADWAN et al. 1995; DREW et al. 1999).

Milch kann ein für die PCR kritisches Probenmaterial darstellen. HOTZEL et al. (1993) fanden, dass der hohe Proteingehalt der Milch die PCR-Reaktion stören kann. Dagegen ist der Einsatz der in der Milch enthaltenen Zellen für die PCR unproblematisch (LIPKIN et al. 1993).

Bisher wurde beim RT-PCR-Nachweis des BVDV-Genoms aus Milch so vorgegangen, dass die RNA-Isolierung aus den durch Zentrifugation aus der Milch gewonnenen somatischen

Zellen erfolgte (RADWAN et al. 1995; DREW et al. 1999). Dafür war ein hoher Aufwand bei der Probenaufbereitung notwendig. Durch Autolyse oder Gefrier-Tau-Zyklen aus den Zellen freigesetzte und frei vorkommende Viruspartikel gehen für die RNA-Isolierung verloren, weshalb Proben transport und -aufarbeitung sehr schnell erfolgen müssen. Die Probenvolumen lagen in Bereichen, die nicht mehr im Mikroreaktionsgefäßmaßstab aufgearbeitet werden konnten. Für die eigenen Untersuchungen wurde daher die gesamte Vollmilch für die RNA-Isolierung verwendet.

In der Milchproduktion werden regelmäßig Proben zur Bestimmung der Milchqualität entnommen. Diese werden häufig über längere Zeiträume gelagert und für diesen Zweck z. B. mit Natriumazid konserviert. Da dieses konservierte Material für retrospektive oder epidemiologische Untersuchungen von Interesse sein könnte, wurde neben nicht konservierter Milch auch entsprechend konservierte Milch in die Untersuchungen einbezogen.

#### **5.2.4 Sperma und Seminalplasma**

Sperma kann für die Übertragung viraler Erkrankungen in Human- und Veterinärmedizin von großer Bedeutung sein. In der Veterinärmedizin seien als Beispiele für RNA-Viren, das Virus der Equinen Arteritis und das PRRSV genannt (SHIN et al. 1997; STARICK 1998). Für KSPV wird ebenfalls eine Übertragung durch das Sperma beim natürlichen Deckakt bzw. bei der künstlichen Besamung diskutiert (GEIGER 1939; DE SMIT et al. 1999). Im EU-Referenzlabor für Klassische Schweinepest wurden in den Jahren 1997 und 1998 Übertragungsversuche mit dem Sperma künstlich mit KSPV infizierter Eber durchgeführt. Mit Hilfe der zellkulturellen Virusisolierung gelang nur in zwei Fällen der KSPV-Nachweis aus den zur künstlichen Besamung eingesetzten Spermafraktionen (FLOEGEL et al. 2000). Sperma und Seminalplasma enthalten zytotoxische Bestandteile (DARCELL u. COULTER 1976; KAHRS et al. 1980). Die zellkulturelle Virusisolierung ist daher sehr aufwendig und nicht immer erfolgreich (FLOEGEL et al. 2000). Der Nachweis der viralen RNA mittels RT-PCR wäre eine Alternative. Sperma kann Inhibitoren der RT-PCR enthalten (SCHEIT et al. 1979; REDDY et al. 1983; LUGARO et al. 1988; DA SILVA et al. 1995; SEMPRINI et al. 1998).

Die in der Literatur beschriebenen zum Teil sehr aufwendigen Vorarbeiten zur Entfernung möglicher Inhibitoren vor der RNA-Isolierung für den RT-PCR-Nachweis aus Sperma, wie z. B. Chromatografie mit Sephacryl S-400 für den BVDV-Nachweis aus Bullensperma (DA SILVA et al. 1995), sollten wegen möglicher Virusverluste nicht durchgeführt werden. Da der RT-PCR-Nachweis aus 100 bis 500 µl EAV und PRRSV haltigem Sperma unter Verwendung geeigneter RNA-Isolierungsmethoden in der Literatur dokumentiert ist (ST-LAURENT et al. 1994; CHRISTOPHER-HENNINGS et al. 1995; GILBERT et al. 1997; OLEKSIEWICZ et al. 1998), wurde für die eigenen Versuche daher künstlich mit KSPV kontaminiertes Sperma und Seminalplasma direkt für die RNA-Isolierung eingesetzt. Ausgehend von BVDV-Titern von 5 bis 75 KID<sub>50</sub>/ml (DA SILVA et al. 1995) und einem PRRSV-Titer von 30 KID<sub>50</sub>/ml (SHIN et al. 1997) in Spermaproben wurden Sperma- und Seminalplasmaproben mit kalkulierten KSPV-Titern von 10<sup>3</sup> KID<sub>50</sub>/ml bis 0,1 KID<sub>50</sub>/ml Probenmaterial künstlich kontaminiert.

### **5.2.5 Autoklaviertes Abwasser**

Zur Simulation von Abwasser wurde autoklaviertes Abwasser aus dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover eingesetzt. Von dem autoklavierten Abwasser war bekannt, welche Tierkörper und Desinfektionsmittel in den Autoklavierprozeß eingebracht worden sind. Natürlich vorkommendes Abwasser dagegen hat eine dem autoklavierten Abwasser aus der Pathologie ähnlich heterogene, jedoch oftmals unbekannte und im Nachhinein nur mit großem Aufwand bestimmbare Zusammensetzung. Der Einsatz von natürlichem Abwasser erschien auch aus Arbeitsschutzgründen (wegen möglicher darin enthaltener pathogener Erreger) bedenklich, während im autoklavierten Abwasser alle Erreger durch den Autoklavierprozeß inaktiviert waren.

Abwasser stellt für die Virusdiagnostik ein wichtiges Probenmaterial dar. Es kann für die Verbreitung pathogener Erreger insbesondere durch die Kontamination von Lebens- bzw. Futtermitteln auf Feldern oder in der Aquakultur verantwortlich sein (GREISER-WILKE u. FRIES 1994). Verschiedene Enteroviren, Echovirus, Hepatitis A Virus, Norwalk Virus (GANTZER et al. 1997; GILGEN et al. 1997; DIVIZA et al. 1998; GANTZER et al. 1998;

GANTZER et al. 1999; GRIFFIN et al. 1999), aber auch Hepatitis E Virus (JOTHIKUMAR et al. 1993) und HIV (ANSARI et al. 1992; MOORE 1993) wurden bereits mittels RT-PCR in Abwässern nachgewiesen.

Im Abwasser sind eine Reihe Substanzen natürlichen Ursprungs wie Gewebematerial, Fette, Blut- und Faecesbestandteile sowie Urin von Menschen und Tieren, Salze, aus dem Boden stammende Tannine und Huminstoffe, aber auch Stoffe industrieller Herkunft, wie Öle, Fette, Detergentien u.s.w. enthalten. Einige dieser Substanzen könnten PCR- bzw. RT-PCR-Nachweise hemmen und müssten entfernt werden (MUIR et al. 1993; SHIEH et al. 1995; SCHWAB et al. 1996). Auch besteht bei der RNA-Freisetzung aus Abwasserproben das Risiko des RNA-Abbaus durch die in der Probe enthaltenen RNasen (RICHARDSON et al. 1988).

Mit dem Gelbfiebertvirusimpfstamm 17D künstlich kontaminiertes autoklaviertes Abwasser wurde daher unverzüglich nach der Kontamination zur RNA-Isolierung eingesetzt.

### **5.2.6 Lebergewebe**

Für die Erprobung der RNA-Isolierung aus Organmaterial wurde exemplarisch die Leber ausgewählt. Lebergewebe ist von großen und kleinen Tieren sowie dem Menschen verhältnismäßig einfach als Biopsie oder Autopsiematerial gewinnbar. Außerdem ist die Leber Zielorgan vieler viraler Erkrankungen (HOWARD et al. 1984; SLAUGHTER 1985; TANDON u. ACHARYA 1987). Nach MÜLHARDT (1999) enthält die Leber im Vergleich zu anderen Organen, wie z. B. der Niere, allgemein mehr RNA. Durch die Stoffwechselaktivität sind auch die Virustiter relativ hoch und bei transienten Infektionen kann in der Leber länger Virus nachgewiesen werden als in Lymphknoten oder Milz, wo die Viren einer verschärften Inaktivierung unterliegen (ROSEN et al. 1999). Das in der Leber enthaltene Heparin, sowie Abbauprodukte des Hämoglobins und über die Jahre akkumulierte Schadstoffe, könnten in Konzentrationen vorliegen, die die RT-PCR inhibieren. Durch die hohe Stoffwechselaktivität ist ebenfalls ein hoher Gehalt an RNasen zu erwarten.



### ***5.3 Etablierung und Optimierung der RT-PCRs zum Nachweis der Modellvirusgenome***

Für den Vergleich der einzelnen Methoden zur RNA-Isolierung war es erforderlich, RT-PCRs zum Nachweis der Virusgenome zu etablieren, die eine hinreichende Nachweisempfindlichkeit verbunden mit einer sehr guten Reproduzierbarkeit aufwiesen. Um einen möglichst großen Einfluß der Qualität der RNA-Präparation auf die RT-PCR zu erhalten, sollte außerdem die Menge an für eine RT-PCR-Reaktion eingesetzter RNA möglichst groß sein. Bei Einsatz der RT-PCR-Protokolle nach GREISER-WILKE et al. (1995) für die Optimierung der Trizol-Standard-Methode war die Nachweisgrenze in der RT-PCR nicht reproduzierbar und variierte um mehr als eine  $\log_{10}$ -Stufe. Die einzelnen Arbeitsschritte und Laborbedingungen wurden analysiert. Für die Schwankungen in den Nachweisgrenzen in der RT-PCR schienen vor allem Aktivitätsverluste der verwendeten RT-PCR-Reagenzien, insbesondere der mit Puffer verdünnten und eingefroren gelagerten Polymerase, verantwortlich, die möglicherweise durch das mehrfache Auftauen und Wiedereinfrieren bedingt waren. Für die weiteren RT-PCR-Nachweise wurden diese Fehlerquellen beseitigt.

Für die Etablierung der RT-PCR zum Nachweis des 17D-Virusgenoms wurde RNA verwendet, die mit der Trizol-Standard-Methode aus Verdünnungen 17D-Virus haltiger Zellkulturüberstände gewonnen worden war. Das Volumen der eingesetzten RNA wurde auf 8  $\mu$ l erhöht, um den Einfluß der RNA-Präparation auf die nachfolgenden enzymatischen Reaktionen zu maximieren.

Unter den optimierten Bedingungen der PCR Reaktion wurde bei Einsatz von 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand der spezifische 473 bp großen Genomabschnitt amplifiziert. Nur bei sehr hohen Viruskonzentrationen über  $10^4$  KID<sub>50</sub>/ml traten gelegentlich bei ca. 900 und 1500 bp schwach leuchtende Banden in den Agarosegelen auf. Die Identität dieser Produkte wurde nicht weiter untersucht. Es ist anzunehmen, dass es sich um Polymere des spezifischen Produktes handelt. Die Spezifität des amplifizierten Produktes von 473 bp konnte mittels Restriktionsenzymchnitt nachgewiesen werden.

Die Erprobung weiterer Polymerasen und von *HotStart*-Techniken erbrachte keine weitere Steigerung der Nachweisgrenze in der RT-PCR. Als beste Variante erwies sich der Einsatz der HotStarTaq-Polymerase von Qiagen. Für die vergleichenden Untersuchungen der einzelnen

RNA-Isolierungsmethoden erschien das etablierte RT-PCR-Protokoll unter Verwendung der Tth-Polymerase ohne HotStart-Techniken am geeignetsten, da die relativ hohe Magnesiumchloridkonzentration und die hohe Zykluszahl das System anfällig für kleine Änderungen in der Nukleinsäurequalität macht (LYONS 1992).

Die von Versuch zu Versuch erreichten Nachweisgrenzen in der RT-PCR bei Verwendung mit der Trizol-Standard-Methode gewonnener RNA waren reproduzierbar und variierten um maximal eine  $\log_{10}$ -Stufe.

Die neuentwickelten Protokolle wurden anschließend an die Pestivirus-spezifischen Primer adaptiert und mit RNA, die mit der Trizol-Standard-Methode aus NADL bzw. Alfort 187 haltigen Verdünnungen von Zellkulturüberständen gewonnen worden war, die erreichbaren Nachweisgrenzen in der RT-PCR überprüft. Auch wurde RNA, die mit der Trizol-Standard-Methode aus Pestivirus haltigen Organen gewonnen worden war, amplifiziert.

Für den RT-PCR-Nachweis von Pestivirusgenomen wurden die zwei Primerpaare BVD 2/3 und Pest 2/3 ausgewählt, um zu testen ob bei einer Amplifikation eines kürzeren Stückes (Pest 2/3 148-159 bp) eine höhere Nachweisempfindlichkeit als bei Amplifikation eines größeren Stückes (BVD 2/3 402 bzw. 672 bp) erreicht wird. Wurde dieselbe cDNA sowohl mit der PCR unter Verwendung der *Primer* BVD 2/3 als auch mit den *Primern* Pest 2/3 amplifiziert, so war die Intensität der Bande des PCR-Produktes bei Verwendung der *Primer* Pest 2/3 etwas stärker als bei Verwendung der *Primer* BVD 2/3. Eine Steigerung der Nachweisgrenze in der RT-PCR wurde nicht festgestellt. Dies spricht dafür, dass die Amplifikation eines kürzeren Stückes einen etwas empfindlicheren Nachweis ermöglicht. Ursache dafür ist wahrscheinlich, dass kürzere Stücke weniger schnell vom Abbau durch RNasen betroffen sind. Da bei Verwendung des zytopathogenen BVDV-Stammes NADL als positive Kontrolle mit den *Primern* BVD 2/3 im Agarosegel eine Unterscheidung von nichtzytopathogenen BVDV-Stämmen im klinischen Probenmaterial durch Größenvergleich möglich ist und kein wesentlicher Unterschied in den Nachweisgrenzen in der RT-PCR vorlag, wurden wegen der besseren Erkennbarkeit von Kontaminationen überwiegend die *Primer* BVD 2/3 und nur bei den künstlich kontaminierten Sperma- und Seminalplasmaproben die *Primer* Pest 2/3 zum Nachweis der Pestivirusgenome mittels RT-PCR eingesetzt.

Durch Standardisierung der Arbeitsprotokolle und sorgfältige Organisation der Arbeitsschritte im Labor konnte mit den nunmehr für alle Modellpathogene etablierten RT-PCR-Methoden

eine sehr gute Reproduzierbarkeit mit Nachweisgrenzen von unter einer  $KID_{50}/ml$  Zellkulturüberstand und Variationen um maximal eine  $\log_{10}$ -Stufe erreicht werden, was für die vergleichenden Untersuchungen als ausreichend angesehen wurde.

Der Nachweis des jeweiligen Modellvirusgenoms erfolgte über den Größenvergleich des RT-PCR-Produktes mit der Größe des zu amplifizierenden Genomabschnittes. Diese Vorgehensweise wurde als praktikabel angesehen, da bei den verwendeten Probenmaterialien bekannt war, welches Modellvirus sie enthielten. Durch die Mituntersuchung negativen Probenmaterials wurden unspezifische Amplifikate durch Größenvergleich erkannt. Bei der Isolierung von RNA aus autoklaviertem Abwasser war das spezifische PCR-Amplifikat nicht sicher von unspezifischen Amplifikaten ähnlicher Größe abgrenzbar. Daher wurde zusätzlich der Restriktionsschnitt mit dem Enzym Alu I durchgeführt, um positive Ergebnisse sicher von negativen unspezifischen Amplifikaten abzugrenzen.

#### ***5.4 RNA-Isolierungsmethoden***

Für die Auswahl der zu untersuchenden RNA-Isolierungsmethoden waren bestimmte Kriterien von Bedeutung. Bei der Marktrecherche wurden alle RNA-Isolierungsverfahren erfasst, die für die Isolierung von Gesamt-RNA oder viraler RNA konzipiert waren. Weiterhin wurden soweit wie möglich die verwendeten Prinzipien und die vom Hersteller vorgesehenen Probenmaterialien festgestellt.

Für die Isolierung von RNA insbesondere aus Virus haltigen Proben mußte beachtet werden, dass RNAs sehr empfindlich gegen den Abbau durch RNAsen sind, und einzelsträngige RNAs zudem bei pH-Werten über 7,5 zur Aggregatbildung und Hydrolyse neigen (WINK u. WEHRLE 1994). Diese Eigenschaften müssen schon bei der Entnahme der Proben berücksichtigt werden. Eine wirksame Inhibition der RNAsen wird durch Lyse der Proben mit Puffern erreicht, die chaotrope Salze, organische Lösungsmittel oder Detergentien enthalten. Diese Substanzen führen auch zur Desintegration zellulärer Strukturen und zur Dissoziation der Proteine von den Nukleinsäuren (SAMBROOK et al. 1989). Der damit verbundene Verlust der Infektionsfähigkeit von Viren durch die nunmehr fehlende Integrität der Virushülle war eine weitere Forderung für die Eigenschaften der zu erprobenden RNA-

Isolierungsmethoden, um das Infektionsrisiko bei Transport und Aufarbeitung der Probenmaterialien zu minimieren.

Daher enthalten alle ausgewählten Methoden in ihren Lysepuffern stark chaotrope Salze oder organische Lösungsmittel bzw. Detergentien. Methoden, die allein Hitze zum Probenaufschluß nutzen, wie z. B. alleiniger Einsatz von Genereleaser (Eurogentec), wurden von den Untersuchungen ausgespart. Außerdem sollten nur Protokolle verwendet werden, bei denen die Trennschritte durch Zentrifugation in einer Mikroliterzentrifuge und nicht über Vakuum oder Magnetpartikel erfolgen.

Nach Erstellung der Marktübersicht stellte sich heraus, dass die meisten Kits auf vier Grundprinzipien der Trennung der RNA von den restlichen Probenbestandteilen basierten. Auf Anionenaustauscherbasis arbeitende Kits wurden nicht in die Untersuchungen einbezogen, da für die Trennungsschritte Schwerkraft (Qiagen und Machery&Nagel) bzw. Pipettenvorsätze (Schleicher&Schuell) verwendet werden. Kits, die auf der Basis der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion, der Bindung der Nukleinsäuren an Siliziumverbindungen und der Abtrennung von Proteinen und DNA durch Salzpräzipitation beruhten, erfüllten die oben dargestellten Kriterien.

Für die zu optimierende Standard-RNA-Isolierungsmethode wurde mit **Trizol** ein System auf Basis der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1987) ausgewählt. Dies geschah zum einen deshalb, da das vom Hersteller vorgesehene Spektrum an Proben unterschiedlicher Beschaffenheit am breitesten war und andererseits die saure Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion als Standard für die RNA-Isolierung bekannt ist. Außerdem beruhten die meisten kommerziell erhältlichen Kits auf Protokollen, die sich an der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion orientierten.

Die Auswahl der auf der auf Bindung der Nukleinsäuren an ein Siliziummaterial, das sich in einer kleinen Säule befindet, beruhenden RNA-Isolierungsmethoden erfolgte ausgehend von den vorgesehenen Probenmaterialien. Das **RNeasy Mini Kit** war vom Hersteller vorwiegend für den Einsatz mit Zellen und Geweben gedacht, während das **QIAamp Viral RNA Kit** für zellarme Virus haltige flüssige Proben optimiert war. Mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit** sollte RNA aus Zellen, Geweben und Flüssigkeiten isoliert werden können (**Tabelle**

17). Das **Purescript Kit** wurde ausgewählt, da es nur ungefährliche Substanzen verwendet und einen sehr günstigen Preis aufwies.

#### 5.4.1 Optimierung der Trizol-Standard-Methode

Bei Anwendung der Arbeitsvorschrift des IVI, Mittelhäusern, Schweiz, für die RNA-Isolierung mit der Trizol-Methode lag die Nachweisgrenze in der RT-PCR bei etwa  $10^4$  KID<sub>50</sub>/ml NADL-Virus haltigem Zellkulturüberstand. Als Ursache wurden vor allem Verluste der viralen RNA aus dem zellarmen Zellkulturüberstand durch mangelnde Präzipitation der RNA angesehen. Daher wurde die Trizol-Standard-Methode optimiert, indem verschiedene Inkubations- und Zentrifugationszeiten sowie Präzipitationshilfen erprobt wurden. Damit gelang es, die Nachweisgrenzen in der RT-PCR unter eine KID<sub>50</sub>/ml Zellkulturüberstand zu verbessern. Die universelle Einsetzbarkeit der Trizol-Standard-Methode wurde mit flüssigen klinischen Proben und Organmaterial bewiesen. Für die Organhomogenisierung waren verschiedene Methoden erprobt worden, wobei nach einem einfachen und preiswerten System für größere Probenzahlen gesucht wurde. Als optimal hatten sich in dieser Hinsicht Kunststoffeinwegpistille erwiesen. Eine weitere Verbesserung der Organhomogenisierung könnte in Zukunft durch Einsatz des BioPulverizer Systems in Verbindung mit dem FastPrep Instrument von BIO 101 erzielt werden. Bei diesem System können bis zu acht Proben gleichzeitig in geschlossenen Gefäßen unter Anwendung des Prinzips einer Kugelmühle elektromechanisch homogenisiert werden. Durch das geschlossene System ist eine Infektionsgefährdung durch Aerosole weitgehend ausgeschlossen. Es wird eine erhebliche Zeitersparnis erreicht. Ein FastPrep Instrument kostet in der Anschaffung allerdings etwa 5000,- DM.

#### 5.4.2 Vergleich der einzelnen RNA-Isolierungsmethoden unter Verwendung von 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand

Die auf der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroformextraktion (CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1987) beruhende optimierte **Trizol-Standard-Methode** war mit einem Zeitaufwand von 4 h 30 min recht zeitintensiv. Auch waren sehr viele Arbeitsschritte notwendig. Von Nachteil waren die Notwendigkeit eines Abzuges, einer Kühlzentrifuge und die Bereitstellung fast aller Reagenzien durch das eigene Labor. Es wurden jedoch die besten Nachweisgrenzen in der RT-PCR erreicht. Mit einer Kostenpauschale von 4,35 DM gehörte sie zudem zu den preiswerteren Methoden.

Zunächst wurden Versuche zur Vereinfachung der **Trizol-Standard-Methode** durchgeführt. Um die Präzipitationszeit von 1 h und die anschließende Zentrifugation von 30 min zu sparen, wurde statt der Isopropanolfällung der Einsatz der RNA-bindenden Substanz **RNABind** erprobt. Die Nachweisgrenze in der RT-PCR sank jedoch um bis zu vier  $\log_{10}$ -Verdünnungsstufen. Dies wurde auf die Übertragung der RNA bindenden Substanz in die RT-Reaktion oder / und den PCR-Ansatz zurückgeführt, da nach Zentrifugation kein festes Sediment entstand. Aufgrund der umständlichen Handhabung dieses Produktes wurden keine weiteren Optimierungsschritte durchgeführt.

Im Hinblick auf die Versuche mit Materialien, die voraussichtlich mehr Inhibitoren als Zellkulturüberstand enthalten, wurde zusätzlich **Genereleaser** zur Rehydrierung der RNA eingesetzt. Genereleaser ist eine Substanz, die laut Herstellerangaben Inhibitoren der RT-PCR binden kann. Dieser Schritt führte bei 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand lediglich zu einer Abnahme der Nachweisgrenze in der RT-PCR um eine Titerstufe. Die Kosten stiegen um 85 Pfennig und der Zeitaufwand erhöhte sich um 10 min.

Weiterhin wurden vier kommerzielle Kits, die speziell zur Isolierung von RNA entwickelt worden waren, vergleichend untersucht.

Die Zeit- und Arbeitserleichterung beruhte in drei von vier der getesteten Kits (**RNeasy Mini Kit** und **QIAamp Viral RNA Kit** von Qiagen sowie dem **Nucleo Spin RNA Kit** von Machery & Nagel) auf dem Wegfall von Präzipitationsschritten. Das Prinzip ist bei diesen drei Kits ähnlich. Die RNA wird unter Verwendung spezieller chaotroper Salze an eine

Glasmatrix gebunden, die sich in einer kleinen Säule befindet (VOGELSTEIN u. GILLESPIE 1979; BOOM et al. 1990; COLPAN 1992). An dieser Matrix werden alle Waschschriffe durchgeführt, und anschließend kann die reine RNA eluiert werden. Bei einem Kit (**QIAamp Viral RNA Kit**) enthielt der Probenpuffer zur Erhöhung der Bindungs- und Elutionseffizienz einen Hilfssubstanz (PolyA). Bei einem zweiten Kit (**Nucleo Spin RNA Kit**) wurde vom Hersteller zusätzlich ein Puffer mit PolyA als Hilfssubstanz geliefert und getestet. Außerdem wurde der Einsatz von **Bäckerhefen-RNA** analog zur Trizol-Standard-Methode erprobt.

Mit dem **RNeasy Mini Kit** konnte die RNA-Isolierungszeit auf 2 h gesenkt werden. Die Nachweisgrenze in der RT-PCR lag bei  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml. Das Kit war mit einem Preis von DM 8,10 pro Probe am teuersten. Im Vergleich zu den anderen auf Säulchen basierenden Verfahren wurde es als nachteilig empfunden, dass die lysierte Probe in mehreren und nicht in einem einzigen Pipettierschritt auf die Säule aufgetragen werden konnte.

Das **QIAamp RNA Kit** erbrachte bei gleicher RNA-Isolierungszeit wie beim **RNeasy Mini Kit** eine Steigerung der Nachweisgrenze in der RT-PCR um eine Zehnerpotenz. Im Agarosegel traten im höhermolekularen Bereich nicht abgrenzbare unspezifische Banden auf. Möglicherweise führte die Poly A-Hilfssubstanz in der PCR zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte, die eine deutliche Erhöhung der Nachweisgrenze in der RT-PCR verhindern. Als nachteilig wurde die Notwendigkeit eines 80 °C Wasserbades und eines 80 °C Wärmeschrankes angesehen. Der Preis von DM 6,45 lag im Mittelfeld.

Mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA Kit** wurde ebenfalls eine Nachweisgrenze in der RT-PCR von nur  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml erreicht. Die Signale waren stärker als beim **RNeasy Mini Kit** und die Isolierungszeit betrug nur 1 h 30 min. Es war damit die schnellste Methode. Der Preis lag mit DM 7,75 im oberen Bereich.

Für Testzwecke wurde vom Hersteller ein Lysispuffer (**RAV**) zur Verfügung gestellt, der ebenfalls Poly-A als Hilfssubstanz enthielt. Eine Steigerung der Nachweisgrenze in der RT-PCR wurde nicht erreicht. Die Intensität der spezifischen Bande war schwächer.

Ausgehend von den guten Erfahrungen mit dem Zusatz von **Bäckerhefen-RNA** bei Trizol-Standard-Methode wurde sie dem Puffer RA1 des **Macher & Nagel Nucleo Spin RNA** als Hilfssubstanz zugesetzt. Dies führte bei einer Kostensteigerung um DM 0,20 und einen Anstieg des Zeitbedarfs um 5 min zur Verbesserung der Nachweisgrenze in der RT-PCR um ein bis zwei Zehnerpotenzen.

Die im Vergleich zur **Trizol-Standard-Methode** schlechten Nachweisgrenzen in der RT-PCR bei den auf die Bindung an Glasflies basierenden Säulchenmethoden könnte einerseits darauf zurückgeführt werden, dass virale RNA irreversibel gebunden wird. Andererseits ist es denkbar, dass kleine RNA-Mengen schlecht binden und bei den Waschschritten in den Durchfluß gelangen und verloren gehen. Der Zusatz zusätzlicher Nukleotidstrukturen könnte die Effizienz einer reversiblen Bindung erhöhen. Poly-A erwies sich als Hilfssubstanz ungeeignet, da unspezifische höhermolekulare Strukturen entstehen, die die Nachweisgrenze in der RT-PCR verringern. Dagegen führte der Zusatz von Bäckerhefen-RNA zum Lyseansatz zu einer Steigerung der Nachweisgrenze in der RT-PCR.

Mit dem auf Salzpräzipitation der Proteine und DNA beruhenden **Purescript-Kit** (NICOLAIDES u. STOECKERT 1990; LAHIRI et al. 1992) wurde ebenfalls eine Nachweisgrenze in der RT-PCR von ca.  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml erreicht. Der Preis war mit DM 3,85 am günstigsten. Als zusätzliches Gerät war ein 65 °C Wasserbad erforderlich. Die in der Anleitung angegebenen Schritte wie bis zu 50 maliges Umschütteln sind bei vielen Proben schlecht realisierbar. Die geringe Nachweisgrenze in der RT-PCR wird insbesondere auf den im Vergleich zur Trizol-Standard-Methode nur sehr kurzen Präzipitationsschritt und die kurzen Zentrifugationszeiten zurückgeführt. Ein großer Vorteil ist, dass nur ungiftige Substanzen eingesetzt werden.

#### 5.4.3 Isolierung von RNA aus komplexen Probenmaterialien

Für die weiterführenden Versuche wurden ausgehend von der Nachweisgrenze in der RT-PCR, dem Zeit- und Arbeitsaufwand sowie den Kosten von den mit 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand getesteten Verfahren die **Trizol-Standard-Methode**, das **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA-Kit** und das **Purescript Kit** für die RNA-Isolierung ausgewählt. Die **Trizol-Standard-Methode** erbrachte das beste Ergebnis hinsichtlich der Nachweisgrenze in der RT-PCR. Das **Machery& Nagel Nucleo Spin RNA Kit** stellt den Vertreter der in der Praxis weit verbreiteten auf Glasfliesmembranen in Säulchen beruhenden Methode dar, der den günstigsten Preis und die höchste Nachweisgrenze in der RT-PCR aufwies. Zwischenzeitlich hatte der Hersteller das Kit vom Markt genommen und durch das



**Machery& Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** ersetzt, das zusätzlich eine DNase I-Behandlung und ein geringfügig verändertes Protokoll aufwies. Außerdem mußte jetzt 96%iges Ethanol vom Anwender selbst gestellt werden. Die mit dem **Machery& Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** aus 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand isolierte RNA erzielte die gleiche Nachweisgrenze wie das ursprüngliche **Machery& Nagel Nucleo Spin RNA Kit**, so dass das **Machery& Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** für die RNA-Isolierung aus komplexen Probenmaterialien verwendet wurde. Die DNase I-Behandlung versprach bei DNA-haltigen Proben eine Verminderung unspezifischer Amplifikate.

Das **Purescript Kit** wurde wegen seiner geringen Kosten und der Verwendung weitgehend ungefährlicher Reagenzien und als Vertreter eines dritten Prinzipes zur Entfernung von Proteinen und DNA (Aussalzen) ausgewählt.

Nur bei zellarmen Probenmaterialien (Zellkulturüberstand, Seminalplasma, DEPC-Wasser, EMEM und autoklaviertes Abwasser) wurde bei der **Trizol-Standard-Methode** und dem **Machery& Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** ausgehend von den mit Zellkulturüberstand gewonnenen Erkenntnissen **Bäckerhefen-RNA** zum Versuchsansatz zugegeben.

#### **5.4.3.1 Untersuchung von Vollblutproben**

Für die Untersuchung wurden mit 17D-Virus künstlich kontaminierte Proben und mit BVDV natürlich infiziertes Vollblut eingesetzt. Wenn man von einem durchschnittlichen Titer im Blut eines persistent mit BVDV infizierten Tieres von  $10^4$  bis  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml (SANDVIK et al. 1997; FREY pers. Mitteilung) ausgeht, waren die Ergebnisse mit dem natürlich infizierten Blut besser als mit dem künstlich kontaminierten Blut. Daher wurden die Untersuchungen mit der Purescript-Methode nur noch mit natürlich infizierten Blutproben durchgeführt. Bei den mit 17D-Virus künstlich kontaminierten Proben ließ sich jedoch wegen des Einsatzes von Zellkulturüberstand mit bekanntem Titer Rückschlüsse auf die erreichbaren Nachweisgrenzen in der RT-PCR ziehen.

Mit RNA aus **EDTA gerinnungsgehemmten Vollblut**, die mit allen drei Kits isoliert wurde, konnte jeweils ein positives RT-PCR-Signal erhalten werden.

Mit der **Trizol-Standard-Methode** gelang ein RT-PCR-Nachweis aus mit **17D-Virus** künstlich kontaminiertem **EDTA-Vollblut** bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml. Wurde mit der **Trizol-Standard-Methode** aus **BVDV** haltigem **EDTA-Vollblut** RNA isoliert, konnte das BVDV-Genom bis zu einer Verdünnung von  $10^{-4}$  nachgewiesen werden. Gleichzeitig traten jedoch mehrere unspezifische Banden auf, die auch im negativen Material detektiert werden konnten. Ursache dafür könnten zelluläre RNA-Sequenzen sein, an denen die verwendeten Primer binden. Dagegen sprechen aber die Ergebnisse mit RNA, die mit dem Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit isoliert wurde, wo entsprechende Banden nicht auftraten. Vermutlich sind im Blut enthaltene mit der **Trizol-Standard-Methode** nicht entfernbare positiv geladene Ionen, die die Struktur der DNA und die Tätigkeit der Polymerase beeinflussen, für die Bildung unspezifischer Produkte verantwortlich. Im Hämoglobin befinden sich zweifach positiv geladene Eisenionen, die nach Zerstörung der Porphyrinringe freigesetzt werden und an die elektrisch negativ geladenen Nukleinsäuren und Nukleotide binden können und so die Aktivität der Polymerase bzw. die Schmelztemperatur der *Primer* beeinflussen können (GELFAND 1989; ROLFS et al. 1992).

Mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** isolierter RNA gelang der Nachweis des **17D-Virusgenoms** bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml. Bei Einsatz der aus **BVDV** haltigem Vollblut isolierten RNA war ein Nachweis bis zu einer Verdünnung von  $10^{-1}$  möglich. Demnach sind die mit RNA, die mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** isoliert wurde, erreichten Nachweisgrenzen in der RT-PCR im Vergleich zur Trizol-Standard-Methode um zwei bis drei Zehnerpotenzen schlechter. Unspezifische Banden traten nicht auf. Der bei Zellkulturüberstand angenommene Mangel an zellulären Nukleinsäuren scheint nicht den wesentlichen Einfluß auf die schlechtere Nachweisgrenze in der RT-PCR bei Einsatz von mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** isolierter RNA zu haben. Vermutlich geht ein größerer Teil der im Verhältnis zu den zellulären Nukleinsäuren sehr kleinen Virusnukleinsäure (ca. 10000 bis 12500 bp) bei den Waschschritten in den Durchfluß über und somit für den RT-PCR-Nachweis verloren. Eine weitere Möglichkeit könnte im Vergleich zur **Trizol-Standard-Methode** in einer weniger effizienten Lyse der behüllten Flaviviren liegen, da der Lysispuffer keine organischen Lösungsmittel wie Phenol oder Chloroform enthält. Auch eine irreversible Bindung der viralen RNA an die Glasmembran könnte für die geringere Nachweisgrenze in der RT-PCR verantwortlich sein.

Der Einsatz der **Original Purescript-Methode** bzw. ihrer **Modifikation** für die RNA-Isolierung aus Vollblutproben war problematisch. Bei Einsatz des Herstellerprotokolls gelangten Teile des ausgefällten Probenmaterials in den Überstand und somit in die RNA-Präparation. Dies führte zu häufigen Ausfällen der RT-PCR und damit zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Durch Verlängerung von Zentrifugations- und Fällungszeiten konnten reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden. Teilweise traten Hämolyse und eine Mitführung des roten Farbstoffes in die Isopropanolfällung auf, die sich durch vorsichtigeres Schütteln vermeiden ließen. Die nach dem Fällungsschritt mit Isopropanol erhaltenen Sedimente waren schlecht in DNase-/RNase freiem Wasser löslich. Vermutlich nahm durch die verlängerten Zeiten die Menge genomischer DNA in der RNA-Präparation zu. Mit aus **BVDV haltigem EDTA-Vollblut** isolierter RNA gelang ein reproduzierbarer Nachweis in der RT-PCR nur bei Einsatz unverdünnten Vollblutes.

Mit RNA, die aus mit **Lithiumheparinat** gehemmten **Blutproben** isoliert worden war, wurden im Vergleich zu der RNA aus mit **EDTA** gerinnungsgehemmten **Blutproben** schlechtere Nachweisgrenzen in der RT-PCR erreicht, die auf die PCR inhibierende Wirkung des Heparins (BEUTLER et al. 1990; HOLODNIY et al. 1991) zurückgeführt werden.

Wurde mit der **Trizol-Standard-Methode** aus mit **17D-Virus** künstlich kontaminiertem Blut RNA isoliert, gelang nur einmal der Nachweis in der RT-PCR aus einer Probe mit einem kalkulierten Titer von  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml. Bei weiteren Wiederholungen war das Ergebnis der RT-PCR jedoch stets negativ. Der RT-PCR-Nachweis bei Verwendung von RNA, die aus **BVDV** haltigem Blut isoliert worden war, war nur bei unverdünnten Blutproben erfolgreich. Bei Heparin handelt es sich um ein Polysaccharid, das sich bei der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Methode (CHOMCZYNSKI u. SACCHI 1987) zusammen mit der RNA in der wässrigen Phase anreichert und bei der anschließenden Isopropanolfällung mit der RNA ausfällt, sich durch die anschließenden Waschschrte nur wenig entfernen lässt und somit in der für die RT-PCR verwendeten RNA-Präparation enthalten bleibt.

Nach der RNA-Isolierung mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** konnte das **17D-Virusgenom** bis zu  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml und das **BVDV-Genom** mittels RT-PCR bis zu einer Verdünnung von  $10^{-1}$  nachgewiesen werden. Bei der vom **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** verwendeten Methode der Bindung der Nukleinsäuren an ein Glasmaterial mit anschließenden Waschschrten (VOGELSTEIN u. GILLESPIE 1979; BOOM et al. 1990;

COLPAN 1992) wird das Heparin effektiv entfernt, so dass es gegenüber mit EDTA gerinnungsgehemmten Vollblut zu keiner Verschlechterung der Ergebnisse kommt.

Wurde mit der **unveränderten Purescript-Methode** aus BVDV-haltigem Blut RNA isoliert, gelang sporadisch ein RT-PCR-Nachweis bis zu einer Verdünnung von  $10^{-2}$ . Wegen der Übertragung von ausgefälltem Probenmaterial in den Überstand war das Ergebnis jedoch nicht reproduzierbar. Mit RNA, die mit der **modifizierten Purescript-Methode** isoliert wurde, konnten keine positiven Signale erhalten werden.

Die Ergebnisse mit den einzelnen Vollblutproben ergeben für den Einsatz von aus Vollblut isolierter RNA in der RT-PCR folgende Schlußfolgerungen:

Mit allen getesteten RNA-Isolierungsmethoden war der Einsatz von aus **Heparin** haltigem Blut isolierter RNA für den RT-PCR-Nachweis von Virusgenomen nur bei einem sehr hohen Virusgehalt oder überhaupt nicht möglich. Für die RT-PCR sollte die RNA daher möglichst aus mit **EDTA** gerinnungshemmten Vollblutproben isoliert werden.

Das **Purescript-Kit** kann für die Isolierung von RNA aus Vollblutproben für den Einsatz in der RT-PCR nicht empfohlen werden.

Mit RNA, die mit der **Machery&Nagel Nucleo Spin II Methode** isoliert wurde, ist ein RT-PCR-Nachweis aus gepoolten Blutproben nicht möglich. Der Titer der Einzelblutprobe sollte bei  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml Probenmaterial und darüber liegen.

Die bei Verwendung von mit der **Trizol-Standard-Methode** isolierter RNA erreichte Nachweisgrenze in der RT-PCR ermöglicht den sicheren Nachweis aus Einzelblutproben wie auch aus gepoolten Vollblutproben bis zu einer positiven Probe auf 1000 negative Proben. Sie liegt damit bereits im Bereich von Nachweisgrenzen in der RT-PCR, die in der Literatur unter Verwendung empfindlicherer RT-PCR-Methoden erreicht werden. GILBERT et al. (1999) konnten z. B. mit einer nested RT-PCR aus Blut das **BVDV-Genom** mit einer Nachweisgrenze in der RT-PCR von 3 KID<sub>50</sub>/ml nachweisen.

### 5.4.3.2 Untersuchung von Vollmilch

Die für die Versuche eingesetzte Milch hatte nach Mitteilung der Diagnostikabteilung des Institutes für Virologie einen Titer von  $10^{4,3}$  KID<sub>50</sub>/ml (FREY pers. Mitteilung).

Wurde RNA, die mit der **Trizol-Standard-Methode** isoliert wurde, für die RT-PCR verwendet, gelang ein RT-PCR-Nachweis des BVDV-Genoms bis zu einer Verdünnung von  $10^{-3}$  aus der unbehandelten Vollmilch, wie auch aus der mit Natriumazid konservierten Vollmilch.

Bei Einsatz von mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** isolierter RNA konnte reproduzierbar nur aus der unverdünnten Milchprobe mit und ohne Natriumazid ein positives RT-PCR Signal erhalten werden. Bei der normalen Milch gelang einmal ein RT-PCR-Nachweis bis zu einer Verdünnung von 1:10. Die Nachweisgrenze in der RT-PCR ist im Vergleich zur **Trizol-Standard-Methode** um drei Zehnerpotenzen schlechter. Für die RNA-Isolierung für einen direkten RT-PCR-Nachweis des BVDV-Virusgenoms aus Tankmilchproben ohne vorhergehende Aufkonzentrierung durch Gewinnung der somatischen Zellen erscheint das Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit daher ungeeignet.

Mit RNA, die mit der **Original-Purescript-Methode** isoliert wurde, konnte in der RT-PCR nie ein positives Signal detektiert werden. Bei Einsatz der **modifizierten Purescript-Methode** für die RNA-Isolierung gelang mit der RNA in der RT-PCR einmal der Genomnachweis aus unverdünnter BVDV-positiver Vollmilch, wobei die entstandene Bande nur sehr schwach war. Bei den Wiederholungen war das Ergebnis jedoch stets negativ. Damit wurde mit dem **Purescript-Kit** das schlechteste Ergebnis erreicht.

Die **Trizol-Standard-Methode** ist somit die Methode der Wahl für die RNA-Isolierung für den RT-PCR-Nachweis des BVDV-Genoms aus frischer bzw. konservierter Vollmilch. Bei Sammelgemelken von bis zu 500 Tieren erscheint bei einem durchschnittlichen Titer von  $10^4$  bis  $10^6$  KID<sub>50</sub>/ml Milch eines persistent mit BVDV infizierten Tieres (RADWAN et al. 1995) die Methode schon jetzt ausreichend. Es kann theoretisch ein persistent virämisches Tier in einem Gemelk von 1000 Tieren detektiert werden. Die Nachweisgrenze in der RT-PCR bei einem Probenvolumen von 100 µl ist damit besser als die bisher in der Literatur erreichten Werte von einer Verdünnung von 1:640 (RADWAN et al. 1995) bzw. einem positiven Tier

auf 162 (DREW et al. 1999) bei Probenvolumina von 25 und 150 ml Milch. Durch den Einsatz empfindlicherer RT-PCRs und durch das bei der **Trizol-Standard-Methode** einfach mögliche Anheben des Probenvolumens könnten in Zukunft noch höhere Nachweisgrenzen in der RT-PCR erreicht werden, so dass die Methode auch bei größeren Milchtierbeständen in der industriellen Tierproduktion Anwendung finden könnte.

#### **5.4.3.3 Untersuchung von Vollsperma und Seminalplasma**

Mit RNA, die mit der **Trizol-Standard-Methode** aus Vollsperma und Seminalplasma gewonnen wurde, konnte das Alfort/187-Genom jeweils bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht den von ST-LAURENT et al. (1994) erreichten Nachweisgrenzen in der RT-PCR beim Nachweis von PRRSV aus Ebersperma.

Bei Verwendung von RNA, die mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** bzw. dem **modifizierten Purescript-Protokoll** von Biozym isoliert worden war, waren die RT-PCR-Ergebnisse sowohl bei Vollsperma als auch bei Seminalplasma negativ.

Für das **Machery&Nagel Nucleo Spin II Kit** liegen die Ursachen wahrscheinlich in dem bereits diskutierten Verlust viraler Nukleinsäuren durch irreversible Bindung oder Mitreißen in den Durchfluß bei den Waschschritten. Dafür spricht auch das bei Verwendung des Prinzips der Bindung an Silikapartikel für die RNA-Isolierung (BOOM et al. 1990) von OLEKSIEWICZ et al. (1998) beim Nachweis von PRRSV mittels RT-PCR aus Ebersperma Nachweisgrenzen in der RT-PCR von einer KID<sub>50</sub>/ml erreicht wurden. Bei dieser Methode bildet die Waschflüssigkeit im zentrifugalen Trennschritt den Überstand während freie RNA-Moleküle mit der an den Silikapartikeln gebundenen RNA durch die Zentrifugalkraft in das Mikroreaktionsgefäß gepresst werden und somit nicht verlorengehen können.

Bei RNA, die mit der **modifizierten Purescript-Methode** isoliert wurde, wird der RT-PCR-Nachweis vermutlich durch nicht aus der RNA-Präparation entfernte Sperma bzw. Seminalplasmahaltsstoffe wie Salze, Proteine oder genomische DNA gestört. Durch hohe Salz- und Nukleinsäurekonzentrationen bedingte unspezifische niedrig- bis hochmolekulare PCR-Amplifikate bzw. in den PCR-Ansatz überführte zelluläre DNA und RNA könnten den

von den Geldaschen ausgehenden sich über das gesamte Gel erstreckenden Hintergrund im Agarosegel erklären.

Die RNA-Isolierung mit der **Trizol-Standard-Methode** war die einzige Methode, die bei den verwendeten niedrigen Titern den Nachweis des KSPV-Genoms in der RT-PCR ermöglichte. Die künstlich kontaminierten Proben wurden auch im EU-Referenzlabor für Klassische Schweinepest in der zellkulturellen Virusisolierung untersucht. Dabei gelang der KSPV-Nachweis nur bei Seminalplasma bis zu einem kalkulierten Titer von  $10^2$  KID<sub>50</sub>/ml. Aus Vollsperma konnte KSPV zellkulturell nicht nachgewiesen werden (FLOEGEL pers. Mitteilung). Damit lag die Nachweisgrenze in der RT-PCR für Seminalplasma im Bereich der zellkulturellen Virusisolierung. Bei Vollsperma war der RT-PCR-Nachweis dem zellkulturellen Virusnachweis bereits überlegen.

Eine Steigerung der Nachweisgrenze in der RT-PCR unter Verwendung von mit der **Trizol-Standard-Methode** isolierter RNA scheint durch die Anwendung einer empfindlicheren RT-PCR ohne weitere Optimierung der **Trizol-Standard-Methode** möglich, da mittels RT-PCR das EAV bis zu Titern von 2,5 PFU /ml (GILBERT et al. 1997) und 20-200 KID<sub>50</sub>/ml (ST-LAURENT et al. 1994), das BVDV bis 4 KID<sub>50</sub>/ml (DA SILVA et al. 1995) und das PRRSV bis zu einem Titer von einer KID<sub>50</sub>/ml (OLEKSIEWICZ et al. 1998) aus Sperma nachgewiesen werden konnten. ST-LAURENT et al. (1994) und GILBERT et al. (1997) verwendeten für die RNA-Isolierung die saure Guanidinthiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (CHOM-ZCYNSKI u. SACCHI 1997) ohne weitere vorherige Aufreinigungen des Spermas. Die Empfindlichkeit der jeweiligen RT-PCR-Protokolle ist durch die Anwendung der *nested* PCR bzw. bei einfachen PCR-Reaktionen durch Zykluszahlen bis 55 wahrscheinlich besser als die Empfindlichkeit des für die eigenen Versuche eingesetzten PCR-Protokolls.

#### **5.4.3.4 Untersuchung von autoklaviertem Abwasser**

Zur Simulation von Abwasser, das einen sehr heterogenen Gehalt an organischen und anorganischem Material enthält, wurde künstlich mit 17D-Virus kontaminiertes, autoklaviertes Abwasser aus dem Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover eingesetzt. Ausgehend von den Ergebnissen der erreichten Nachweisgrenzen in der RT-PCR mit anderen komplexen Probenmaterialien wurden nur noch aus Proben mit  $10^5$ ,  $10^3$  und  $10$  KID<sub>50</sub>/ml mit der **Trizol-Standard-Methode** und dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** RNA für den Einsatz in der RT-PCR isoliert.

Wurde RNA mit der **Trizol-Standard-Methode** isoliert, konnten in der RT-PCR das 17D-Virusgenom bis  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml autoklaviertem Abwasser nachgewiesen werden.

Unter Verwendung von RNA, die mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** isoliert wurde, lag die Nachweisgrenze in der RT-PCR bei  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml.

Bei beiden Methoden traten vergleichbare unspezifische Banden auf, so dass die Ergebnisse über Restriktionsschnitt der RT-PCR-Produkte abgesichert werden mussten. Die unspezifischen Banden sind wahrscheinlich auf Nukleinsäuresequenzen aus dem autoklavierten organischen Material zurückzuführen, an denen die Primer 17D1 und/oder 17D3 binden. Die unspezifischen Amplifikate führten vermutlich zu einer Absenkung der Empfindlichkeit der PCR, so dass auch mit der Trizol-Standard-Methode nur eine Nachweisgrenze in der RT-PCR von  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml autoklaviertem Abwasser erreicht wurde. Eine Inhibition der RT-PCR durch Bestandteile des autoklaviertem Abwassers kann wegen der starken unspezifischen Signale ausgeschlossen werden. Sowohl mit der **Trizol-Standard-Methode** als auch mit dem **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** kann RNA für den Einsatz in der RT-PCR effektiv aus autoklaviertem Abwasser isoliert werden, wobei Inhibitoren eliminiert und RNasen inaktiviert werden.

Für die Untersuchung von Abwasser mittels RT-PCR ist demnach die RNA-Isolierung mit der **Trizol-Standard-Methode** in Verbindung mit einer hoch spezifischen RT-PCR bei niedrigen Titern zu empfehlen. Für höhere Titer kann auch das **Machery & Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** für die RNA-Isolierung verwendet werden.



#### 5.4.3.5 Untersuchung von Lebergewebe

Lebergewebe wurde für die RNA-Isolierung vorbereitet, indem jeweils 10 mg Lebergewebe in Trizol bzw. Lysepuffer mit einem Kunststoffpistill in einem Mikroreaktionsgefäß homogenisiert wurden. Das Homogenisieren war einfach und durch die Verwendung von Trizol bzw. Lysepuffer wurde das darin enthaltene Virus inaktiviert, so dass eventuell entstandene Aerosole nicht mehr infektiös waren. Das ist ein Vorteil gegenüber dem Homogenisieren in PBS- oder MES-Puffer.

Aus den Organhomogenisaten konnte das BVDV-Genom bis zu einer Verdünnung von  $10^{-3}$  bei RNA-Isolierung mit der **Trizol-Standard-Methode** und bis zu einer Verdünnung von  $10^{-2}$  bei Isolierung der RNA mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** sicher in der RT-PCR nachgewiesen werden. Der Virustiter in Pestivirus haltigem Organmaterial liegt zwischen  $10^4$  und  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml (SANDVIK et al. 1997; BRUSCHKE et al. 1998; STAHL unveröffentlichte Ergebnisse). Die bei RNA-Isolierung mit der **Trizol-Standard-Methode** erreichbare Nachweisgrenze in der RT-PCR geht somit bis zu 10 KID<sub>50</sub>/ml, was der erreichten Nachweisgrenze bei BVDV haltigem Organmaterial entspricht (URUNO et al. 1998) und die Nachweisgrenze von  $10^4$  KID<sub>50</sub>/ml bei KSPV haltigem Gewebe übertrifft (LIU et al 1991). Es traten bei Einsatz von mit der **Trizol-Standard-Methode** isolierter RNA in der RT-PCR wie bei den EDTA-Blutproben unspezifische Banden auf, die auf Bindung der Primer an zelluläre Nukleinsäuren und auf Veränderungen der PCR-Bedingungen durch Ionen aus Hämoglobinabbauprodukten zurückgeführt werden könnten (GELFAND 1989; ROLFS et al. 1992).

Wurde mit dem **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** isolierte RNA für den RT-PCR-Nachweis verwendet, so lag die Nachweisgrenze in der RT-PCR gegenüber der mit Trizol-Standard-Methode isolierten RNA nur um eine Zehnerpotenz schlechter. Unspezifische Banden waren nur sehr schwach erkennbar, was auf den DNase I-Abbau zellulärer DNA und die bessere Entfernung von Ionen aus der RNA-Präparation zurückgeführt wird. Dadurch ist die Spezifität und damit die Sensitivität der RT-PCR erhöht. Eine weitere Erklärung für das im Verhältnis zur **Trizol-Standard-Methode** gute Ergebnis könnte der im Lebergewebe

enthaltene hohe Gehalt zellulärer Nukleinsäuren sein, der den Effekt der irreversiblen Bindung bzw. des Wegwaschens spezifischer viraler RNA minimiert.

Ausgehend von den Ergebnissen scheinen die **Trizol-Standard-Methode** und bei einem ausreichend hohen Titer über  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml, wie er z. B. bei persistent mit BVDV infizierten Rindern (SANDVIK et al. 1997; BRUSCHKE et al. 1998; STAHL unveröffentlichte Ergebnisse) oder bei an KSPV erkrankten Schweinen (HOFMANN et al. 1994) vorliegt, auch das **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** für die RNA-Isolierung aus Organmaterial geeignet.

### **5.5 Schlussfolgerungen**

Von den für die RNA-Isolierung ausgewählten kommerziellen Kits wurden das **RNeasy Mini Kit** und das **QIAamp Kit** bereits nach dem Einsatz für die RNA-Isolierung aus 17D-Virus haltigem Zellkulturüberstand wegen schlechter Nachweisgrenzen in der RT-PCR bzw. umständlicher Handhabung von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Ebenso wurden die Modifikationen der **Trizol-Standard-Methode** mit **RNABind** bzw. **Genereleaser** nicht weiter untersucht, da sie zu keiner Verbesserung der Nachweisgrenzen in der RT-PCR gegenüber der RNA-Isolierung mit der **Trizol-Standard-Methode** führten.

Die **Purescript Methode** erwies sich im Gegensatz zu der vom Hersteller angegebenen universellen Verwendbarkeit für die Isolierung viraler RNA aus unterschiedlich beschaffenen Proben als ungeeignet.

Bei Proben unterschiedlicher Beschaffenheit mit verhältnismäßig hohen Titern sind Systeme wie das **Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit** für die RNA-Isolierung geeignet. Vorteilhaft ist hierbei ein gegenüber der **Trizol-Standard-Methode** geringerer Zeitbedarf. Außerdem sind bereits Robotersysteme (TECAN Robot & Nucleo Spin Robot Kits) auf dem Markt erhältlich, die für die Abarbeitung großer Probenaufkommen geeignet sind.

Für die Isolierung von viraler RNA zum Einsatz in der RT-PCR aus Probenmaterialien unterschiedlicher Beschaffenheit ist bei unbekanntem Titer die **Trizol-Standard-Methode** die Methode der Wahl, da sie die höchsten Nachweisgrenzen in der RT-PCR ermöglicht. Nachteilig sind der hohe Zeitaufwand, der einen Abzug erfordernde Umgang mit gefährlichen

Reagenzien und eine schlechte Automatisierbarkeit bei hohem Probenaufkommen. Ähnlich gute Ergebnisse mit auf der sauren Guanidinthiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (CHOMZCZYNSKI u. SACCHI 1997) bzw. Trizol beruhenden Methoden wurden bei vergleichenden Untersuchungen von acht RNA-Isolierungsmethoden für den RT-PCR-Nachweis aus HIV haltigem Plasma erzielt (VERHOFSTEDÉ et al. 1996).

## **5.6 Ausblick**

Die auf der Detektion viraler RNA beruhende Diagnostik nimmt in ihrer Bedeutung weiter zu. Grundlage dafür sind effiziente und schnelle Probenvorbereitungsmethoden, die entsprechend weiterentwickelt werden. Durch Automatisierung der in dieser Arbeit geschilderten Grundprinzipien zur RNA-Isolierung sind mittlerweile bereits Geräte, wie z. B. der NucliSens-Extractor (OrganonTeknika, Heidelberg), auf dem Markt, die Nukleinsäuren vollautomatisch in weniger als 45 min aus verschiedenen Probenmaterialien isolieren können. Neue Prinzipien wie Elektroelution (Bilatec, Rudolstadt) oder Elektrohybridisation (November AG, Erlangen) werden von der Industrie für die Vorbereitung von Proben für die RT-PCR zur Zeit entwickelt. Durch die weitere Entwicklung der Nanotechnik sind komplette Systeme zur Isolierung und zum Nachweis viraler RNA im Chipformat vorstellbar, wie sie z. B. für den Nachweis von bakterieller DNA und RNA bereits als Prototyp realisiert sind (CHENG et al. 1998).

## 6 Zusammenfassung - Summary

### **Methoden zur Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) zum Virusgenomnachweis mittels Polymerasekettenreaktion nach Reverser Transkription (RT-PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion wird in der medizinischen Diagnostik zunehmend zum schnellen Nachweis viraler Krankheitserreger eingesetzt. Sie ist eine *in vitro*-Technik zur Vermehrung eines spezifischen Genomfragmentes aus Desoxyribonukleinsäure (DNA). Für den Nachweis von Viren mit RNA-Genomen muss zunächst mittels Reverser Transkription (RT-PCR) komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Voraussetzung für eine erfolgreiche Amplifikation des Genoms in der RT-PCR ist, dass die virale RNA den für die Reaktionen notwendigen Enzymen und Reagenzien zugänglich gemacht wird. Zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse müssen die RNA vor Abbau und Verlust geschützt und Stoffe, die die enzymatischen Reaktionen stören, aus der Probe entfernt werden. Vor der eigentlichen RT-PCR ist daher ein Schritt zur RNA-Isolierung notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, kommerziell als Kits verfügbare RNA-Isolierungsmethoden im Vergleich mit einer vorher zu etablierenden Standardmethode zu validieren. Die Standardmethode basierte auf einer Modifikation der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des Trizol-Reagenz (GIBCO-BRL).

Um die Effizienz der RNA-Isolierungsmethoden zu vergleichen, wurde RNA aus in  $\log_{10}$ -Stufen verdünnten Virus haltigen Zellkulturüberständen und anderen klinischen bzw. künstlich kontaminierten Probenmaterialien isoliert und anschließend die Nachweisgrenze in der RT-PCR bestimmt. Als Proben kamen unterschiedlich gerinnungsgehemmtes Vollblut, Vollmilch, Sperma, Seminalplasma, Abwasser und Lebergewebe zum Einsatz. Bei den verwendeten Modellpathogenen handelte es sich um den Gelbfiebertvirusimpfstamm 17D (17D-Virus), das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD-Virus) und das Virus der Klassischen Schweinepest (KSP-Virus), die alle der Familie Flaviviridae angehören.

Zunächst wurde eine Recherche über das kommerziell verfügbare Angebot an RNA-Isolierungs-Kits in Deutschland durchgeführt. Ende 1999 boten 24 Anbieter 66 Kits zur

Isolierung von Gesamt- bzw. viraler RNA an. Die Kits beruhen auf wenigen Grundprinzipien. Am verbreitetsten war die Anwendung der sauren Guanidiniso-thiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion, gefolgt von der Bindung der RNA an Siliziumverbindung in Anwesenheit chaotroper Salze und organischer Lösungsmittel. Weiterhin wurden Salzpräzipitation zur Entfernung von DNA und Proteinen aus der RNA-Präparation oder Anionenaustauscher eingesetzt.

Vier kommerziell erhältliche Kits, die Trizol-Standard-Methode und Modifikationen der Protokolle zur Zeiteinsparung bzw. Steigerung der Nachweisgrenze wurden für die vergleichende Untersuchung ausgewählt. Auf der Bindung der RNA an Siliziummaterial basierten das RNeasy Mini Kit und das QIAamp Viral RNA Kit von Qiagen sowie das Nucleo Spin Kit von Machery & Nagel. Salzpräzipitation zur Entfernung von Proteinen und DNA wurde beim Purescript Kit von Biozym verwendet.

Die höchste Nachweisgrenze von einer KID<sub>50</sub>/ml (17D-Virus) wurde in der RT-PCR mit RNA erzielt, die mit der Trizol-Standard-Methode aus Virus haltigem Zellkulturüberstand isoliert wurde. Bei Verwendung von mit den kommerziellen Kits gewonnener RNA waren die Nachweisgrenzen um zwei bis vier log<sub>10</sub>-Titerstufen schlechter.

Für den weiteren Vergleich mit künstlich kontaminiertem (17D-Virus) bzw. klinischem Probenmaterial (BVD- und KSP-Virus) wurden das Nucleo Spin und das Purescript Kit ausgewählt. Wiederum wurden mit RNA, die mit der Trizol-Standard-Methode aus komplexen Probenmaterialien isoliert wurde, die besten Nachweisgrenzen erreicht. Die einzige Ausnahme stellte mit Heparin gerinnungsgehemmtes Vollblut dar, das künstlich mit 17D-Virus kontaminiert worden war. Das Purescript Kit erwies sich für den Einsatz mit komplexen Probenmaterialien als ungeeignet. Mit dem Nucleo Spin Kit gelang der Nachweis des jeweiligen Modellpathogenoms aus Vollblut, Vollmilch, autoklaviertem Abwasser und Lebergewebe. Die Nachweisgrenzen lagen in Abhängigkeit vom Probenmaterial um eine bis drei log<sub>10</sub>-Stufen unter den mit der Trizol-Methode erzielten Werten.

Die gegenüber den kommerziellen Kits zeitaufwendigere Trizol-Standard-Methode ist somit das zu empfehlende RNA-Isolierungsverfahren, wenn RNA für den Einsatz in der RT-PCR aus verschieden beschaffenem Probenmaterial mit vermuteten niedrigen Virustitern gewonnen werden soll. Bei hohen Virustitern kann auch das Nucleo Spin Kit eingesetzt werden.

## Summary

**Holger Matthias Scheibner**

### **Methods for isolation of ribonucleic acid (RNA) for detection of viral genomes in the polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR)**

The polymerase chain reaction (PCR) is increasingly being used for the rapid detection of viral pathogens in clinical samples. It is an *in vitro*-technique for amplification of specific genomic fragments from deoxyribonucleic acid (DNA). For detection of genome fragments from viruses with RNA genomes, the complementary DNA (cDNA) has to be synthesized by reverse transcription (RT-PCR). A prerequisite for the performance of RT-PCR is the accessibility of the RNA for the corresponding enzymes and reagents. In addition, to avoid false negative results, the RNA has to be protected from degradation and other damage, and substances that inhibit the enzymatic reactions have to be removed. From this it is evident that the conditions for RNA extraction are of crucial importance for RT-PCR.

The aim of this work was to establish the detection limits of RT-PCR using RNA extracted with different commercially available kits in comparison to an optimized standard method. The standard method was based on a modification of the guanidinium-isothiocyanate-phenol-chloroform method using the TRIZOL reagent (Gibco-BRL). RNA was extracted from  $\log_{10}$  serial dilutions of cell culture supernatants from virus infected cells, and from clinical or spiked samples. These were anticoagulated blood, milk, semen, seminal plasma, waste water and liver tissue. As model pathogens, the yellow fever vaccine strain 17D, bovine viral diarrhea (BVD) virus and classical swine fever (CSF) viruses were used.

First, in order to find which RNA extraction kits are available in Germany, a survey was performed. By the end of 1999, 24 companies offered 66 kits for the isolation of total RNA or viral RNA. The kits were based on four basic principles. Most of them used the acid guanidinium-isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. Several other kits were based on the binding of RNA to silica gel in the presence of chaotropic salts or organic solvents. Salt precipitation for separating DNA and proteins from the RNA or ion exchange resins were also used.

Four commercially available kits, the TRIZOL standard method and modifications of the protocols to shorten the incubation times or optimize sensitivity were selected. The RNeasy mini kit and the QIAamp viral RNA kit from Qiagen and the Nucleo Spin kit from Machery&Nagel were based on binding of RNA to silica gel. The Purescript kit from Biozym was based on the removal of proteins and DNA by salt precipitation.

The highest sensitivity in RT-PCR of 1 TCID<sub>50</sub>/ml (17D-virus) was obtained with RNA isolated from cell culture supernatants from virus infected cells using the TRIZOL standard method. When RNA was isolated using one of the kits, sensitivity was reduced by two to four log<sub>10</sub> dilutions.

For further comparison of RNAs isolated from spiked (17D-virus) or clinical samples (BVD and CSF virus), the Nucleo Spin and the Purescript kits were applied. Again, extraction of RNA with the TRIZOL standard method from complex samples gave the highest sensitivities in RT-PCR. The only exception was blood anticoagulated with heparin, and spiked with 17D virus. The Purescript kit was not convenient for extraction of RNA from complex samples. The RT-PCRs were positive with viral RNAs extracted using the Nucleo Spin kit from spiked and from clinical samples as are blood, milk, waste water and liver tissue. The sensitivities depended on the samples and were one to three log<sub>10</sub> dilutions less sensitive than the results obtained when RNA was isolated using the TRIZOL standard method.

The TRIZOL standard method is more time consuming than the commercially available kits, but due to its better performance with most of the samples tested, it is the recommended method when RNA genomes have to be detected by RT-PCR in complex samples with expected low virus titres. Alternatively, when the titres are relatively high, the Nucleo Spin kit can be recommended.

## 7 Literaturliste

ALANSARI, H., BROCK, K.V. u. POTGIETER, L.N. (1993):  
Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in tissue culture and sera.  
J Vet Diagn Invest, 5:148-153

ANONYMUS (1960):  
Sur la survie du virus de la peste porcine classique dans la viande de porc et dans les produits de charcuterie.  
In Bureau Interafricain pour la Sante Animale and Office International des Epizooties (Hrsg.), Documents sur la persistance des virus de certain maladies animales dans les viandes et produits animales, Muguga (Kenia) und Paris, 38-54

ANONYMUS (1990):  
Einstufung von biologischen Agenzien: Viren.  
BG Chemie, Merkblatt B004, 16-17.

ANSARI, S.A., FARRAH, S.R. u. CHAUDRY, G.R. (1992):  
Presence of human immunodeficiency virus nucleic acids in wastewater and their detection by polymerase chain reaction.  
Appl Environ Microbiol, 58:3984-3990.

APASTOLAKOS, M.J., SCHUERMAN, W.H., FRAMPTON, M.W., UTEL, M.J. u. WILLEY, J.C. (1993):  
Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction.  
Anal Biochem, 213:277-284.

AYSTA, J.E. u. COLPAN, M. (1992):  
Vorrichtung und Verfahren zur Trennung von Flüssigkeitsproben.  
Eur Pat Appl No 576602

BAKER, J.C. (1987):  
Bovine viral diarrhoea virus: a review.  
J Am Vet Med Assoc, 190:1449-1458.

BALDINO, F., CHESSELET, M.-F. u. LEWIS, M.E. (1989):  
High-resolution in situ hybridization histochemistry.  
Meth Enzymol, 168:761-777.

BALLAGI-PORDANY, A. u. BELAK, S. (1996):  
The use of mimics as internal standard to avoid false negatives in diagnostic PCR.  
Mol Cell Prob, 10:159-164.



- BANGE, R. u. VAHLENKAMP, T. (1999):  
Entwicklung einer Kompetitiven Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).  
BIOforum, (5). 271-273.
- BAZAN, J.F. u. FLETTERICK, R.J. (1989):  
Detection of trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses.  
Virology, 171:637-639.
- BAZAN, J.F. u. FLETTERICK, R.J. (1990):  
Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases.  
Semin Virol, 1:311-322.
- BEAULIEUX, F., SEE, D.M., LEPARC GOFFART, I., AYMARD, M. u. LINA, B. (1997):  
Use of magnetic beads versus guanidium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction followed by polymerase chain reaction for the rapid, sensitive detection of enterovirus RNA.  
Res Virol, 148:11-15.
- BEJ, A.K., WEE-YAO, N.G., MORGAN, S., JONES, D.D. u. MAHBUBANI, M.H. (1996):  
Detection of Viable *Vibrio cholerae* by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).  
Mol Biotech, 5:1-10
- BELAK, S. u. BALLAGI-PORDANY, A. (1993a):  
Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology.  
Vet Res Com, 17:55-72.
- BELAK, S. u. BALLAGI-PORDANY, A. (1993b):  
Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory.  
Mol Cell Probes, 7:241-248.
- BELL, D.A. u. DeMARINI, D.M. (1991):  
Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments.  
Nucleic Acids Res, 19:5079
- BERGER, S.L. u. BIRKENMIER, C.S. (1979):  
Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: Isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes.  
Biochemistry, 18:5143.
- BEUTLER, E., GELBART, T. u. KUHLE, W. (1990):  
Interference of heparin with the polymerase chain reaction.  
BioTechniques, 9:166

BLACKBURN, P. (1979):

Ribonuclease inhibitor from human placenta: Rapid purification assay.  
J Biol Chem, 254:12484

BLACKBURN, P. u. MOORE, S. (1982):

Pancreatic ribonuclease.  
In P.D. Boyer (Hrsg.), The Enzymes, New York, NY, Academic Press, 317-433.

BLACKBURN, P., WILSON, G. u. MOORE, S. (1977):

Ribonuclease inhibitor from placenta.  
J Biol Chem, 252:5904

BLUM, H.E. (1994):

Polymerasekettenreaktion -- Prinzipien und klinische Bedeutung.  
Schweiz Rundsch Med Prax, 83:1230-1234.

BOLIN, S.R. (1988):

Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhea virus.  
Am J Vet Res, 49:1040-1044.

BOLIN, S.R., McCLURKIN, A.W., CUTLIP, R.C. u. CORIA, M.F. (1985):

Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus.  
Am J Vet Res, 46:573-576.

BOLIN, S.R., MOENNIG, V., KELSO GOURLEY, N.E. u. RIDPATH, J.F. (1988):

Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups. Brief report.  
Arch Virol, 99:117-123.

BOLIN, S.R. u. RIDPATH, J.F. (1992):

Differences in virulence between noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves.  
Am J Vet Res, 53:2157-2163.

BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E. u. VAN DER NOORDAA, J. (1990):

Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids.  
J Clin Microbiol, 28:495-503.

BOS, L. (1999):

The naming of viruses: an urgent call to order.  
Arch Virol, 144:631-636.

- BRIGHTWELL, G., PEARCE, M. u. LESLIE, D. (1998):  
Development of internal controls for PCR detection of *Bacillus anthracis*.  
*Mol Cell Probes*, 12:367-77
- BRINTON, M.A. u. DISPOTO, J.H. (1988):  
Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA.  
*Virology*, 162:290-299.
- BRINTON, M.A., FERNANDEZ, A.V. u. AMATO, J. (1986):  
The 3'- nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure.  
*Virology*, 153:113-121.
- BROWN, T.T., DE LAHUNTA, A., SCOTT, F.W., KAHRS, R.F., McENTEE, K. u. 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. (1991):  
The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of the disease.  
*Arch Virol Suppl*, 3:79-96.
- BRUSCHKE, C.J., HULST, M.M., MOORMANN, R.J., VAN RIJN, P.A. u. VAN OIRSCHOT, J.T. (1997):  
Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species.  
*J Virol*, 71:6692-6696.
- BRUSCHKE, C.J., WEERDMEESTER, K., VAN OIRSCHOT, J.T. u. 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.
- BÜTTNER, M. u. AHL, R. (1998):  
Klassische Schweinepest.  
*Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 26:278-286.
- BYRNE, B.C., SNINSKY, J., LI, J.J. u. POIESZ, B.J. (1988):  
Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification.  
*Nucl Acids Res*, 16:4165.
- CAMMACK, N. u. GOULD, E.A. (1986):  
Antigenic analysis of yellow fever virus glycoproteins: use of monoclonal antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays.  
*J Virol Methods*, 13:135-142.

CANAL, C.W., HOTZEL, I., DE ALEIDA, L.L., ROEHE, P.M. u. MASUDA, A. (1996):  
Differtiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription  
and polymerase chain reaction (RT-PCR).  
*Vet Microbiol*, 48:373-379.

CASARO, A.P.E., KENDRICK, J.W. u. KENNEDY, P.C. (1971):  
Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhea-mucosal disease virus.  
*Am J Vet Res*, 32:1543-1562.

CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. u. RICE, C.M. (1990a):  
Flavivirus genome organization, expression, and replication.  
*Annu Rev Microbiol*, 44:649-688.

CHAMBERS, T.J., McCOURT, D.W. u. RICE, C.M. (1990b):  
Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete  
polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyklonal antisera.  
*Virology*, 177:159-174.

CHAMBERS, T.J., NESTOROWICZ, A., AMBERG, S.M. u. RICE, C.M. (1993):  
Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-  
NS3 complex formation, and viral replication.  
*J Virol*, 67:6797-6807.

CHANG, G.J., TRENT, D.W., VORNDAM, A.V., VERGNE, E., KINNEY, R.M. u.  
MITCHELL, C.J. (1994):  
An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-  
enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses.  
*J Clin Microbiol*, 32:477-483.

CHENG, J., SHELDON, E.L., WU, L., URIBE, A., GERRUE, L.O., CARRINO, J.,  
HELLER, M.J. u. O'CONNELL, J.P. (1998):  
Preparation and hybridization analysis of DNA/ RNA from E.coli on microfabricated  
bioelectronic chips.  
*Nat Biotechnol*, 16:541-546.

CHEVILLE, N.F. u. MENGELING, W.L. (1969):  
The pathogenesis of chronic hog cholera (swine fever). Histologic, immunofluorescent, and  
electron microscopic studies.  
*Lab Invest*, 20:261-274.

CHEVILLE, N.F., MENGELING, W.L. u. ZINOBER, M.R. (1970):  
Ultrastructural and immunofluorescent studies of glomerulonephritis in chronic hog cholera.  
*Lab Invest*, 22:458-467.

- CHEYROU, A., GUYOMARC, C., JASSERAND, P. u. BLOUIN, P. (1991):  
Improved detection of HBV DNA by PCR after microwave treatment of serum.  
*Nucl Acids Res*, 19:4006.
- CHIEN, A., EDGAR, D.B. u. TRELA, J.M. (1976):  
Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*.  
*J Bacteriol*, 127:1550-1557.
- CHIRGWIN, J.M., PRZYBLYA, A.E., MACDONALD, R.J. u. RUTTER, W.J. (1979):  
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.  
*Biochemistry*, 18:5294-5299.
- CHOMCZYNSKI, P. u. MACKEY, K. (1995):  
Substitution of chloroform by bromochloropropane in the single-step method of RNA isolation.  
*Anal Biochem*, 225:163-164.
- CHOMCZYNSKI, P. u. SACCHI, N. (1987):  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
*Anal Biochem*, 162:156-159.
- CHOO, Q.-L., KUO, G., WEINER, A.J., OVERBY, L.R., BRADLEY, D.W. u. HOUGHTON, M. (1989):  
Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.  
*Science*, 244:359-362.
- CHOU, Q., RUSSEL, M., BIRCH, D.E., RAYMOND, J. u. BLOCH, W. (1992):  
Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications.  
*Nucl Acids Res*, 20:1717-1723.
- CHOW, V.T., SEAH, C.L. u. CHAN, Y.C. (1993):  
Use of NS3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other flaviviruses.  
*Arch Virol*, 133:157-170.
- CHOW, V.T., YONG, R.Y., NGOH, B.L. u. CHAN, Y.C. (1997):  
Automated type specific ELISA probe detection of amplified NS3 gene products of dengue viruses.  
*J Clin Pathol*, 50:346-349.
- CHRISTOPHER-HENNIGS, J., NELSON, E.A., NELSON, J.K., HINES, R.J., SWENSON, S.L., HILL, H.T., ZIMMERMANN, J.J., KATZ, J.B., YAEGER, M.J., CHASE, C.C. u. ET AL. (1995):  
Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR.  
*J Clin Microbiol*, 37:1740-1734.

- CLINE, J. et al. (1996):  
PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases.  
Nucleic Acids Res, 24:3546-3551.
- COGGINS, L. u. SHEFFY, B.E. (1961):  
A serological (neutralization) test for hog cholera.  
Proc 65th Ann Meet of U S Livestock San Assoc, 8-12.
- COLLETT, M.S. (1994):  
Rundschreiben vom 12. Sept. 1994. Standardisierung der Nomenklatur der Pestiviren,  
vorgeschlagen von der Flaviviridae Study Group of the International Committee on the  
Taxonomy of Viruses. COLLETT, M.
- COLLETT, M.S., LARSON, R., BELZER, S.K. u. RETZEL, E. (1988a):  
Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus.  
Virology, 165:200-208.
- COLLETT, M.S., LARSON, R., GOLD, C., STRICK, D., ANDERSON, D.K. u. PURCHIO,  
A.F. (1988b):  
Molecular cloning and nucleotide sequencing of the pestivirus bovine viral diarrhea virus.  
Virology, 165:191-199.
- COLLETT, M.S., WISKERCHEN, M.A., WELNIAK, E. u. BELZER, S.K. (1991):  
Bovine viral diarrhea virus genomic organization.  
In B. LIESS, V. MOENNIG, J. POHLENZ u. G. TRAUTWEIN (Hrsg.), Ruminant pestivirus  
infections. Virology, pathogenesis and perspectives of prophylaxis, Wien, New York, Verlag  
Springer, 19-27.
- COLPAN, M. (1992):  
Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren.  
Eur Pat Appl No 616639
- COLPAN, M. u. SCHORR, J. (1995):  
Chromatographische Isolierung von Nucleinsäuren.  
Eur Pat Appl No 743948
- CONE, R.W., HOBSON, A.C. u. HUANG, M.W. (1992):  
Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions.  
J Clin Microbiol, 30:3185-3189.
- CORAPI, W.V., ELLIOT, R.D., FRENCH, T.W., ARTHUR, D.G., BEZEK, D.M. u.  
DUBOVI, E.J. (1990):  
Thrombocytopenia and haemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus.  
J Am Vet Med Assoc, 196:590-596.

- CORAPI, W.V., FRENCH, T.W. u. DUBOVI, E.J. (1989):  
Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus.  
J Virol, 63:3934-3943.
- CORDELLIER, R. (1991):  
The epidemiology of yellow fever in Western Africa.  
Bull World Health Organ, 69:73-84.
- COX, R.A. (1968):  
The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids.  
Methods Enzymol, 12:120-129.
- DA SILVA, N., ZARDOYA, R., SANTURDE, G., SOLANA, A. u. CASTRO, J.M. (1995):  
Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen.  
J Virol Methods, 55:209-218.
- DAHLE, J. u. LIESS, B. (1993):  
Complex trapping blocking (CTB)-ELISA for the detection of hog cholera virus specific antigen.  
In Application of ELISA-techniques for detection of swine fever (hog cholera) antibodies  
Nat Vet Research Institute, Pulawy, Poland, 43-48.
- DAHLE, J. u. LIESS, B. (1995):  
Comparative study with cloned classical swine fever virus strains ALFORT and GLENTORF:  
Clinical, pathological, virological and serological findings in weaner pigs.  
Wien Tierärztl Mschr, 82:
- DAHLE, J., SCHAGEMANN, G., MOENNIG, V. u. LIESS, B. (1993):  
Clinical, virological and serological findings after intranasal inoculation of pigs with bovine viral diarrhoea virus and subsequent intranasal challenge with hog cholera virus.  
J Vet Med B, 40:46-54.
- DANG, C. u. JAYASENA, S.D. (1996):  
Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR.  
J Mol Biol, 264:268-278.
- DARCELL, C. le Q. u. COULTER, G.H. (1976):  
IBR virus neutralizing substance in bull seminal fluid and its removal prior attempts at virus isolation from semen.  
Can Vet J 17:318-320

- DE BRITO, T., SIQUEIRA, S.A., SANTOS, R.T., NASSAR, E.S., COIMBRA, T.L. u. ALVES, V.A. (1992):  
Human fatal yellow fever. Immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart.  
Pathol Res Pract, 188:177-181.
- De SCHWEINITZ, E.A. u. DORSET, M. New facts concerning the etiology of hog cholera.  
U.S. Department of Agriculture. 157-162.
- DE SMIT, A.J., BOUMA, A., TERPSTRA, C. u. VAN OIRSCHOT, J.T. (1999):  
Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination.  
Vet Microbiol, 67:239-249.
- DEPNER, K., BAUER, T. u. LIESS, B. (1992):  
Thermal and pH stability of pestiviruses.  
Rev Sci Tech Off Int Epiz, 11:885-893.
- DEPNER, K., MÜLLER, A., DAHLE, J. u. LIESS, B. (1994):  
Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Schweinepest-Antikörpern mittels zwei verschiedener serologischer Testverfahren.  
13 Arbeits- u Fortbildungstagung der AVID, Sept 1994 Anlage 12, 1-8.
- DEUBEL, V., HUERRE, M., CATHOMAS, G., DROUET, M.T., WUSCHER, N., LE GUENNO, B. u. WIDMER, A.F. (1997):  
Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case.  
J Med Virol, 53:212-217.
- DEUBEL, V., MOULY, V., SALAUN, J.J., ADAM, C., DIOP, M.M. u. DIGOUTTE, J.P. (1983):  
Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with standard tests used to detect yellow fever virus antibodies.  
Am J Trop Med Hyg, 32:565-568.
- DIAZ DE ARCE, H., NUNEZ, J.I., GANGES, L., BARRERAS, M., FRIAS, M.T. u. SOBRINO, F. (1998):  
An RT-PCR assay for the specific detection of classical swine fever virus in clinical samples.  
Vet Res, 29:431-440.
- DIEFFENBACH, C. (1993):  
Setting up a PCR laboratory.  
PCR Methods and Applications, 3:2-7.
- DIVIZA, M., RUSCIO, V., DEGENER, A.M. u. PANA, A. (1998):  
Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridisation.  
New Microbiol, 21:161-167.



DO, N. u. ADAMS, R.P. (1991):

A simple technique for removing plant polysaccharides contaminants from DNA.  
BioTechniques, 10:163-166.

DONE, J.T., TERLECKI, C., RICHARDSON, C., HARKNESS, J.W., SANDS, J.J.,  
PATTERSON, D.S.P., SWEASEY, D., SHAW, I.G., WINKLER, C.E. u. DUFFELL, S.J.  
(1980):

Bovine virus diarrhea - mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following  
maternal infection.

Vet Rec, 106:473-479.

DONIS, R., CORAPI, W. u. DUBOVI, E.J. (1988):

Neutralizing monoclonal antibodies to bovine diarrhea virus bind to 56K to 58K glycoprotein.  
J Gen Virol, 69:77-86.

DONIS, R.O. u. DUBOVI, E.J. (1987):

Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic  
biotypes of bovine virus diarrhea -mucosal disease virus.

Virology, 158:168-173.

DONNACHIE, E., SECCOMBE, D.W., SHACKLETON, C.R., FORWARD, A.D., ERB, S.,  
DAI, L.H. u. SCUDAMORE, C.H. (1989):

Internal standardization for the monitoring of extraction efficiencies during the isolation and  
purification of liver mRNA.

Transplant Proc, 21:1340-1341.

DRAGON, E. (1993):

Handling Reagents in the PCR Laboratory.

PCR Methods and Applications, 3:8-9.

DREW, T.W., YAPP, F., 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

DUNNE, H.W. (1973):

Hog cholera (European swine fever).

Adv Vet Med 17:315-359

DURHAM, P.J.K. u. HASSARD, L.E. (1990):

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to bovine viral diarrhea  
virus.

Vet Microbiol, 22:1-10.

- ELBERS, K., TAUTZ, N., BECHER, P., STOLL, D., RÜMENAPF, T. u. THIEL, H.-J. (1996):  
Processing in the Pestivirus E2-NS2 Region: Identification of Proteins p7 and E2p7.  
J Virol, 70:4131-4135.
- ELDADAH, Z.A., ASHER, D.M., GODEC, M.S., POMEROY, K.L., GOLDFARB, L.G., FEINSTONE, S.M., LEVITAN, H., GIBBS, C.J., JR. u. GAJDUSEK, D.C. (1991):  
Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction.  
J Med Virol, 33:260-267.
- ERLICH, H.A., GELFAND, D.H. u. SNINSKY, J.J. (1991):  
Recent advances in the polymerase chain reaction.  
Science, 252:1643-1651
- FALGOUT, B., CHANOCK, R. u. LAI, C.J. (1989):  
Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a.  
J Virol, 63:1852-1860.
- FINCKH, U., LINGENFELTER, P.A. u. MYERSON, D. (1991):  
Producing single-stranded DNA probes with the Taq DNA polymerase: A high yield protocol.  
BioTechniques 10: 35-39.
- FLOEGEL, G., WEHREND, A., DEPNER, K.R., FRITZMEIER, J., WBAERSKI, D. u. MOENNIG, V. (2000):  
Detection of Classical Swine Fever virus in semen of infected boars.  
Vet Microbiol, in press.
- FRAZIER, M.L., MARS, W., FLORINE, D.L., MONTAGNA, R.A. u. SAUNDERS, G.F. (1987):  
Efficient extraction of RNA from mammalian tissue.  
Mol Cell Biochem, 56:113-122.
- FREY, H.R., LIESS, B., RICHTER-REICHEL, H.B., VON BENTEN, K. u. TRAUTWEIN, G. (1980):  
Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. I. virological and serological studies.  
Zbl Vet Med B, 27:154-164.
- FRITZMEIER, J., GREISER-WILKE, I., HAAS, L., PITUCO, E., MOENNIG, V. u. 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. u. 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.

FROHMAN, M.A., DUSH, M.K. u. MARTIN, G.R. (1988):

Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer.

Proc Natl Acad Sci, 85:8998-9002.

GANTZER, C., MAUL, A., AUDIC, J.M. u. SCHWARTZBROD, L. (1998):

Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and Bacteroides fragilis phages in treated wastewater.

Appl Environ Microbiol, 64:4307-4312.

GANTZER, C., MENARD, D., LINA, B., MAUL, A., LE GUYADER, S., THOUVENOT, D., AYMARD, M., SCHWARTZBROD, L. u. KOPECKA, H. (1999):

Enterovirus genome detection in wastewater: multi centric evaluation of a commercial kit.

Zentralbl Hyg Umweltmed, 202:29-39.

GANTZER, C., SENOUCI, S., MAUL, A., LEVI, Y. u. SCHWARTZBROD, L. (1997):

Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR.

J Virol Methods, 65:265-271.

GEIGER, W. (1939):

Schweinepest.

In Gildemeister, E., Haagen, E., Waldmann, O. (Hrsg.) Handbuch der Viruskrankheiten, Jena, Verlag von Gustav Fischer, 546-589.

GELFAND, D.H. (1989):

Taq DNA Polymerase.

In H.A. Erlich (Hrsg.) PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification, New York, NY, Stockton Press, 17-22.

GILBERT, S.A., BURTON, K.M., PRINS, S.E. u. DEREGT, D. (1999):

Typing of bovine viral diarrhoea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR.

J Clin Microbiol, 37:2020-2023.

GILBERT, S.A., TIMONEY, P.J., McCOLLUM, W.H. u. DEREGT, D. (1997):

Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay.

J Clin Microbiol, 35:2181-2183.

- GILGEN, M., GERMANN, D., LUTHY, J. u. HUBNER, P. (1997):  
Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples.  
Int J Food Microbiol, 37:189-199.
- GILLESPIE, J.H., BAKER, J.A. u. McENTEE, K. (1960):  
A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus.  
Cornell Vet, 50:73-79.
- GILLESPIE, J.H., COGGINS, L., THOMPSON, J. u. BAKER, J.A. (1961):  
Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease.  
Cornell Vet, 51:155-159.
- GILLESPIE, J.H., SHEFFY, B.E. u. BAKER, J.A. (1960):  
Propagation of hog cholera virus in tissue culture.  
Proc Soc Exptl Biol and Med, 105:679-681.
- GORBALENYA, A.E., DONCHENKO, A.P., KOONIN, E.V. u. BLINOV, V.M. (1989a):  
N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases.  
Nucleic Acid Res, 17:3889-3897.
- GORBALENYA, A.E., KOONIN, E.V., DONCHENKO, A.P. u. BLINOV, V.M. (1989b):  
Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes.  
Nucleic Acids Res, 17:4713-4729.
- GORBALENYA, A.G., KOONIN, E.V. u. LAI, M.-C. (1991):  
Putative papain-related thiol proteases of positive - strand RNA viruses.  
FEBS Lett, 288:201-205.
- GOTTSCHALK, E.W.E.C. (1991):  
Entwicklung eines Enzymimmuntests zum Nachweis von Antigenen des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) in der Leukozytenfraktion virämischer Rinder.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Dissertation
- GOULD, E.A., BUCKLEY, A. u. CAMMACK, N. (1985):  
Use of the biotin-streptavidin interaction to improve flavivirus detection by immunofluorescence and ELISA tests.  
J Virol Methods, 11:41-48.
- GREISER-WILKE, I., DITTMAR, K.E., LIESS, B. u. MOENNIG, V. (1992):  
Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses.  
J Gen Virol, 73:47-52.

- GREISER-WILKE, I., FREY, H.-R. u. 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
- GREISER-WILKE, I. u. FRIES, R. (1994):  
Methoden zum Nachweis viraler Kontaminationen in Lebensmitteln tierischer Herkunft.  
Dtsch tierärztl Wschr, 101:249-300.
- GREISER-WILKE, I., GRUBER, A.D., FRIES, R. u. MOENNIG, V. (1995):  
Nachweis viraler Nukleinsäure in experimentell kontaminiertem Brühwurstbrät mit Hilfe der  
Polymerase-Kettenreaktion.  
Arch f Lebensmittelhygiene, 46:1-24.
- GREISER-WILKE, I., HAAS, L., DITTMAR, K., LIESS, B. u. MOENNIG, V. (1993):  
RNA insertions and gene duplications in the nonstructural p125 region of pestivirus strains  
and isolates in vitro and in vivo.  
Virology, 193:977-980.
- GREISER-WILKE, I., MOENNIG, V., COULIBALY, C.O.Z., LEDER, L., DAHLE, J. u.  
LIESS, B. (1990):  
Identification of conserved epitopes on hog cholera virus protein.  
Arch Virol, 111:213-225.
- GREISER-WILKE, I. u. HAAS, L. (1999):  
Entstehung „neuer“ viraler Zoonosen.  
Dtsch Tierärztl. Wschr. 106:332-338.
- GRIFFIN, D.W., Gibson, C.J., LIPP, E.K., RILEY, K., PAUL, J.H. u. ROSE, J.B. (1999):  
Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by  
standard methods in the canals of the Florida Keys.  
Appl Environ Microbiol, 65:4118-4125.
- GRUBER, A.D., GREISER-WILKE, I., HAAS, L., HEWICKER-TRAUTWEIN, M. u.  
MOENNIG, V. (1993b):  
Detection of bovine viral diarrhoea virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded brain  
tissue by nested polymerase-chain reaction.  
J Virol Meth, 43:309-320.
- GUNN, H.M. (1993):  
Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus.  
Vet Rec, 132:584-585.

- GUTEKUNST, D.E. u. MALMQUIST, W.A. (1963):  
Separation of a soluble antigen and infectious particles of bovine viral diarrhoea viruses and their relationship to hog cholera.  
Can J Comp Med Vet Sci, 27:121-123.
- HAAS, L. (1992):  
Die Polymerase-Kettenreaktion in der Virusdiagnostik: Chancen und Grenzen.  
Tierärztl Umschau, 47:223-227
- HAFEZ, S.M. u. LIESS, B. (1972):  
Studies on bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties.  
Acta virol, 16:399-408.
- HAHN, C.S. u. LIESS, B. (1972):  
Studies on bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus. I. Cultural behaviour and antigenetic relationship of some strains.  
Acta virol, 16:388-398.
- HALL, W.C., CROWELL, T.P., WATTS, D.M., BARROS, V.L., KRUGER, H., PINHEIRO, F. u. PETERS, C.J. (1991):  
Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis.  
Am J Trop Med Hyg, 45:408-417.
- HAMEL, A.L., WASYLYSHEN, M.D. u. NAYAR, G.P. (1995):  
Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay.  
J Clin Microbiol, 33:287-291.
- HARDING, M.J., PRUD'HOMME, I., GRADIL, C.M., HECKERT, R.A., RIVA, J., McLAURIN, R., DULAC, G.C. u. VYDELINGUM, S. (1996):  
Evaluation of nucleic acid amplification methods for the detection of hog cholera virus.  
J Vet Diagn Invest, 8:414-419.
- HAVE, P. (1984):  
Detection of antibodies against swine fever virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).  
Acta vet scand, 25:462-465.
- HAYASHI, Y., KANEKO, S., JOMORI, T., KOBARA, Y., SUZUKI, E., TASAKA, F., MURAKAMI, S., KOBAYASHI, K. u. MITANI, T. (1994):  
A simple single-tube procedure of PCR assay for the detection of hepatitis C virus RNA.  
Res Virol, 145:123-128.

HECKERT, H.P., HOFMANN, W., HOLLBERG, W., KÖRNER, E. (1998):  
Praxisorientierte Bekämpfung der BVD-Virusinfektion in Rinderbeständen.  
Tierärztl Prax, 26:193-199.

HEINRICH, M. (1991):  
PCR Carry-Over.  
BFE, 8:594-597.

HEINZ, F.X. u. KUNZ, C. (1980):  
Chemical crosslinking of tick-borne encephalitis virus and its subunits.  
J Gen Virol, 46:301-309.

HEINZ, F.X. (1986):  
Epitope mapping of flavivirus glycoproteins.  
Adv Virus Res, 31:103-168.

HERTIG, C., PAULI, U., ZANONI, R. u. PETERHANS, E. (1991):  
Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction.  
Vet Microbiol 26:65-76.

HIGUCHI, R. (1989):  
Rapid, efficient extraction for PCR from cells or blood.  
Amplifications A Forum for PCR User, 2:1-3.

HILFENHAUS, J. (1995):  
Virussicherheit von Plasmaproteinen: Möglichkeiten und Grenzen der PCR.  
Die gelben Hefte, 35:60-67.

HOFMANN, M.A., BRECHTBUHL, K. u. STAUBER, 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.

HOFMANN, M.A., TRATSCHIN, J.D., BRECHTBUHL, K. u. GRIOT, C. (1995):  
Tierseuchendiagnostik mittels PCR.  
Schweiz Arch Tierheilkd, 137:531-536.

HOLM JENSEN, M. (1981):  
Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine  
serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assay.  
Acta vet scand, 22:85-98.

HOLODNIY, M., KIM, S., KATZENSTEIN, D., KONRAD, M., GROVES, E. u. MERIGAN,  
T.C. (1991):  
Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin.  
J Clin Microbiol, 29:676-679.

HOOFT VAN IDDEKINGE, B.J.L., VAN WAMEL, J.L.B., VAN GENNIP, H.G.P. u. MOORMANN, R.J.M. (1992):

Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhoea virus infections in cattle.

Vet Microbiol, 30:21-34.

HOPKINS, S.G. u. DiGIACOMO, R.F. (1997):

Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle.

Vet Clin North Am Food Anim Pract, 13:107-128.

HORZINEK, M.C., REZKO, E. u. PETZOLDT, K. (1967):

On the morphology of hog cholera virus.

Arch Ges Virusforsch, 21:475-478.

HOTZEL, H., DEMUTH, B., SACHSE, K., PFLITSCH, A. u. PFUTZNER, H. (1993):

Detection of Mycoplasma bovis using in vitro deoxyribonucleic acid amplification.

Revue-Scientifique-et Technique-Office-International-des-Epizooties. 12:581-591.

HOWARD, C.R., ELLIS, D.S. u. SIMPSON, D.I. (1984):

Exotic viruses and the liver.

Semin Liver Dis, 4:361-374.

HULST, M.M., HIMES, G., NEWBIGIN, E.D. u. MOORMANN, R.J.M. (1994):

Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease.

Virology, 200:558-565.

HYERA, J.M.K., DAHLE, J., LIESS, B., MOENNIG, V. u. FREY, H.-R. (1987):

Gewinnung hochtitriger Antiseren gegen BVD aus Schweinen und ihre Verwendung für direkte Immunfluoreszenz- und Immunperoxidase-Techniken.

Dtsch tierärztl Wschr, 94:576-580.

JACKSON, D.P., HAYDEN, J.D. u. QUIRKE (1991):

Improving the sensitivity and specificity of PCR amplification: Nested PCR.

In McPherson, M.J.P., QUIRKE, P. u. TAYLOR, G.R. (Hrsg.) PCR: A practical approach.

Oxford University Press, Oxford, UK, 42-43.

JACKSON, D.P., LEWIS, F.A., TAYLOR, G.R., BOYLSTON, A.W. u. QUIRKE, P. (1990):

Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction.

J Clin Pathol, 43:499-504.

JONES, E.M. u. WILSON, D.C. (1972):

Clinical features of yellow fever cases at Vom Christian Hospital during the 1969 epidemic on the Jos Plateau, Nigeria.

Bull World Health Organ, 46:653-657.



JOTHIKUMAR, N., APARNA, K., KAMATCHIAMMAL, S., PAULMURUGAN, R., SARAVANADEVI, S. u. KHANNA, P. (1993):

Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction.

Appl Environ Microbiol, 59:2558-2562.

KADEN, V., HUBERT, P., STREBELOW, G., LANGE, E., STEYER, H. u. STEINHAGEN, P. (1999):

Vergleich labordiagnostischer Methoden zum Nachweis einer Infektion mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) in der frühen Infektionsphase: experimentelle Studie.

Berl Münch Tierärztl Wschr, 112:52-57.

KAERBER, G. (1931):

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Arch exp Pathol Pharmacol, 162:480.

KAHRS, R.F. (1968):

The relationship of bovine viral diarrhea - mucosal disease to abortion in cattle.

J Am Vet Med Assoc, 153:1652-1655.

KAHRS, R.F. (1973):

Effects of bovine viral diarrhea on the developing fetus.

J Am Vet Med Assoc, 163:877-878.

KAHRS, R.F., GIBBS, E.P.J. u. LARSEN, R.E. (1980):

The search for viruses in bovine semen: a review.

Theriogenology 14:151-165.

KAIJALAINEN, S. et al. (1993):

An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose.

Nucl Acids Res, 21:2959-2960.

KAMER, G. u. ARGOS, P. (1984):

Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal, and bacterial viruses.

Nucleic Acids Res, 12:7269-7282.

KAWASAKI, E.S. (1989):

Amplification of RNA sequences via complementary DNA (cDNA).

Amplifications A Forum for PCR Users, 2:4-6.

KEMP, D.J., SMITH, D.B., FOOTE, S.J., SAMARS, N. u. PETERSON, M.G. (1989):

Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reaction.

Proc Natl Acad Sci, 86:2423-2427.

- KENDRICK, J.W. (1971):  
Bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection in pregnant cows.  
*Am J Vet Res*, 32:533-544.
- KING, A.A. u. HARKNESS, J.W. (1975):  
Viral contamination of foetal bovine serum.  
*Vet Rec*, 97:16.
- KOONIN, E.V. (1993):  
Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein in flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus.  
*J Gen Virol*, 74:733-740.
- KOTEWICZ, M.L. (1988):  
Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity.  
*Nucl Acids Res*, 16:265-277.
- KREEFT, J., GREISER-WILKE, I., MOENNIG, V. u. HORZINEK, M.C. (1990):  
Attempts to characterize bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine.  
*Dtsch tierärztl Wschr*, 97:63-65.
- KWOK, S. u. HIGUCHI, R. (1989):  
Avoiding false positives with PCR.  
*Nature*, 339:237-238.
- LAHIRI, D.K., BYE, S., NÜRNBERGER, J.I., HODES, M.E. u. CRISP, M. (1992):  
A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested.  
*J Biochem Biophys Methods*, 25:193-205.
- LANG-REE, J.R., VATN, T. u. LØKEN, T. (1994):  
Transmission of bovine virus by rectal examination.  
*Vet Rec*, 135:412-413.
- LANTZ, P.G., HAHN HAEGERDAL, B. u. RADSTROEM, P. (1994):  
Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens.  
*Trends in Food Science & Technology*, 5:384-389.
- LECOMTE, C., PIN, J.J., DE MOERLOOZE, L., VANDERBERG, D., LAMBERT, A.F., PASTORET, P. u. CHAPPIUS, G. (1990):  
ELISA detection of bovine viral diarrhoea virus specific antibodies using recombinant antigen and monoclonal antibodies.  
*Vet Microbiol*, 23:193-201.

- LEFORBAN, Y., EDWARDS, S., IBATA, G. u. VANNIER, P. (1990):  
A blocking ELISA to differentiate hog cholera virus antibodies in pig sera from those due to other pestiviruses.  
Ann Rech Vet, 21:119-129.
- LEMA, M.W., BROWN, A. u. CALKINS, J.H. (1994):  
A general method for extraction of DNA from bacteria.  
J Microbiol Methods, 19:167-172.
- LIEBLER, E.M., JOHANNSEN, U. u. POHLENZ, J. (1995):  
Die hämorrhagische Verlaufsform der akuten bovinen Virusdiarrhoe: Literaturübersicht und Fallbericht.  
Tierärztl Prax, 23:18-25.
- LIEBLER, E.M., WASCHBÜSCH, J., POHLENZ, J., MOENNIG, V. u. LIESS, B. (1991):  
Distribution of antigen of noncytopathogenic and cytopathogenic bovine virus diarrhea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease.  
Arch Virol [Suppl. 3], 109-124.
- LIESS, B. (1967):  
Die ätiologische Abgrenzung selbständiger Virusinfektionen, insbesondere der Virusdiarrhoe - Mucosal Disease, im sogenannten " Mucosal-Disease-Komplex " bei Rindern.  
Dtsch tierärztl Wschr, 74:46-49.
- LIESS, B. (1981):  
Hog cholera.  
In Anonymous, Virus diseases in food animals. A world geography of epidemiology and control, vol II., London: Academic Press, 627-650.
- LIESS, B. (1987):  
Viruspersistenz- ein Schlüsselphänomen der BVD-Virusinfektion.  
Dtsch tierärztl Wschr, 95:264-266.
- LIESS, B. (1990):  
Bovine viral diarrhea virus.  
In Z. Dinter u. B. Morein (Hrsg.), Virus infections of vertebrates, Vol.3: Virus infections of ruminants, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 247-266.
- LIN, C., CHAMBERS, T.J. u. RICE, C.M. (1993):  
Mutagenesis of conserved residues at the yellow fever virus 3/4A and 4B/5 dibasic cleavage sites: effects on cleavage efficiency and polyprotein processing.  
Virology, 192:596-604.

LINNEN, J. u. ET AL. (1996):

Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion transmissible agent.

Science, 271:505-508.

LIPKIN, E., SHALOM, A., KHATIB, H., SOLLER, M. u. FRIEDMANN, A. (1993):

Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. Journal of Dairy Science; 76:2025-2032.

LIU, S.T., LI, S.N., WANG, D.C., CHANG, S.F., CHIANG, S.C., HO, W.C., CHANG, Y.S. u. LAI, S.S. (1991):

Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction.

J Virol Methods, 35:227-236.

LOHR, C.H., EVERMANN, J.F. u. WARD, A.C. (1983):

Investigation of dams and their offspring inoculated with a vaccine contaminated by bovine viral diarrhea virus.

Vet Med Small Anim Clin, 78:1263-1266.

LUDWIG, G.V. u. IACONO-CONNORS, L.C. (1993):

Insect-transmitted vertebrate viruses: flaviviridae.

In Vitro Cell Dev Biol Anim, 29A, 296-309.

LUGARO, G., CAMPAGNARI, F., MORETTI, R. u. CASELLATO, M.M. (1988):

Inhibition of DNA polymerization and DNA transcription to RNA by seminal plasma peptides.

Biochim Biophys Acta 950:420-428.

LYNAS, C., COOK, S.D., LAYCOOK, K.A., BRADFIELD, J.B.W. u. MAITLAND (1989):

Detection of latent virus mRNA in tissues using the polymerase chain reaction.

J Path 157:285-289

LYONS, J. (1992):

The polymerase chain reaction as cancer diagnostics.

Cancer Suppl, 69:1527-1531.

MANDL, C.W., GUIRAKHOO, F., HOLZMANN, H., HEINZ, F.X. u. KUNZ, C. (1989a):

Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model.

J Virol, 63:564-571.

MANDL, C.W., HEINZ, F.X. u. KUNZ, C. (1988):

Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (Western Subtype) and a comparative analysis with other flaviviruses.

Virology, 166:197-205

- MANDL, C.W., HEINZ, F.X., STÖCKL, E. u. KUNZ, C. (1989b):  
Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses.  
*Virology*, 173:291-301.
- MASON, P.W. (1989):  
Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells.  
*Virology*, 169:354-364.
- MATSUURA, Y. u. MIYAMURA, T. (1996):  
The molecular virology of hepatitis C virus.  
*Semin Virol*, 4:297-304.
- MAYO, M.A. u. PRINGLE, C.R.  
Virus taxonomy -- 1997.  
*J Gen Virol* 79:649-657.
- McCLURKIN, A.W., BOLIN, S.R. u. CORIA, M.F. (1985):  
Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea.  
*J Am Vet Med Assoc*, 186:568-569.
- McKERCHER, D.G., SAITO, J.K., CRENSHAW, G.L. u. BUSHNELL, R.B. (1968):  
Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine.  
*J Am Vet Med Assoc*, 152:1621-1624.
- MENGELING, W.L. u. CHEVILLE, N.F. (1968):  
Host response to persistent infections with hog cholera virus.  
*Proc US Anim Livest Assoc*, 283-295.
- MENGELING, W.L. u. PACKER, R.A. (1969):  
Pathogenesis of chronic hog cholera: host response.  
*Am J Vet Res*, 30:409-417.
- MENGELING, W.L., PIRTLE, E.C. u. TORREY, J.P. (1963):  
Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence. Application as a diagnostic and assay method.  
*Can J Com Med Vet Sci*, 27:249-252.
- MERLO, C., STEFFEN, R., LANDIS, T., TSAI, T. u. KARABATSOS, N. (1993):  
Possible association of encephalitis and 17D yellow fever vaccination in a 29-year old traveller.  
*Vaccine*, 11:691.

- MEYER, H., LIESS, B., HERMANN, W. u. TRAUTWEIN, G. (1981):  
Experimentelle, diaplazentare Infektion von Schweinfeten mit dem Virus der Europäischen Schweinepest (ESP). Virologische und serologische Untersuchungen in der postnatalen Phase. Fortschritte der Veterinärmedizin. Suppl Zbl Vet Med, 30:140-144.
- MEYERS, G., TAUTZ, N., STARK, R., BROWNLIE, J., DUBOVI, E.J., COLLETT, M.S. u. THIEL, H.-J. (1992):  
Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. Virology, 191:368-386.
- MEYERS, G., RÜMENAPF, T. u. THIEL, H.-J. (1989a):  
Ubiquitin in a togavirus. Nature, 341-391.
- MEYERS, G., RÜMENAPF, T. u. THIEL, H.-J. (1989b):  
Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. Virology, 171:555-567.
- MEYERS, G., TAUTZ, N., DUBOVI, E.J. u. THIEL, H.-J. (1991):  
Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. Virology, 180:602-616.
- MEYERS, G. u. THIEL, H.-J. (1996):  
Molecular characterisation of pestiviruses. Adv Virus Res, 47:53-118.
- MODROW, S. u. FALKE, D. (1997):  
Molekulare Virologie.  
Heidelberg, Berlin, Oxford  
Spektrum, Akademischer Verlag
- MOENNIG, V. (1993):  
Schweinepest- Verlaufsformen und Diagnostik.  
collegium veterinarium, 76-78.
- MOENNIG, V., GREISER-WILKE, I., FREY, H.-R., HAAS, L., LIEBLER, E.M., POHLENZ, J. u. LIESS, B. (1993):  
Prolonged persistence of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in a persistently viremic cattle. J Vet Med, 40:371-377.
- MOENNIG, V., FREY, H.-R., LIEBLER, E.M., POHLENZ, J. u. LIESS, B. (1990):  
Reproduction of mucosal disease using "in vitro" selected cytopathogenic bovine viral diarrhoea (BVD) virus. Vet Rec, 127:200-203.

MOENNIG, V., LEDER, L., GREISER-WILKE, I., FREY, H.-R. u. LIESS, B. (1991):  
Ein neuer Enzymimmuntest zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der bovinen  
Virusdiarrhö.

Tierärztl Prax, 19:35-38.

MOENNIG, V. u. LIESS, B. (1995):

Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus.

Vet Clin North Am Food Anim Pract, 11:477-487

MOENNIG, V. u. PLAGEMANN, G.W. (1992):

The Pestiviruses.

Adv Virus Res, 41:53-98.

MONATH, T.P., HILL, L.J., BROWN, N.V., CROPP, C.B., SCHLESINGER, J.J.,

SALUZZO, J.F. u. WANDS, J.R. (1986):

Sensitive and specific monoclonal immunoassay for detecting yellow fever virus in laboratory  
and clinical specimens.

J Clin Microbiol, 23:129-134.

MONATH, T.P. (1991):

Yellow fever: Victor, Victoria? Conqueror, conquest? Epidemics and research in the last forty  
years and prospects for the future.

Am J Trop Med Hyg, 45:1-43.

MONATH, T.P., BALLINGER, M.E., MILLER, B.R. u. SALAUN, J.J. (1989):

Detection of yellow fever viral RNA by nucleic acid hybridization and viral antigen by  
immunocytochemistry in fixed human liver.

Am J Trop Med Hyg, 40:663-668.

MONATH, T.P. u. HEINZ, F.X. (1996):

Flaviviruses.

In B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Channock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B.  
Roizman u. S.E. Straus (Hrsg.), Fields Virology.

MONATH, T.P. u. NYSTROM, R.R. (1984):

Detection of yellow fever virus in serum by enzyme immunoassay.

Am J Trop Med Hyg, 33:151-157.

MOORE, B.E. (1993):

Survival of human immunodeficiency virus (HIV), HIV-infected lymphocytes and poliovirus  
in water.

Appl Environ Microbiol, 59:1437-1443.

- MOORMANN, R.J., WARMERDAM, P.A., VAN DER MEER, B. SCHAAPER, W.M., WENSVOORT, G. u. HULST, M.M. (1990):  
Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1.  
*Virology*, 177:184-198.
- MOSSA, A.C., GOVEN, L.M., ATWOOD, J.G., WILLIAMS, F., WOUDEBERG, T.M., MARGULIES, M., RAGUSA, R.P. u. LEATH, R. (1991):  
Thermal cycler for automatic performance of the polymerase chain reaction with close temperature control.  
Eur Pat Appl No 0488768
- MÜLHARDT, C. (1999):  
Der Experimentator: Molekularbiologie  
1. Aufl., Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, Gustav Fischer Verlag.
- MUIR, P., NICHOLSON, F., JHETAM, M., NEOGI, S. u. BANATVALA, J.E. (1993):  
Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical specimens.  
*J Clin Microbiol*, 31:31-38.
- MULLIS, K.B. (1991):  
The polymerase chain reaction in an anemic mode: How to avoid cold oligodeoxyribonucleic acid fusion.  
*PCR Methods and Applications*, 1:1-4.
- MULLIS, K.B. u. FALOONA, F.A. (1987):  
Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.  
*Methods Enzymol*, 155:335-350.
- MURPHY, F.A. (1980):  
Togavirus morphology and morphogenesis.  
In R.W. SCHLESINGER u. Herausgeber (Hrsg.), *The togaviruses: biology, structure, replication*, New York, Academic, 247-266.
- MURRAY, J.M., AASKOV, J.G. u. WRIGHT, P.J. (1993):  
Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM.  
*J Gen Virol*, 74:175-182.
- MUYLAERT, I.R., CHAMBERS, T.J., GALLER, R., RICE, C.M. (1996):  
Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence.  
*Virology*, 222:159-168.



- MUYLAERT, I.R., GALLER, R.G. u. RICE, C.M. (1997):  
Genetic analysis of yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation.  
*J Virol*, 71:291-298.
- MYERS, T.W. u. GELFAND, D.H. (1991):  
Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase.  
*Biochemistry*, 30:7661-7666.
- NASIDI, A., MONATH, T.P., DECOCK, K., TOMORI, O., CORDELLIER, R., OLALEYE, O.D., HARRY, T.O., ADENIYI, J.A., SORUNGBE, A.O. u. AJOSE-COKER, A.O. (1989):  
Urban yellow fever epidemic in western Nigeria, 1987.  
*Trans R Soc Trop Med Hyg*, 83:401-406.
- NASSAR, E.D., S, CHAMELET, E.L., COIMBRA, T.L., DE SOUZA, L.T., SUZUKI, A., FERREIRA, I.B., DA SILVA, M.V., ROCCO, I.M. u. TRAVASSOS DA ROSA, A.P. (1995):  
Jungle yellow fever: clinical and laboratorial studies emphasizing viremia on a human case.  
*Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 37:337-341.
- NEDELMANN, J., HEAGERTY, P. u. LAWRENCE, C. (1992):  
Quantitative PCR: Procedures and precisions.  
*Bull Math Biol*, 54:477-502.
- NEPOKLONOV, E.A., ALIPER, T.I. u. LENEVA, I.A. (1998):  
Metody laboratornoi diagnostiki klassicheskoi chumy svinei.  
*Vopr Virusol*, 43:152-158.
- NERENBERG, M.I. u. MINOR, T. (1991):  
Detection of plasmid contamination in PCR samples.  
*BioTechniques*, 11:332-333.
- NEWTON, C.R. u. GRAHAM, A. (1994):  
PCR  
2. Aufl., Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum, Akademischer Verlag.
- NICOLAIDES, N.C. u. STOECKERT, C.J., JR. (1990):  
A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells.  
*Biotechniques*, 8:154-156.
- 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., ALENIUS, S., LARSSON, B., JUNTTI, N. (1989):  
Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies of bovine virus diarrhoea in milk.  
J of Vet Med B36:113-118.
- NOGUEIRA, R.M., SCHATZMAYR, H.G., MIAGOSTOVICH, M.P., CAVALCANTI, S.M. u. DE CARVALHO, R. (1992):  
Use of MAC-ELISA for evaluation of yellow fever vaccination.  
Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 34: 447-450.
- NOWAK, T. u. WENGLER, G. (1987):  
Analysis of disulfides present in the membrane proteins of West Nile flavivirus.  
Virology, 156:127-137.
- NÜBLING, C.M., CHUDY, M., LÖWER, J. (1996):  
Virus Testing of Plasma Pools and Blood Products by Nucleic Acid Amplification.  
Hämostaseologie, 16:274-276.
- NUTTAL, P.A., LUTHER, P.D. u. SCOTT, E.J. (1977):  
Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures.  
Nature, 266:835-837.
- OLAFSON, P., MACCALLUM, A.D. u. FOX, F.H. (1946):  
An apparently new transmissible disease of cattle.  
Cornell Vet, 36:205-213.
- OLEKSIEWICZ, M.B., BOTNER, A., MADSEN, K.G. u. STORGAARD, T. (1998):  
Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes.  
Vet Microbiol, 64:7-22.
- ORBAN, S. (1982):  
Bedingungen und Folgen der transplazentaren Übertragung des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) nach Impfung mit einer kommerziellen Lebendvakzine.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch. Dissertation
- PANACCIO, M. u. LEW, A. (1991):  
PCR based diagnosis in the presence of 8%(v/v) blood.  
Nucleic Acids Res, 19:1151.
- PATON, D.J., GOODEY, R., BROCKMANN, S. u. WOOD, L. (1989):  
Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV.  
Vet Rec, 124:63.

PAULI, U., ZANONI, R., HERTIG, C. u. PETERHANS, E. (1991):  
Veterinärmedizin und Molekularbiologie: Möglichkeiten und Grenzen der Virusdetektion.  
Schweiz Arch Tierheilk, 133:35-42.

PERSING, D.H. (1991):  
Polymerase chain reaction: Trenches to benches.  
J Clin Microbiol, 29:1281-1285.

PLETNEV, A.G., BRAY, M. u. LAI, C.J. (1993):  
Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on  
neurovirulence in mice.  
J Virol, 67:4956-4963.

POCOCK, D.H., HOWARD, C.J., CLARKE, M.C. u. BROWNLIE, J. (1987):  
Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine viral  
diarrhea virus.  
Arch Virol, 94:43-53.

POST, P.R., CARVALHO, R. u. GALLER, R. (1991):  
Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1.  
Virus Res, 18:291-302.

PRINCE, A.M. u. ANDRUS, L. (1992):  
How to kill unwanted DNA.  
BioTechniques, 12:358-360.

PRINGLE, C.R. (1999):  
Virus nomenclature.  
Arch Virol, 144:1463-1466.

PURCHIO, A.F., LARSON, R. u. COLLETT, M.S. (1984):  
Characterization of bovine viral diarrhea virus proteins.  
J Virol, 50:666-669.

QI, F., RIDPATH, J.F., LEWIS, T., BOLIN, S.R. u. BERRY, E.S. (1992):  
Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions.  
Virology, 189:285-292.

RADWAN, G.S., BROCK, K.V., HOGAN, J.S. u. 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 diarrhea virus.  
Vet Microbiol, 44:77-91.

RAMSEY, F.K. u. CHIVERS, W.H. (1953):  
Mucosal disease of cattle.  
North Am Vet, 34:629-633.

- RAMSEY, F.K. (1956):  
Pathology of a mucosal disease of cattle.  
Iowa State University, Dissertation
- RAPPOLEE, D.A. (1990):  
Optimizing the sensitivity of RT-PCR.  
Amplifications A Forum for PCR Users, 7:1-4.
- REBHURN, W.C., FRENCH, T.W., PERDRIZET, J.A., DUBOVI, E.J., DILL, S.G. u.  
KARCHER, L.F. (1989):  
Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle.  
J Vet Int Med, 3:42-46.
- REDDY, E.S.P., DAS, M.R., REDDY, E.P. u. BHARGAVA, P.M. (1983):  
Inhibition of reverse transcriptases (E.C. 2.7.7.49) by seminal plasmin.  
Biochem J 209:183-188.
- REED, W. (1901):  
Recent researches concerning the etiology, propagation and prevention of yellow fever by the  
United States Army Commission.  
J trop med, 5:143-u. 158.
- REMICK, D.G., KUNKEL, S.L., HOLBROOK, E.A. u. HANSON C.A. (1990):  
Theory and applications of the polymerase chain reaction.  
Am J Clin Path [Suppl. 1], 49-54.
- REPPIN, K. (1963):  
Die Schweinepest in Niedersachsen.  
Berl Münch tierärztl Wschr, 76:423-425.
- REVELL, S.G., CHASEY, D., DREW, T.W. u. EDWARDS, S. (1988):  
Some observations on the semen of bulls persistently infected with bovine virus diarrhoea  
virus.  
Vet Rec, 123:122-125.
- REZAIAN, M.A. u. KRAKE, L.R. (1987):  
Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine.  
J Virol Methods, 17:277-285.
- RHODE, G. u. LIESS, B. (1970):  
Untersuchungen zur Pathogenese der Virusdiarrhoe - Mucosal Disease des Rindes unter  
Verwendung einer heterotypischen Immunfluoreszenztechnik.  
Zentralbl Veterinärmed, 17:686-700.

- RICE, C.M., LENCHES, E.M., EDDY, S.R., SHIN, S.J., SHEETS, R.L. u. STRAUSS, J.H. (1985):  
Nuclotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution.  
*Science*, 229:726-733.
- RICE, C.M., STRAUSS, E.G. u. STRAUSS, J.H. (1986):  
Structure of the flavivirus genome.  
In S. Schlesinger u. M.J. Schlesinger (Hrsg.), *The Togaviridae and Flaviviridae*. New York: Plenum, 279-326.
- RICHARDSON, K.J., MARGOLIN, A.B. u. GERBA, C.P. (1988):  
A novel method of liberating viral nucleic acid for assay of water samples with cDNA probes.  
*J Virol Methods*, 22:13-21.
- RIDPATH, J.F. u. 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., BOLIN, S.R. u. DUBOVI, E.J. (1994):  
Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes.  
*Virology*, 205:66-74.
- ROBERTSON, S.E. (1993):  
Yellow Fever.  
Module 8: the immunological basis for immunization. Geneva: WHO.
- ROBERTSON, S.E., HULL, B.P., TOMORI, O., BELE, O., LEDUC, J.W. u. ESTEVES, K. (1996):  
Yellow fever: a decade of reemergence.  
*JAMA*, 276:1157-1162.
- ROEDER, P.L. u. HARKNESS, J.W. (1986):  
BVD virus infection: Prospects for control.  
*Vet Rec*, 114:309-313.
- ROLFS, A., SCHULLER, I., FINCKH, U. u. WEBER-ROLFS, I. (1992):  
PCR: Clinical Diagnostics and Research.  
Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, Springer Verlag
- ROSEN, L., DROUET, M.T. u. DEUBEL, V. (1999):  
Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection.  
*Am J Trop Med Hyg*, 61:720-724.

ROSSEN, L., NORSEKOV, P., HOLMSTROM, K. u. RASMUSSEN, O.F. (1992):  
Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.

Int J Food Microbiol, 17:37-45.

RÜMENAPF, T., STARK, R., MEYERS, G. u. 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. u. THIEL, H.-J. (1993):  
Processing of the envelope glycoprotein of pestiviruses.

J Virol, 67:3288-3294.

RUIZ-LINARES, A., CAHOUR, A., DESPRES, P., GIRAD, M. u. BOULOY, M. (1989):  
Processing of yellow fever virus polyprotein: role of cellular proteases in maturation of the structural proteins.

J Virol, 63:4199-4209.

RUSSEL, P.K., BRANDT, W.E. u. DALRYMPLE, J.M. (1980):

Chemical and antigenetic structure of flaviviruses.

In R.W. Schlesinger et al. (Hrsg.) The Togaviruses: biology, structure, replication. New York, Academic Press, 503-529.

RYCHLIK, W., SPENCER, W.J. u. RHOADS, R.E. (1990):

Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.

Nucl Acids Res, 18:6409-6412.

SAIKI, R.K., SCHARF, F., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. u. ARNHEIM, N. (1985):

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science, 230:1350-1354.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. u. ERLICH, H.A. (1988):

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science, 239:487-491.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. u. MANIATIS, T. (1989):

Molecular cloning: A laboratory manual.

Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbor Lab.

- SANDVIK, T., FREDERIKSEN, B. u. LOKEN, T. (1997a):  
Level of viral antigen in blood leucocytes from cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus.  
Zentralbl Veterinärmed [B], 44:583-590.
- SANDVIK, T., PATON, D.J. u. LOWINGS, P.J. (1997b):  
Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions.  
J Virol Methods, 64:43-56.
- SCHEIDER, R., SCHNEIDER-SCHERZER, E., TURNHER, M., AUER, B. u. SCHWEIGER, M. (1988):  
The primary structure of human ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI) discloses a novel, highly diversified protein superfamily with a common repetitive module.  
EMBO J, 7:4151.
- SCHEIT, K.H., REDDY, E.S.P. u. BHARGAVA, P.M. (1979):  
Seminal plasmin is a potent inhibitor of E.coli RNA polymerase in vitro.  
Nature 279:728-731.
- SCHERER, W.F., EDDY, G.A., MONATH, T.P. et al. (1980):  
Laboratory safety for arboviruses and certain other viruses of vertebrates.  
Am J Trop Med Hyg, 29:1359-1381.
- SCHLESINGER, J.J., BRANDIS, M.W., PUTNAK, J.R. u. WALSH, E.E. (1990):  
Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody.  
J Gen Virol, 71:593-599.
- SCHMITT, B.J., LOPEZ, O.J., RIDPATH, J.F., GALEOTA-WHEELER, J. u. OSORIO, F.A. (1994):  
Evaluation of PCR for diagnosis of bovine viral diarrhea virus in tissue homogenates.  
J Vet Diagn Invest, 6:44-47.
- SCHNEIDER, R., UNGER, G., STARK, R., SCHNEIDER-SCHERZER, E. u. THIEL, H.-J. (1993):  
Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease.  
Science, 261:1169-1171.
- SCHÖNRICH, G. (1997):  
Gelbfiebervirus.  
In Darai, G., Handermann, M., Hinz, E., Sonntag, H.-G. (Hrsg.) Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 214-217.

SCHWAB, K.J., DE LEON, R. u. SOBSEY, M.D. (1996):  
Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR.  
*Appl Environ Microbiol*, 62:2086-2094.

SCHWAB, K.J., ESTES, M.K., NEILL, F.H. u. ATMAR, R.L. (1997):  
Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples.  
*J Clin Microbiol*, 35:511-514.

SEBESTIAN, J. u. SIEBER, M. (1991):  
Trägermaterial und seine Verwendung in einem Verfahren zur chromatographischen Trennung von Nukleinsäuren.  
Eur Pat Appl No 0496822

SELA, M., ANFINSEN, C.B. u. HARRINGTON, W.F. (1957):  
The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure.  
*Biochem Biophys Acta*, 26:502.

SEMPRINI, A.E., PERSICO, T., THIERS, V., ONETA, M., TUVERI, R., SEFARINI, P., BOSCHINI, A., GIUNTELLI, S., PARDI, G. u. BRECHOT, C. (1998):  
Absence of hepatitis C virus and detection of hepatitis G virus/GB virus C RNA sequences in the semen of infected men.  
*J Infect Dis*, 177: 848-854.

SERIE, C., LINDREC, A., POIRIER, A., ANDRAL, L. u. NERI, P. (1968):  
Etudes sur la fièvre jaune en Ethiopie. I. Introduction symptomatologie clinique amarile.  
*Bull World Health Organ*, 38:835-841.

SHI, Y.J. u. LIU, J.Z. (1992):  
Direct reverse transcription--polymerase chain reaction from whole blood without RNA extraction.  
*Genet Anal Tech Appl*, 9:149-150.

SHIEH, Y.S., WAIT, D., TAI, L. u. SOBSEY, M.D. (1995):  
Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction.  
*J Virol Methods*, 54:51-66.

SHIN, J., TORRISON, J., CHOI, C.S., GONZALEZ, S.M., CRABO, B.G. u. MOLITOR, T.W. (1997):  
Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars.  
*Vet Microbiol*, 55:337-346.



SHOPE, R.E. (1980):

Medical significance of togaviruses: an overview of diseases caused by togaviruses in man and in domestic and wild vertebrate animals.

In Schlesinger, R.W. (Hrsg.) *The Togaviruses*. New York: Academic, 47-82.

SIMONS, J.N. et al. (1995):

Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis.

*Nature Med*, 564-569.

SLAUGHTER, R.L. (1985):

Viral infections of the liver.

*Ala J Med Sci*, 22:164-169.

SMITH, J., McELHINNEY, L.M., HEATON, P.R., BLACK, E.M. u. LOWINGS, J.P. (2000):

Assessment of template quality by the incorporation of an internal control into a RT-PCR for the detection of rabies and rabies-related viruses.

*J Virol Methods* 84:107-15.

SOPER, F.L. (1936):

Jungle yellow fever: new epidemiological entity in South America.

*Rev Hyg Saude Publica*, 10:107-144.

SOUTHERN, E.M. (1975):

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

*J Mol Biol*, 98:503-517.

ST-LAURENT, G., MORIN, G. u. ARCHAMBAULT, D. (1994):

Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and nonstructural viral genes by reverse transcription-PCR.

*J Clin Microbiol*, 32:658-665.

STADEJEK, T., PEJSAK, Z., KWINKOWSKI, M., OKRUSZEK, A. u. WINIARCZYK, S. (1995):

Reverse transcription combined with polymerase chain reaction as a detection method for pestiviral infections.

*Rev Sci Tech*, 14:811-818.

STARICK, E. (1998):

Rapid and sensitive detection of equine arteritis virus in semen and tissue samples by reverse transcription-polymerase chain reaction, dot blot hybridisation and nested polymerase chain reaction.

*Acta virol*, 42:333-339.

- STARK, R., MEYERS, G., RÜMENAPF, T. u. 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.
- STARK, R., RÜMENAPF, T., MEYERS, G. u. THIEL, H.-J. (1990):  
Genomic localization of hog cholera glycoproteins.  
Virology, 174:286-289.
- STRODE, G.K. (1951):  
Yellow fever.  
New York: McGraw-Hill.
- SUMMERFIELD, A., KNOTIG, S.M. u. McCULLOUGH, K.C. (1998):  
Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death.  
J Virol, 72:1853-1861.
- SUSA, M., KÖNIG, M., SAALMÜLLER, A., REDDEHASE, M.J. u. THIEL, H.J. (1992):  
Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus.  
J Virol, 66:1171-1175.
- TAMURA, J.K., WARRENER, P. u. COLLETT, M.S. (1993):  
RNA-Stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus.  
Virology, 193:1-10.
- TANAKA, M. (1993):  
Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction.  
J Virol Methods, 41:311-322.
- TANDON, B.N. u. ACHARYA, S.K. (1987):  
Viral diseases involving the liver.  
Baillieres Clin Gastroenterol, 1:211-230.
- TARRY, D.W., BERNAL, L. u. EDWARDS, S. (1991):  
Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies.  
Vet Rec, 128:82-84.
- TAUTZ, N., MEYERS, G. u. THIEL, H.-J. (1993):  
Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus.  
Virology, 197:74-85.
- THEILER, M. u. SMITH, H.H. (1937):  
The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization.  
J Exp Med, 65:787-800.

THIEL, H.-J., STARK, R., WEILAND, E., RÜMENAPF, T. u. MEYERS, G. (1991):  
Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus.  
*J Virol*, 65:4705-4712.

TRAUTWEIN, G. (1988):  
Pathology and pathogenesis of the disease.  
In LIESS, B. (Hrsg.), *Development in Veterinary Virology. Classical Swine fever and Related Viral Infections*, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 27-53.

UNDERDAHL, N.R., GRACE, O.D. u. HORLEIN, A.D. (1957):  
Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agents from bovine MD.  
*Proc Soc Exp Biol Med*, 94:795-797.

URUNO, K., SHIBATA, I. u. NAKANE, T. (1998):  
Detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) using reverse transcription polymerase chain reaction assay.  
*J Vet Med Sci*, 60:867-870.

VAN BEKKUM, J.G. (1966):  
Serological aspects of the vaccination against hog cholera with crystal violet vaccine.  
*Tijdschr Diergeneesk*, 91:149-170.

VAN BELKUM, A. u. NIESTERS, H.G. (1995):  
Nucleic acid amplifications and related techniques in microbiological diagnostics and epidemiology.  
*Cell Mol Biol*, 41: 615-623.

VAN DER STUYFT, P., GIANELLA, A., PIRARD, M., CESPEDES, J., LORA, J., PEREDO, C., PELEGRINO, J.L., VORNDAM, V. u. BOELAERT, M. (1999):  
Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia.  
*Lancet*, 353: 1558-1562.

VAN OIRSCHOT, J.T. (1992):  
Hog cholera.  
In LEMANN et al. (Hrsg.) *Diseases of swine*, 7th ed. Ames, IA, Iowa State University Press, 274-285.

VAN OIRSCHOT, J.T. u. TERPSTRA, C. (1977):  
A congenital persistent swine fever infection. I. clinical and virological observations.  
*Vet Microbiol*, 2:121-132.

VAN OIRSCHOT, J.T. u. TERPSTRA, C. (1989):  
Hog Cholera Virus.  
In M.B. Pensaert (Hrsg) *Virus infections of Porcines*. Amsterdam Oxford New York Tokyo: Elsevier Science Publishers B.V., 113-130.

- VERHOFSTEDE, C., FRANSEN, K., MARISSSENS, D., VERHELST, R., VAN DER GROEN, G., LAUWERS, S., ZISSIS, G. u. PLUM, J. (1996):  
Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods.  
*J Virol Methods*, 60:155-159.
- VODKIN, M.H., STREIT, T., MITCHELL, C.J., McLAUGHLIN, G.L. u. NOVAK, R.J. (1994):  
PCR-based detection of arboviral RNA from mosquitoes homogenized in detergent.  
*Biotechniques*, 17:114-116.
- VOGELSTEIN, B. u. GILLESPIE, D. (1979):  
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 76:615-619
- VYDELINGUM, S., TAO, T., BALAZSI, K. u. HECKER, R. (1998):  
Comparison of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay and virus isolation for the detection of classical swine fever virus.  
*Rev Sci Tech*, 17:674-681.
- WALLACE, D.M. (1987):  
Precipitation of nucleic acids.  
*Methods Enzymol*, 152:41-48.
- WANG, A.M., DOYLE, M.V. u. MARK, D.F. (1989):  
Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 86:9717-9721.
- WARD u. KAEBERLE (1984):  
Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhea virus by light and electron microscopies.  
*Am J Vet Res*, 45:165-70.
- WARRENER, P. u. COLLETT, M.S. (1995):  
Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity.  
*J Virol*, 69:1720-1726.
- WARRENER, P., TAMURA, J.K. u. COLLETT, M.S. (1993):  
An RNA stimulated NTPase activity associated with yellow fever NS3 protein expressed in bacteria.  
*J Virol*, 67:989-996.
- WEILAND, E., AHL, R., STARK, F., WEILAND, F. u. THIEL, H.-J. (1992):  
A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus.  
*J Virol*, 66:3677-3682.

WEILAND, E., STARK, R., HAAS, B., RÜMENAPF, T., MEYERS, G. u. THIEL, H.-J. (1990):

Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies from part of a disulfid-linked heterodimer.

J Virol, 64:3563-3569.

WENGLER, G. (1991a):

Family - Flaviviridae

In R. I. B. FRANCKI, C. M. FAUQUET, D. L. KNUDSEN u. F. BROWN (Hrsg.)

Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on taxonomy of viruses.

Arch Virol [Suppl 2], 228-229.

WENGLER, G. (1991b):

The carboxy-terminal part of the NS3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase.

Virology, 184:707-715.

WENGLER, G. (1993):

The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity.

Virology, 197:265-273.

WENSVOORT, G.C., TERPSTRA, C., DE KLUIJVER, E.P., KRAGTEN, C. u.

WARNAAR, J.C. (1989):

Antigenetic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus.

Vet Microbiol, 21:9-20.

WILDE, J., EIDEN, J. u. YOLKEN, R. (1990):

Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions.

J Clin Microbiol, 28:1300-1307.

WILHELMSSEN, C.L., BOLIN, S.R., RIDPATH, J.F., CHEVILLE, N.F. u. KLUGE, J.P.

(1991):

Lesions and localization of viral antigens 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.

WINDISCH, J.M., SCHNEIDER, R., STARK, R., WEILAND, E., MEYERS, G. u. THIEL, H.-J. (1996):

RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies.

J Virol, 70:352-358.

WINK, M. U. WEHRLE, H. (1994):

3.10.8. Praktische Hinweise.

In PCR im medizinischen und biologischen Labor -Handbuch für den Praktiker-, Darmstadt, GIT Verlag, 227-228.

WINKLER, G., MAXWELL, S.E., RUEMMLER, C. u. STOLLAR, V. (1989):

Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization.

Virology, 171:302-305.

WINKLER, G., RANDOLPH, V.B., CLEAVES, G.R., RYAN, T.E. u. STOLLAR, V. (1988):

Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer.

Virology, 162:187-196.

WINSLOW, S.G. u. HENKART, P.A. (1991):

Polyinosinic acid as a carrier in the microscale purification of total RNA.

Nucl Acids Res, 19: 3251-3253.

WIRZ, B., TRATSCHIN, J.-D., MÜLLER, H.K. u. MITCHELL, D.B. (1993):

Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction.

J Clin Microbiol, 31:1148-1154.

WISKERCHEN, M.A., BELZER, S.K. u. 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.A. u. 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.

WRIGHT, P.A. u. WYNFORD-THOMAS, D. (1990):

The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research.

J Path, 162:99-117

XIAO, Z.S., JIA, L.L., QU, X.S. u. ZHANG, Y.H. (1986):

Application of enzyme immunoassay on infected cells (EIA-IC) for arboviruses.

Acta Virol, 30:487-493.

YANG, A. u. MILLER, D.M. (1985):

Purification of functional RNA from human granulocytes.

J Lab Clin Med, 105:94-98.

ZABEREZHNY, A.D., GREBENNIKOVA, T.V., KURINNOV, V.V., TSYBANOV, S.G., VISHNYAKOV, I.F., BIKETOV, S.F., ALIPER, T.I. u. NEPOKLONOV, E.A. (1999):  
Differentiation between vaccine strain and field isolates of classical swine fever virus using polymerase chain reaction and restriction test.

Dtsch Tierärztl Wschr, 106:394-397.

ZERLAUTH, G. (1996):

IQ-PCR: A Quality-Assured and Validated Viral Genome Assay System.

Hämostaseologie, 16:279-281.

ZHAO, J., ARAKI, N. u. NISHIMOTO, S.K. (1995):

Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control.

Gene, 155:159-165.

ZHONG, L., BATT, D.B. u. CARMICHAEL, G.G. (1994):

An improved rapid method of isolating RNA from cultured cells by SDS-acid phenol/chloroform extraction.

Biotechniques, 16:56-57.

## 8 Anhang

### 8.1 Material

Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden die Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

#### 8.1.1 Bruteier und Zellen

- Fetale Kälbernierenzellen (FKN-412, 4. Passage), hergestellt im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- permanente Schweinenierenzelllinie PK (15), die im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover kloniert wurde
- Valvo SPF-Eier (Lohmann, Cuxhaven, Best.-Nr. 40010)

#### 8.1.2 Enzyme

- Alu I-Restriktionsenzym (Boehringer Mannheim, Best. Nr. 239275)
- HotStarTaq-Polymerase (5 U/μl Qiagen, Hilden, Best. Nr. 203205)
- MMLV-Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein, Best.-Nr. 28025-013)
- RNase-Inhibitor (RNAsin, Gibco BRL, Eggenstein, Best.-Nr. 15518-012)
- Taq-Polymerase (5 IE/μl, Appligene, Illkirch, F, Best.-Nr. 120181)
- Taq-Polymerase (5 U/μl, Promega, Madison, USA, Best.-Nr. M1865)
- Tth-Polymerase (5 U/μl, Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 103050)

#### 8.1.3 Nährmedien und Sera

- ELA (Earle's Salzlösung mit Lactalbuminhydrolysat):

NaCl	6,8 g
KCl	0,4 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,265 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2,2 g
Lactalbuminhydrolysat (Difco-Laboratories, Detroit, Best.-Nr. 5996-01-4)	5,0 g
Phenolrot (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 107241)	0,016 g
Aqua bidest.	ad 1 l



- EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), pH-Wert 7,0:  
 EMEM-Fertigpulver (Gibco BRL, Eggenstein, Best.-Nr. 072-1100) 9,6 g  
 NaHCO<sub>3</sub> 2,2 g  
 Aqua bidest. ad 1 l

#### 8.1.4 Organische Lösungsmittel

- 70 % Ethanol für die Gewinnung primärer Hühnerembryofibroblasten:  
 Ethanol (Rotipuran 99,8 % p.a., Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 9065.2) 70 %  
 Aqua bidest. 4%
- 70 % Ethanol für Einsatz mit dem RNeasy Mini Kit:  
 Ethanol (Rotipuran 99,8 % p.a., Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 9065.2) 70 %  
 DNase-/RNase-freies Wasser (BIO 101, Vista, USA, Best.-Nr. 2450-304) 30 %
- 75 % Ethanol für Waschritte Trizol / Purescript:  
 Ethanol (Rotipuran 99,8 % p.a., Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 9065.2) 75 %  
 DNase-/RNase-freies Wasser (BIO 101, Vista, USA, Best.-Nr. 2450-304) 25 %
- 96 % Ethanol für Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit:  
 Ethanol (Rotipuran 99,8 % p.a., Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 9065.2) 96 %  
 DNase-/RNase-freies Wasser (BIO 101, Vista, USA, Best.-Nr. 2450-304) 4%
- Chloroform (Rotipuran >99 % p.a., Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 3313.2)
- Ethanol (Rotipuran 99,8 % p.a., Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. 9065.2)
- Isopropanol, 2- Propanol (Rotipuran >99,7 % p.a., Roth, Karlsruhe)

#### 8.1.5 Primer

- Primer 17D1 (100 pmol/μl, Biometra, Göttingen)
- Primer 17D3 (100 pmol/μl, Biometra, Göttingen)
- Primer BVD 2 (100 pmol/μl, Biometra, Göttingen)
- Primer BVD 3 (100 pmol/μl, Biometra, Göttingen)
- Primer Pest 2 (100 pmol/μl, Biometra, Göttingen)
- Primer Pest 3 (100 pmol/μl, Biometra, Göttingen)
- Random Primer (100 μM; Gibco BRL, Eggenstein, Best.-Nr. 48190-011)

#### 8.1.6 Puffer und Lösungen

- 5 x Probenpuffer zum Beladen von Agarosegelen:  
 Glycerin 25%  
 EDTA (Versene (EDTA), Boehringer Ingelheim, Best.-Nr. 17-711A) 0,5 mM  
 Bromphenolblau 0,2%

- 10 x TBE-Puffer:

TRIS (USB, Cleveland, Ohio, USA, Best.-Nr. 32825)	108 g
Borsäure (Riedel-de Häen, Seelze, Best.-Nr. 31146)	53,4 g
EDTA (Versene (EDTA), Boehringer Ingelheim, Best.-Nr. 17-711A)	7,4 g
Aqua bidest.	ad 1 l
- 20 x Tth-Puffer (Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 103050)
- Ethidiumbromidlösung:

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 11615)	500 µl
TBE-Puffer	500 ml
- Inkubationspuffer 10 x C (Appligene, Illkirch, F, Best.-Nr. 120181)
- Magnesiumchloridlösung (25 mM, Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 103050)
- Magnesiumchloridlösung (25 mM, Promega, Madison, USA, Best.-Nr. M1665)
- Magnesiumchloridlösung (25 mM, Qiagen, Hilden, Best.-Nr. 203205)
- MES-Puffer: (MES: 2[*N-Morpholino*]ethanesulfonic acid), pH-Wert 5,5:

Aqua bidest.	50 ml
MES (Sigma, St. Louis, USA, Best.-Nr. M-8250)	1,066 g
1 N NaOH (Riedel-de-Häen, Seelze, Best.-Nr. 35256)	1,1 ml
1 M NaCl-Lösung	9,9 ml
Aqua bidest.	ad 100 ml
- PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), pH 7,2:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,37 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,132 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,1g
Aqua bidest.	ad 1l

Nach dem Mischen der Bestandteile wurde der Puffer steril filtriert.
- PCR-Puffer, 10 x (Qiagen, Hilden, Best.-Nr. 203205)
- Polymerase 10 x Puffer (Promega, Madison, USA, Best.-Nr. M1665)

- Versen-Trypsin-Lösung (0,125%), pH 7,0:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,31 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,132 g
Trypsin (DIFCO, Detroit, USA, Best.-Nr. 0152-17-7)	1,25 g
EDTA (Versene (EDTA), Boehringer Ingelheim, Best.-Nr. 17-711A)	1,25 g
Aqua bidest.	ad 1 l
  
- Versen-Trypsin-Lösung (0,4%), pH 7,0:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,31 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0,132 g
Trypsin (DIFCO, Detroit, USA, Best.-Nr. 0152-17-7)	4,0 g
EDTA (Versene (EDTA), Boehringer Ingelheim, Best.-Nr. 17-711A)	4,0 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Der pH-Wert der Versen-Trypsin-Lösungen wurde mit Natronlauge, 1 mol/l, (Riedel-de Haen, Seelze, Best.-Nr. 35256) eingestellt und diese wurden anschließend steril filtriert.

### 8.1.7 Reagenzien speziell für die RNA-Isolierung

- Genereleaser (Eurogentex, Borken, Best.-Nr. KA-0010-10)
- RNABind (Fisher Scientific, Nidderau, Best.-Nr. B24700310)
- Trizol (Gibco BRL, Eggenstein, Best.-Nr. 15596-026)

#### 8.1.7.1 Präzipitationshilfen:

- Glykogen (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.40202.001)
- Pellet-Point (AGS, Heidelberg, Best.-Nr. 69049-1)
- Poly (A) aus dem High Pure Viral RNA-Kit (Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1858882)
- RNA aus Bäckerhefe (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.24018.0100)

#### 8.1.7.2 kommerzielle Kits zur RNA-Isolierung:

- Machery&Nagel Nucleo Spin RNA II Kit (Macherey&Nagel, Düren, Best.-Nr. 740955.250)
- Machery&Nagel Nucleo Spin RNA Kit (Macherey&Nagel, Düren, Best.-Nr. 740955)

- Purescript-Kit (Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 211011)
- QIAamp Viral RNA-Kit (Qiagen, Hilden, Best.-Nr. 29504)
- RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Best.-Nr. 74106)

### 8.1.8 Sonstige Reagenzien

- 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Gibco BRL, Eggenstein, Best.-Nr. 28025-013)
- 100 bp DNA-Leiter, Marker (Gibco BRL, Eggenstein, Best.-Nr. 15628-019)
- Agarose (FMC Seakem LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 850004)
- HotWax™Mg<sup>++</sup> Beads (3,5 mM, Invitrogen, De Schelp, NL, Best.-Nr. W7000-03)
- Natriumazid (100 g, Roth, Karlsruhe, Best.-Nr. K305.1)
- dNTP(Desoxynukleotidtriphosphat)-Stammlösung:

dATP (100 mM Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1277049)	10 µl
dATP (100 mM Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1277049)	10 µl
dATP (100 mM Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1277049)	10 µl
dATP (100 mM Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1277049)	10 µl
DNase-/RNase-freies Wasser (BIO 101, Vista, USA, Best.-Nr. 2450-304)	360 µl
- Parafilm (Jürgens, Hannover, Best.-Nr. 9.17 0002)

### 8.1.9 Virusstämme

- BVDV-Stamm NADL aus der Sammlung des Instituts für Virologie der Tierärztliche Hochschule Hannover
- Gelbfieberimpfstamm 17D aus der Sammlung des Wehrwissenschaftlichen Instituts für Schutztechnologien-ABC-Schutz, Munster
- KSPV-Stamm Alfort 187 aus der Sammlung des Instituts für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

### 8.1.10 Wasser

- Aqua bidest., Herkunft Wasseraufbereitungsanlage des Instituts für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- DEPC-Wasser (BIO 101, Vista, USA, Best.-Nr. 2420-204)
- DNase-/RNase-freies Wasser (BIO 101, Vista, USA, Best.-Nr. 2450-304)

## 8.2 Geräte und Gebrauchsgegenstände

- 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 711750)
- 1 ml Glasröhrchen mit Schraubverschluß (Flow Fläschchen, LAT, Garbsen)
- 1,6 ml Mikroreaktionsgefäß (Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 710200)
- 10 ml Reagenzglas (LAT, Garbsen)
- 100 ml Erlenmeyerkolben (LAT, Garbsen)
- 200 ml Erlenmeyerkolben (LAT, Garbsen)
- 5 ml Glasröhrchen mit Schraubverschluß (Blaukappen, LAT, Garbsen)
- 50 ml Zentrifugenröhrchen, spitz (LAT, Garbsen)
- 50 ml-Erlenmeyerkolben (LAT, Garbsen)
- 500 ml Erlenmeyerkolben (LAT, Garbsen)
- Analysenwaage 1712 MP 8 (Sartorius GmbH, Göttingen)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator Typ B 5060 EK/CO<sub>2</sub> (Heraeus Hanau)
- Elektrophoresekammer *Wide Mini-Sub Cell GT System* (Bio-Rad, München, Best.-Nr. 170-4468)
- Gewebekulturflaschen 250 ml (Greiner, Nürtingen, Best.-Nr. 658170)
- Gewebekulturflaschen 50 ml (Greiner, Nürtingen, Best.-Nr. 690160)
- GT-Kamm 15 well-1,5 mm
- GT-Kamm 20 well-1,5 mm
- Handhomogenisiergerät *Polytron PT 1200 C* (Kinematica AG, Schweiz)
- Handschuhe Touch N Touff puderfreie Nitrilhandschuhe (Roth, Karlsruhe)
- Handschuhe, Latexhandschuhe, puderfrei (Roth, Karlsruhe)
- Inverses Mikroskop (Leitz, Wetzlar)
- Magnetrührer (Gesellschaft für Labortechnik m.b.H., Burgwedel)
- Magnetührstab, 3cm, (Jürgens, Hannover, Best.-Nr. 9197505)
- Mikroreaktionsgefäßöffner (Neolab, Heidelberg, Best.-Nr. 1-3105)
- Mikroreaktionsgefäßständer (Neolab, Heidelberg)
- Mikrospistille mit 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen (Fisher Scientific, Nidderau, Best.-Nr. 64596850)
- Mikrowellenherd

- Netzgerät *Power Pac 300* (Bio-Rad, München, Best.-Nr. 165-5051)
- Parafilm (Jürgens, Hannover, Best.-Nr. 9.17 0002)
- pH-Meter *Calimatic 766* (Jürgens, Hannover)
- Pipetten, *Pipetman, P20, P100, P200, P1000* (ABIMED, Langenfeld)
- Pipettenspitzen *Safe Seal Tips* 100 µl (Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 692066)
- Pipettenspitzen *Safe Seal Tips* 1000 µl (Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 691000)
- Pipettenspitzen *Safe Seal Tips* 20 µl (Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 692151)
- Pipettenspitzen *Safe Seal Tips* 200 µl (Biozym, Hessisch Oldendorf, Best.-Nr. 692069)
- Pipettierhilfe *Pipetboy plus* (Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz)
- Schüttler *Certomat MV-3* (Hans Landgraf, Langenhagen)
- Skalpellklingen (WDT)
- Sterile Gaze (WDT)
- Thermocycler (*Personal Cycler 20* mit Heizdeckel, Biometra, Göttingen, Best.-Nr. 050-506)
- Trockenschrank (80 °C) (Ehret, Emmerdingen)
- UV-Transilluminator mit Bildauswertegerätesystem, *Gelprint 2000i* (MWG-Biotech, Ebersberg)
- Waage 1213 MP (Sartorius GmbH, Göttingen)
- Wasserbad Typ 1003 (Gesellschaft für Labortechnik m.b.H., Burgwedel)
- Zentrifuge für 10 bis 100 ml Gefäße, *Minifuge* (Heraeus-Christ GmbH, Osterode/ Harz)
- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße, *Biofuge Pico* (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße, Mikroliterzentrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburg) bei 4 °C im Kühlraum
- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße, Mikroliterzentrifuge Z 231 M (Hermle GmbH u. Co., Gosheim)

## **Danksagungen**

**Herrn Prof. Dr. V. Moennig** danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Virologie.

**Frau PD Dr. I. Greiser-Wilke** danke ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die motivierende Unterstützung.

**Frau M. Kaps, Frau M. Koeller, Frau R. Neth und Frau H. Niebuhr** danke ich für ihre Hilfsbereitschaft im Labor.

**Herrn Prof. Dr. G. Herrler, Herrn PD Dr. L. Haas, Herrn Dr. G. Zimmer** und meinen Mitdoktoranden möchte ich für die freundlichen Diskussionen und Anregungen danken.

**Herrn Dr. H.-R. Frey und Frau J. Pipereit** danke ich für die Bereitstellung von Proben aus der BVDV-Diagnostik und die zellkulturellen BVDV-Nachweise sowie anregende fachliche Diskussionen.

**Frau Dr. G. Floegel, Frau G. Müller, Herrn H. Schulz und Herrn G. Thiem** danke ich für die Bereitstellung von Proben und des Virusstammes Alfort 187 aus dem EU-Referenzlabor für klassische Schweinepest und für den zellkulturellen Nachweis von KSPV

**Herrn Prof. Dr. J.F. Pohlenz**, Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, gilt mein Dank für die Bereitstellung von autoklaviertem Abwasser.

**Herrn Dr. Marschall und Frau Voß**, Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien-ABC-Schutz, Munster, danke ich für die Bereitstellung, Vermehrung und Titration des Gelbfiebertvirusimpfstammes 17D.

**Herrn PD Dr. H. Salisch**, Klinik für Geflügel der Tierärztlichen Hochschule Hannover, danke ich für die Einführung in die Herstellung primärer Hühnerembryofibroblasten und für nützliche Hinweise zur PCR.

**Herrn H. Schulz** möchte ich für die sehr gute Betreuung der Gerätetechnik danken.

**Allen Mitarbeitern** des Institutes danke ich für die freundliche Aufnahme.