

Bayer. Tierärztetag

<b>Hänichen und Minkus:</b> Retrospektive Studie zur Pathologie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas bei Hund und Katze / A retrospective study of the pathology of exocrine pancreatic diseases of dogs and cats	363
<b>Vollmar:</b> Chemotherapeutische Aspekte bei Knocheninfektionen / Chemotherapy of osteomyelitis	368
<b>Eichhorn:</b> Diagnostische Verfahren zum Virusnachweis in der tierärztlichen Praxis / Rapid viral diagnosis: general principles and techniques	377
Kälbertagung Berlin <b>Pohlentz, Woode, Fagerland und Liebler:</b> Bredavirusinfektion beim neugeborenen Kalb	380
<b>Straub, Funk und Bruchhof:</b> IPV-Belastungsversuche nach Applikation einer BHV1-Subunit-Vakzine / Studies on the prevention of IPV infection using a BHV1 subunit vaccine	383
<b>Lorenz:</b> Die Ausbrüche der enzootischen Rinderleukose in der Bundesrepublik Deutschland seit 1984 mit besonderer Berücksichtigung des Jahres 1989	388
<b>Vogel und Krause:</b> Die Sanierung eines großflächigen Brucelloseeinbruchs in einer langfristig anerkannten brucellosefreien Region / Control of a major outbreak of brucellosis in cattle in a previously uninfected region	390
<b>Bunka, Jeckstadt, Oltrogge, Schöss und Petzoldt:</b> Vorkommen von Antikörpern gegen Actinobacillus pleuropneumoniae in Schweineseren – Häufigkeit und Verteilung der Serovare 2, 3, 7 und 9 / Prevalence of antibodies against Actinobacillus pleuropneumoniae in sera of swine – frequency and distribution of serovares 2, 3, 7 and 9	397
<b>Schumm, Pohl und Willeke:</b> Ergebnisse des Einsatzes von Suiferm bei Absatzferkeln mit Durchfällen zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der gesunden Darmflora / The treatment of diarrhoea in piglets using Streptococcus faecium	402
<b>Weber, Broos, Wachowitz, Heil und Schultze-Rhonhof:</b> Nachweis von Salmonella cholerae-suis beim einheimischen Schwarzwild (Sus scrofa) / Salmonella cholerae-suis in wild boar (Sus scrofa) in Northern Bavaria	411
<b>Lensch:</b> Probleme der Alpaka-Haltung in den südamerikanischen Kordillern / Alpaca husbandry in South America	414
<b>Festl und Walser:</b> Untersuchungen über Clumping-factor-negative Staphylokokken aus Viertelgemelksproben von Kühen / Studies of coagulase negative staphylococci isolated from bovine quarter milk samples	418
<b>Mansfeld und Grunert:</b> EDV-System für eine integrierte tierärztliche Fruchtbarkeitsüberwachung beim Rind / An information system for the monitoring and management of dairy herd reproduction	424
<b>Busch und Bamberg:</b> Trächtigkeitsdiagnose beim Schaf / Pregnancy diagnosis in ewes	430
<b>Holtmann, Ising und Stoye:</b> Zur Wirkung von Triclabendazol auf experimentelle Fasciola-hepatica-Infektionen beim Pferd / Effect of triclabendazole on Fasciola hepatica in experimentally infected horses	434
<b>Sojka:</b> Ausbildung und Prüfung von Jagdhunden an lebenden Tieren	439
Vet-Report	443
Personalien / Hochschulnachrichten	447
Aus der DDR	448
Aus dem Gerichtssaal	449
Tagungsberichte (Zoonosen, Arzneimittelrückstände, Kathetersysteme für Groß- und Kleintiere)	450
Buchbesprechung / Firmen-Infos	452
Impressum	455
Termine	456

Tierärztl. Umschau 45, 377–380 (1990)

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr)

## Diagnostische Verfahren zum Virusnachweis in der tierärztlichen Praxis

von Werner Eichhorn

4 Tabellen, 16 Literaturangaben)

Kurztitel: Virusnachweis in der Praxis

Stichworte: Virusinfektion – Diagnostik – Virusnachweis

### Zusammenfassung

Die Prinzipien von Verfahren, die eine virologische Diagnose in der tierärztlichen Praxis ermöglichen, werden erläutert und den klassischen Nachweisverfahren gegenübergestellt. Ein allgemein gültiger Arbeitsablauf wird erläu-

tert und Hinweise zur Auswahl kommerzieller Kits gegeben. Schließlich wird der Wunsch geäußert, das Angebot an solchen diagnostischen Kits zu vermehren und das Zulassungsverfahren zu modifizieren.

### Abstract

#### Rapid viral diagnosis: general principles and techniques.

The general principles for the methods used in the rapid diagnosis of virus infections in practice laboratories are described and compared with specialist laboratory procedures. Advice on the selection of suitable commercial kits is provided and the need for more diagnostic kits is stressed.

Unter den vielen virusbedingten Erkrankungen gibt es nur sehr wenige, bei denen eine Diagnose anhand des klinischen Bildes allein bzw. unter Zuhilfenahme von Laborbefunden, wie z. B. dem Blutbild, möglich ist. Bei einigen anderen Erkrankungen ist selbst bei einem ausgesprochen typischen Verlauf nur eine Verdachtsdiagnose möglich. Als Beispiel möchte ich die Parvovirusinfektion des Schweines und die BHV1-Infektion des Rindes (IBR) anführen, bei denen ein Virusnachweis zur Absicherung der Verdachtsdiagnose unbedingt erforderlich ist.

Die dritte Gruppe ist, sowohl was die Zahl der verschiedenen Erkrankungen und Infektionen als auch die Häufigkeit des Auftretens anbelangt, wohl die um-

fänglichste. Hier haben wir es mit klinischen Bildern zu tun, die durchaus unterschiedliche Ursachen haben können, infektiöse aber auch nichtinfektiöse. Dazu kommt, daß unter den infektiösen Ursachen wiederum verschiedene Erreger beteiligt sein können.

Einige Beispiele möchte ich nennen, ohne dabei Anspruch auf Vollständigkeit erheben zu wollen. Zunächst die Aborte bei Rind und Pferd, aber auch beim Schwein, die durch eine Virusinfektion ausgelöst sein können, aber auch ganz andere Ursachen haben können. Durchfallerkrankungen können ebenfalls durch Viren verursacht sein. Beim Kalb, zum Beispiel (Tabelle 1), finden wir neben bakteriellen bzw. parasitären Ursachen nicht weniger als fünf Virusarten, die als Ätiologie in Frage kommen. Ähnlich ist die Situation bei den respiratorischen Erkrankungen (Tabelle 2); beim Pferd sehen wir hier eine Vielzahl von Viren, die als Erreger in Frage kommen. Ähnliches gilt für eine Reihe weiterer Tierarten. Bei diesen Erkrankungen kommen wir also ohne ätiologische Diagnose nicht aus, hier ist neben einer bakteriologischen und gegebenenfalls parasito-

logischen Untersuchung auch eine virologische Untersuchung erforderlich.

Tabelle 1: Übersicht über mögliche Ursachen von Durchfallerkrankungen beim neugeborenen Kalb

E. coli	Toroviren
Kryptosporidien	BVD
Rotavirus	IBR (?)
Coronavirus	nicht-infektiöse Faktoren

Tabelle 2: Übersicht über mögliche Ursachen von respiratorischen Erkrankungen beim Pferd

Influenzaviren	Reo- und Rhinoviren
Herpesviren (EHV 1 bzw. 4)	bakterielle Infektionen
	nicht-infektiöse Faktoren

Tabelle 3: Verfahren zur virologischen Diagnose

Virologische Diagnose	
I. direkt	II. indirekt durch
	Antikörpernachweis
– Erregernachweis	– retrospektiv, Titeranstieg in Serumpaaren
– Antigennachweis	– Nachweis von spezifischem IgM
– Nachweis viraler Nukleinsäure	

Eine virologische Diagnose kann grundsätzlich durch zwei unterschiedliche Vorgehensweisen gestellt werden (Tabelle 3), zum einen direkt, durch den Nachweis des Erregers bzw. von Virusantigenen. Ein neuer und noch wenigen Instituten vorbehaltener Weg ist der Nachweis von viraler Nukleinsäure. Bei den indirekten Verfahren kann in der Veterinärmedizin bisher nur eine retrospektive Diagnose durch den Nachweis eines Anstiegs der Antikörpertiter in Serumpaaren gestellt werden. Verfahren zum Nachweis von virusspezifischem IgM, das rasch nach der Injektion gebildet wird, ermöglichen dagegen eine rasche Diagnose einer frischen Injektion. Solche Methoden sind in der Tiermedizin derzeit leider noch nicht verfügbar.

Ich will mich im folgenden daher nur mit den direkten Diagnoseverfahren befassen. Ein Virusnachweis war bis vor wenigen Jahren nur an Untersuchungsämtern bzw. Instituten möglich, wobei man sich klassischer Verfahren zum Virusnachweis bediente. Dazu gehören z. B. die Elektronenmikroskopie oder die Virusanzüchtung in Zellkulturen. Weder aus diesen noch aus anderen etablierten Techniken, wie z. B. der Immunfluoreszenz, ließen sich Verfahren entwickeln, die in einer durchschnittlich ausgerüsteten Praxis durchführbar

sind. Diese Methoden erfordern einen hohen apparativen Aufwand sowie spezielle Kenntnisse und Ausbildung des Personals. Ein weiterer Nachteil ist, daß diese Verfahren, mit Ausnahme der Elektronenmikroskopie, sehr zeitaufwendig sind. Am schnellsten ist noch die direkte Immunfluoreszenz, die in wenigen Stunden bereits ein Ergebnis liefert. Häufig ist jedoch eine Anzüchtung des Erregers nötig, um eine Anreicherung zu erzielen. Dann kann es durchaus mehrere Wochen dauern, bis eine Diagnose gestellt werden kann. Moderne Verfahren zum Virusnachweis in der Praxis oder gar im Stall beruhen auf relativ neuen Methoden, die vor allem in den 70er Jahren entwickelt wurden. Diese Verfahren, ELISA und Latex-Agglutination, beruhen auf serologischen Methoden, dem Nachweis viraler Antigene durch spezifische Antikörper. Das wesentlich Neue ist bei beiden Techniken die sogenannte Festphasen-Technologie (Engvall und Perlmann, 1972). Dabei werden spezifische Antikörper an Plastikmaterialien, die ausgesprochen unterschiedliche Formen haben können, adsorbiert oder auch chemisch gekoppelt. Die chemische Kopplung bietet zwar Vorteile in Hinsicht auf eine größere Stabilität der Bindung, ist aber auch wesentlich aufwendiger als die Absorption von Antikörpern an geeignete Kunststoffe (Yolken, 1982). An die gebundenen, spezifischen Antikörper lagert sich Virusantigen an, während andere Substanzen in der Probe nicht binden und durch den anschließenden Waschschritt entfernt werden. Neben der Spezifität des Antikörpers, kommt den Waschvorgängen eine entscheidende Bedeutung zu. Hier sind die Arbeitsanleitungen besonders genau zu beachten. Das gebundene Antigen wird nun durch einen zweiten, enzymmarkierten Antikörper, dem Konjugat, erkannt. Zunächst bindet dabei dieser zweite Antikörper an das Antigen, und nach einem weiteren Waschvorgang wird das Enzym mit Hilfe von Indikatoren, die eine Substratumsetzung anzeigen, nachgewiesen. Die Stärke dieser Farbreaktion ist dabei abhängig von der Anzahl der vorhandenen Enzymmoleküle und ist damit ein Maß für den Antigengehalt in der Probe. Damit kann bei Ablesung mit dem bloßen Auge zumindest eine semiquantitative

Aussage gemacht werden. Eine wesentliche Zeit- und Arbeitersparnis kann durch den Einsatz monoklonaler Antikörper (MAK) erzielt werden, wenn zwei, gegen verschiedene Epitope gerichtete, MAK verwendet werden. Dann kann die Zugabe des Konjugats unmittelbar nach dem Einbringen der Probe erfolgen, da die Antikörper ja nicht um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren (Yolken und Leister, 1982; Mildbrand et al., 1984). Bei diesem Verfahren ist dann nur ein einziger Waschschritt erforderlich. Eine Weiterentwicklung dieser Festphasen-Technologie benützt zur Bindung der Antikörper keine Plastikgefäße sondern eine poröse Membran (Hendry und Herrmann, 1980). In dem meines Wissens einzigen kommerziellen Kit, der diese Technik verwendet, ist diese Membran wiederum in ein Gefäß eingebaut, bei dem im Teil unter der Membran absorbierendes Material für einen gleichmäßigen Fluß der Probe sowie der anderen Reagenzien sorgt (Valkirs und Barton, 1985). Um ein Verstopfen der Membran zu verhindern, wird die Probe über ein Vorfilter aufgegeben. Auch bei diesem Verfahren muß nur einmal, nämlich nach der Konjugatzugabe, gewaschen werden.

Als weiteres kommerziell erhältliches Verfahren, das auf der Festphasen-Technologie beruht, ist die Latex-Agglutination zu nennen. Latex-Partikel werden durch Polymerisation von Kohlenwasserstoffen, vor allem Styren, hergestellt. Die für diagnostische Zwecke verwendeten Kits benützen meist Partikel von 0,8–1 µm Durchmesser, an die spezifische Antikörper gebunden werden (Bangs, 1984). Ist in der Probe das entsprechende Virusantigen vorhanden, so kommt es zur Ausbildung dreidimensionaler Komplexe, die mit bloßem Auge als Agglutination sichtbar sind. Im negativen Fall bleibt dagegen die homogene, milchige Suspension bestehen. Eine positive Reaktion bildet sich in wenigen Minuten aus, daher ist diese Technik die wohl am schnellsten durchführbare Nachweismethode, die derzeit auf dem Markt erhältlich ist (Pai et al., 1985).

### **Was erwarten wir prinzipiell von diagnostischen Kits?**

Die primären Anforderungen sind die-

selben, die wir an alle diagnostische Verfahren stellen, nämlich Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit. Diese drei Punkte sind die unabdingbaren Voraussetzungen für jede exakte Diagnose. In Deutschland unterliegen Verfahren zur Diagnostik von Infektionskrankheiten der Tiere laut Impfstoffverordnung für Tiere der Zulassung durch das Bundesgesundheitsamt. Daher ist zunächst davon auszugehen, daß die auf dem Markt befindlichen Kits, was unsere drei Hauptforderungen anbelangt gleichwertig sind. Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen handelsüblichen Testkits berichten auch von einem hohen Maß an Übereinstimmung (Teramoto et al., 1984; Herbst et al., 1986; Cieslicki und Harant, 1987; Kölbl und Leitold, 1988; Kölbl, 1988). Welcher Test nun näher an der Wahrheit liegt, kann aber nur nach Austestung einer sehr großen Zahl an Proben festgestellt werden, wie Beispiele aus der Humanmedizin – Antikörper gegen HIV; Rotavirus (Krause et al., 1983) – deutlich zeigen. Wenn wir also die drei Kardinalpunkte eines diagnostischen Verfahrens außer acht lassen können, sollten wir uns anderen, mehr praktischen Überlegungen, zuwenden. Als erstes ist die Frage zu klären, ob zur Durchführung des Tests eine Vorbereitung der Proben notwendig ist. Ein Test zum Nachweis von Rotavirus beim Kalb ist der ideale Test für die Stallgasse, aber nur, wenn eine Zentrifugation des Kotes nicht nötig ist. Ähnliches gilt für Tests, die auch mit Vollblut oder z. B. Speichel und nicht nur mit Serum arbeiten (Lutz und Jarret, 1987; Lewis et al., 1987). Zum Punkt »Arbeitsablauf« muß individuell ausprobiert und gelöst werden, denn hier stehen persönliche Vorlieben im Vordergrund. Die Punkte Haltbarkeit und Probenzahl pro Testkit stehen naturgemäß in einem engen Zusammenhang. Das optimale Angebot für jede Praxis ist hier sicher noch nicht gegeben, unterschiedliche Abpackungen mit unterschiedlichen Probenzahlen für Klein- und Großverbraucher sind sicher wünschenswert.

Zum Schluß zur Ernüchterung eine kurze Übersicht über die aktuell auf dem Markt befindlichen Diagnostika (Tabelle 4). Diese Liste ist leider sehr kurz. Für die Großtierpraxis haben wir nur den Rotavirus-Nachweis, für den

Kleintiersektor kommen noch Parvovirus beim Hund sowie FeLV und FeTLV (FIV) bei der Katze dazu.

**Tabelle 4: Kommerziell erhältliche Kits zum Virusnachweis (ohne Anspruch auf Vollständigkeit)**

- Rotavirus	- FeLV
- Canines Parvovirus	- FeTLV (FIV)

Deshalb möchte ich hier einige Wünsche äußern. Zunächst an die Industrie: Erweitern Sie die Angebotspalette; dabei sind vor allem die Impfstoffhersteller angesprochen, die für ihre Produkte möglichst auch die entsprechenden Diagnostika anbieten sollten. An den Hochschulen des In- und Auslands wurden zahlreiche Nachweisverfahren entwickelt, die relativ rasch kommerzialisiert werden könnten. Auch Eigenentwicklungen der verschiedenen Häuser sollten verstärkt durchgeführt werden, da die Hochschulpolitik, trotz gegenteiliger Beteuerungen, die angewandte Forschung nicht besonders unterstützt. Für solche Entwicklungen können sicher eine Reihe von bereits vorhandenen monoklonalen Antikörpern verwendet werden. Der zweite Wunsch geht in Richtung auf eine Änderung der Zulassungsbestimmungen. Selbstverständlich müssen Verfahren zum Nachweis anzeige- oder meldepflichtiger Seuchen zulassungspflichtig sein, hier ist ein strenges Verfahren angezeigt. Ob es aber sinnvoll und nötig ist, die gleichen Maßstäbe für alle Infektionskrankheiten zu setzen, möchte ich bezweifeln. Ein wichtiges Kriterium für die Zulassung sind in der Regel, neben eigenen Untersuchungen der Zulassungsstelle, Vergleichsuntersuchungen mit bereits etablierten Methoden, die an unabhängigen Institutionen durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse werden dann in der Regel auch veröffentlicht. Diese Publikationen und meist dann auch nachfolgende Untersuchungen sind den Tierärzten zugänglich bzw. werden von den Herstellern und Vertreibern zugänglich gemacht. Bei schlechten Ergebnissen im Vergleich mit anderen Verfahren wird sich der Hersteller hüten, das Produkt auf den Markt zu bringen, bei guten Ergebnissen sind solche Vergleichsuntersuchungen sicher genauso aussagekräftig wie eine Zulassungsnummer. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist, daß eine Reihe

von Diagnostika, die an den Untersuchungämtern und Instituten verwendet werden, diese Zulassung ebenfalls nicht besitzen. Ich bin sicher, ein Abbau des Hindernisses »Zulassung« könnte die Entwicklung neuer Testverfahren wesentlich erleichtern.

#### Schrifttum

1. Bangs, L. B. (1984): *Uniform latex particles*. Seardyn Inc., Indianapolis.
2. Cieslicki, M. u. J. Harant (1987): *Nachweis des Felinen Leukämievirus mittels ELISA-Verfahren*. *Prakt. Tierarzt* 6, 45-52.
3. Engvall, E., and P. Perlmann (1972): *Enzyme linked immunosorbent assay. ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-linked anti-immunoglobulin in antigen coated tubes*. *J. Immunol.* 109, 129-135.
4. Hendry, R. M., and J. E. Hermann (1980): *Immobilization of antibodies on nylon for use in enzyme-linked immunoassay*. *J. Immunol. Methods* 35, 286-296.
5. Herbst, W., K. Danner, H. Krauss u. F. Behrens (1986): *Zum Nachweis von Hundeparvovirus in der Praxis - Untersuchungen mit dem »Diasystem™ Canine Parvo«, einem Parvovirus-ELISA-Testkit*. *Prakt. Tierarzt* 6, 480-485.
6. Krause, P. J., J. S. Hyams, P. J. Middleton, V. C. Herson and J. Flores (1983): *Unreliability of Rotavirus ELISA in neonates*. *J. Pediatr.* 103, 259-262.
7. Kölbl, S. (1988): *Vergleichende Untersuchungen auf FeLV mittels zweier handelsüblicher ELISA-Kits*. *Wien. tierärztl. Mschr.* 75, 10-14.
8. Kölbl, S. u. B. Leitold (1988): *Kritische Anwendung des CITE-FeLV-Tests, einem neu konzipierten ELISA zur Untersuchung auf das Feline Leukosevirus in Katzenblutproben*. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 101, 337-341.
9. Lewis, M. G., K. A. Wright, L. J. Lafrado, P. J. Shanker, N. E. Palumbo, E. D. Lemoine and

- R. G. Olsen (1987): *Saliva as a source of feline leukemia virus antigen for diagnosis of disease*. *J. clin. Microbiol.* 25, 1320-1322.
10. Lutz, H., and O. Jarrett (1987): *Detection of feline leukemia virus infection in saliva*. *J. clin. Microbiol.* 25, 827-831.
11. Mildbrand, M. M., Y. A. Teramoto, J. K. Collins, A. Mathys and S. Winston (1984): *Rapid detection of canine parvovirus in feces using monoclonal antibodies and enzyme-linked immunosorbent assay*. *Am. J. Vet. Res.* 45, 2281-2284.
12. Pai, C. H., M. S. Shahrabadi and B. Inc (1985): *Rapid diagnosis of rotavirus gastroenteritis by a commercial latex agglutination test*. *J. clin. Microbiol.* 22, 846-850.
13. Teramoto, Y. O., M. M. Mildbrand, J. Carlson, J. K. Collins and S. Winston (1984): *Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, DNA hybridization, hemagglutination, and electron microscopy for detection of canine parvovirus infections*. *J. clin. Microbiol.* 20, 373-378.
14. Valkirs, G. E., and R. Barton (1985): *Immuno Concentration™ - a new format for solid-phase immunoassays*. *Clin. Chemistry* 31, 1427-1431.
15. Yolken, R. H. (1982): *Enzyme immunoassay for the detection of infectious antigens in body fluids: Current limitations and future prospects*. *Rev. Infect. Dis.* 4, 35-68.
16. Yolken, R. H. and F. Leister (1982): *Rapid multiple-determinant enzyme immunoassay for the detection of human rotavirus*. *J. Infect. Dis.* 146, 43-46.

Der Autor bedankt sich herzlich bei Frau Sheila Scott für die engagierte Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskripts.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Werner Eichhorn, Veterinärstraße 13, D-8000 München 22