

# Veterinärmedizin und Molekularbiologie : Möglichkeiten und Grenzen der Virusdetektion

Autor(en): **Pauli, U. / Zanoni, R. / Hertig, C.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **133 (1991)**

Heft 1

PDF erstellt am: **20.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-588722>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# VETERINÄRMEDIZIN UND MOLEKULARBIOLOGIE: MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER VIRUSDETEKTION

U. PAULI, R. ZANONI, C. HERTIG, E. PETERHANS

## ZUSAMMENFASSUNG

Seit einigen Jahren hat die Molekularbiologie vermehrt in der Veterinärmedizin Einzug gehalten, so z.B. in der Tierzucht. Molekularbiologische Methoden eröffnen auch neue Möglichkeiten in der Virusdiagnostik, indem sie einen schnellen und sensitiven Virusnachweis erlauben. Der Artikel gibt einen Überblick über die in der Virusdiagnostik gebräuchlichsten molekularbiologischen Methoden und einen Ausblick auf neue Entwicklungen, wobei auch die Grenzen der Methoden zur Sprache kommen. Im besonderen wird auf eine neue Methode eingegangen, nämlich die «Polymerase Chain Reaction» (PCR). Die PCR hat in der Molekularbiologie eine kleine Revolution herbeigeführt und kann möglicherweise auch für die Virusdiagnostik von Nutzen sein. Anhand von Beispielen (Detektion von Schaf- und Ziegen-Lentiviren sowie von Bovinem Virus Diarrhoe Virus) wird diese Methode vorgestellt.

**SCHLÜSSELWÖRTER:** *In situ* Hybridisierung — Northern-/Southern Transfer — Polymerase Chain Reaction — Caprines Arthritis-Encephalitis Virus — Bovines Virus Diarrhoe / Mucosal Disease Virus

## EINLEITUNG

Um im Labor eine Virusinfektion nachzuweisen, stehen uns zwei Wege zur Verfügung: der Nachweis der durch eine Virusinfektion verursachten Antikörper und der Nachweis des Virus selbst. Naturgemäss vergehen bei einer akut verlaufenden Infektion etwa zwei Wochen, bis in einem Tier nachweisbare Antikörper gebildet sind. Dies bedeutet, dass zweimal eine Blutprobe entnommen werden muss. Die erste Probe wird im akuten Stadium der Krankheit, die zweite etwa zwei bis drei Wochen später entnommen. Diese sogenannten gepaarten Serumproben werden im Labor gemeinsam untersucht. Der Anstieg des Antikörpertiters weist auf die Infektion hin.

## VETERINARY MEDICINE AND MOLECULAR BIOLOGY: POSSIBILITIES AND LIMITS OF VIRAL DETECTION

In the last years molecular biology has gained more and more influence in veterinary medicine, e.g. in animal breeding. In addition, methods of molecular biology may open new areas in the diagnosis of viral diseases, because they are fast and very sensitive. The following article displays an overview of molecular biological techniques that are currently in use for virus detection. In addition, the limits of these methods are discussed. In particular, the polymerase chain reaction (PCR) is described in some detail. Since this method has a considerable impact on the progress in molecular biology, it may as well be of importance for the detection of viruses. The potential of PCR in virus detection is illustrated using sheep and goat lentivirus and Bovine Viral Diarrhoea / Mucosal Disease virus.

**KEY WORDS:** *In situ* hybridization — Northern/Southern blotting — polymerase chain reaction, caprine arthritis encephalitis virus, bovine viral diarrhoea / mucosal disease virus

In den Fällen, wo im Labor moderne Methoden wie der sog. ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) zur Verfügung stehen, dauert der eigentliche Test nur wenige Stunden. Bei vielen Viren ist es leider immer noch notwendig, die Antikörper in einem sog. Neutralisationstest zu bestimmen. Dabei werden verschiedene Verdünnungen des zu untersuchenden Serums mit einer definierten Anzahl von infektiösen Viren inkubiert und das Serum-Virus-Gemisch anschliessend auf Zellkulturen verbracht. Sind im Serum genügend neutralisierende Antikörper vorhanden, so kann das Virus die Zellen nicht mehr infizieren; es ist neutralisiert. Im Mikroskop überprüft man, ob die Folgen der Virusinfektion – in den meisten Fällen ist dies der Zelltod (zytopathischer Effekt) – ausblei-

ben. Der Neutralisationstest dauert mehrere Tage und ist störanfällig, denn man arbeitet mit lebenden Zellen.

Auf Zellen ist man meistens auch dann angewiesen, wenn nicht die Antikörper, sondern das Virus selbst nachgewiesen werden soll. Zellkulturen werden mit den in das Labor eingesandten Proben inokuliert. Täglich wird dann überprüft, ob ein zytopathischer Effekt eintritt. Ist dies der Fall, so muss man das Virus, welches sich in der Kultur vermehrt hat, anschliessend noch mit neutralisierenden Antikörpern identifizieren. Dies stellt die Umkehrung des oben erwähnten Neutralisationstests dar: man kennt das Virus nicht und identifiziert es mittels bekannten Antisera.

Die Isolierung von Viren auf Zellkulturen ist äusserst aufwendig. Oft muss man mit dem virushaltigen Untersuchungsmaterial sog. Blindpassagen machen, bei welcher Zell-Lysat aus der ersten inokulierten Zellkultur auf eine zweite und dann Lysat aus der zweiten auf eine dritte Zellkultur verimpft wird. Für Virusisolierungen werden an die Zellkulturen sehr hohe Anforderungen gestellt. Theoretisch kann man eine aus einem Organ (z. B. Niere) frisch angesetzte Zellkultur 40–50 mal umsetzen (passagieren), aber die Zellen verlieren ihre optimale Empfänglichkeit für Viren schon nach 8–10 Passagen. Um eine befriedigende Diagnostik anbieten zu können, müssten wir nicht nur eine Art, sondern ein ganzes Spektrum von verschiedenen, für alle in Frage kommenden Viren optimal empfänglichen Zellkulturen ständig bereithalten.

Auf den Ablauf einer Virusinfektion bezogen ist der Nachweis der Viren schneller als der Nachweis der von diesen im infizierten Organismus zurückgelassenen Spuren – den antiviralen Antikörpern. In einigen Fällen ist es möglich, einen schnellen Virusnachweis anzubieten – beispielsweise bei Stutenabort oder bei Rotavirusinfektionen. In diesen Fällen weist man mittels Immunfluoreszenz oder ähnlichen Techniken im Gewebe Virusantigen nach. Oft aber erreicht die virologische Diagnostik auch nicht annähernd die Schnelligkeit und Effizienz der bakteriologischen Diagnostik; Viren werden sich nie in auch noch so leckeren Bouillons vermehren!

In der molekularbiologischen Forschung wurde eine ganze Reihe von Techniken entwickelt, welche für die virologische Diagnostik neue Möglichkeiten eröffnen. Der Virusnachweis zielt dabei auf eine bisher in der Diagnostik wenig ausgenützte Eigenschaft der Viren ab: die Erbsubstanz, welche entweder aus RNA oder DNA besteht. Wir möchten im Folgenden die wichtigsten neuen Techniken vorstellen. Wir sind uns dabei bewusst, dass viele noch nicht praxisreif sind, glauben aber, dass wir uns auch in der Veterinärmedizin über diese Entwicklungen informieren und sie für unsere Arbeit erschliessen müssen.

Man unterscheidet bei den für den Virusnachweis verwendbaren molekularbiologischen Methoden 1) in situ Hybridisierung (Cox et al., 1984), 2) Southern-/Northern-Transfer (Southern, 1975; Khandijan, 1987) und 3) «Polymerase Chain Reaction» (PCR; (Saiki et al., 1985; 1988)). Die ersten beiden Methoden werden meistens nur in speziellen Fällen angewendet, weil in der Mehrzahl der Fälle mit Radioaktivität gearbeitet werden muss und die Methodik aufwendig ist. Die PCR hingegen hat in der Virusdiagnostik wie auch in der Grundlagenforschung eine kleine Revolution herbeigeführt, da sie einfach durchzuführen, schnell und ausserordentlich sensitiv ist.

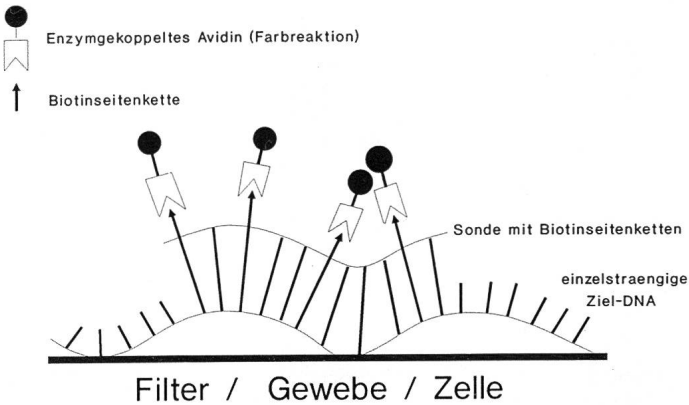
## DIREKTER NACHWEIS VON VIRUSNUKLEINSÄURE

### In situ Hybridisierung

Unter in situ Hybridisierung versteht man den Nachweis von DNA oder RNA Molekülen am Ort, d.h. direkt in einer Zelle oder in einem Gewebe. Kultivierte Zellen oder Gewebeschnitte werden so behandelt, dass die Nukleinsäuren für eine Hybridisierung, d.h. eine Anlagerung einer spezifischen Sonde zugänglich werden. (Als Sonde bezeichnet man ein Stück RNA oder DNA, das in vitro radioaktiv markiert wurde und das komplementär zu einem Abschnitt der zu detektierenden Nukleinsäure ist.) Anschliessend an die Hybridisierung wird eine Filmemulsion auf das Präparat aufgeschichtet und während 4–7 Tagen im Dunkeln exponiert. Nach der Entwicklung der Filmemulsion kann das Präparat unter dem Mikroskop ausgewertet werden. Schwarz angefärbt sind die Orte im Gewebe oder in der Zelle, wo sich die gesuchte Nukleinsäure befindet. Mit einer genügenden Anzahl von Präparaten kann dann auf das Vorhandensein oder auf die Abwesenheit von Virusnukleinsäure geschlossen werden.

Als Alternative zum Nachweis mittels radioaktiv markierten Sonden kann diese Methode auch mit Hilfe von nicht-radioaktiven DNA-Sonden durchgeführt werden, z. B. mit dem Biotin-Avidin-System (Langer-Safer et al., 1982). Bei diesen wird an Stelle eines radioaktiven Nukleotids ein Nukleotid mit einer Biotinseitenkette eingebaut (Abb. 1). Dieses Biotinmolekül dient als hochspezifischer Ligand für Avidin. Das Avidin kann dann wiederum mit enzymgekoppelten Reagentien mit einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Diese Technik wurde z. B. angewendet, um in einer mit Epstein-Barr-Virus transformierten Zellkultur eine einzelne, in ein Chromosom eingebaute Kopie des Virus nachzuweisen (Lawrence et al., 1988). Der Nachweis einer einzelnen Kopie einer

Abb. 1: Schematische Darstellung der Hybridisierung mit einer nicht radioaktiven Sonde



Nukleinsäure stellt allerdings eher die Ausnahme als die Regel dar bei der in situ Hybridisierung.

Im Ganzen gesehen ist die in situ Hybridisierungstechnik sehr anspruchsvoll im apparativen sowie im personellen Bereich und auch teuer. Zudem können die viralen Nukleinsäuremoleküle in den meisten Fällen nur nachgewiesen werden, wenn sie in genügender Menge vorhanden (für RNA: 1000–2000 Moleküle an einem Ort) und genügend lang sind (mindestens 5000 Nukleotide). Somit ist diese Technik trotz der grossen Sensitivität ungeeignet für die Routinediagnostik und nur für spezielle Anwendungen attraktiv.

**Southern-/Northern-Transfer**

Hier werden zuerst die Nukleinsäuren aus den Zellen gewonnen und anschliessend in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Gel (Polyacrylamid oder Agarose) erlaubt die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten nach ihrer Grösse: kleine Moleküle wandern im elektrischen Feld schneller in Richtung Anode als grosse. Die Nukleinsäuren im Gel werden dann auf einen Nitrocellulose- oder Nylonfilter transferiert. Man spricht von Southern-Transfer, wenn DNA, und von Northern-Transfer, wenn RNA transferiert wird. Beide Techniken unterscheiden sich in der Zusammensetzung des Gels und in der Art des Transfers der Nukleinsäure auf den Filter. Die transferierten Nukleinsäuren werden mit einer radioaktiven oder nichtradioaktiven Sonde hybridisiert (siehe oben). Mittels Autoradiographie auf Röntgenfilm werden dann die an die gesuchte Nukleinsäure gebundenen radioaktiv markierten Sonden sichtbar gemacht. Bei der nichtradioaktiven Detektion wird eine Farbreaktion durchgeführt.

Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass sie relativ unempfindlich ist. Für maximale Sensitivität werden radioak-

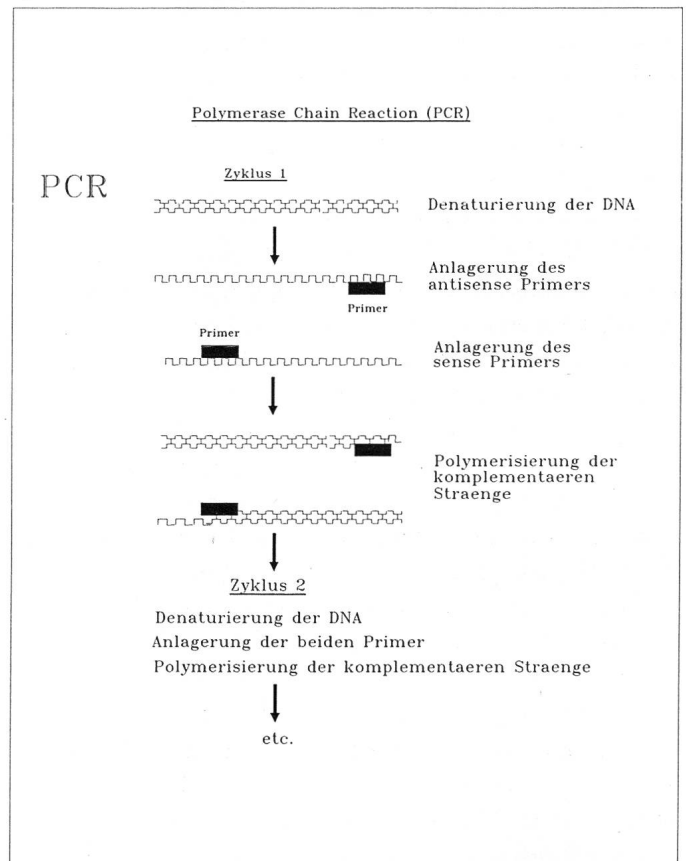
tiv markierte Sonden benötigt. Auch in diesem Fall können nur etwa 1–10 Picogramm Nukleinsäure nachgewiesen werden. Bei einem 3000 Nukleotid grossen DNA-Stück entspricht dies etwa  $10^5$  Kopien. Southern- und Northern-Transfer erlauben es aber, die genaue Grösse eines DNA- oder RNA-Stückes zu bestimmen.

**NACHWEIS VON AMPLIFIZIERTER VIRUSNUKLEINSÄURE MITTELS «POLYMERASE CHAIN REACTION»**

Als revolutionär in bezug auf die Sensitivität muss die PCR bezeichnet werden. Selten hat sich eine Methode in so kurzer Zeit in so vielen verschiedenartigen Laboratorien etabliert (Clewley, 1989; White et al., 1989).

Das Prinzip der PCR besteht darin, dass die im Untersuchungsmaterial vorhandene virale Nukleinsäure zuerst spezifisch amplifiziert und erst anschliessend detektiert wird. Um einen Vergleich mit der Stecknadel im Heustock zu machen: Nehmen wir an, dass sich drei unterschiedlich gefärbte Stecknadeln (rot, blau, grün) im Heustock befinden. Wenn wir z.B.

Abb. 2: Schematische Darstellung des ersten Zyklus der Polymerase Chain Reaction



eine blaue Stecknadel finden wollen, wird die Anzahl der blauen Stecknadeln zuerst vermehrt, bevor wir sie zu suchen beginnen. Ein typisches Beispiel einer PCR-Reaktion ist in Abb. 2 dargestellt.

In einem ersten Zyklus wird die doppelsträngige DNA durch Hitze bei 94 °C denaturiert, d. h. die beiden Stränge werden voneinander getrennt. Dann folgt eine Abkühlung auf eine Temperatur zwischen 45 °C und 65 °C, bei der sich kleine synthetisch hergestellte DNA-Stücke (auch Primer genannt) spezifisch an die komplementären DNA-Sequenzen anlagern können. Ein Primer ist komplementär zu einem Strang der DNA und der andere Primer ist komplementär zum anderen Strang. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase werden die Primer nun so verlängert, bis sie mindestens die Region des anderen Primers erreichen. Damit sind aus einem DNA-Doppelstrang zwei geworden und der erste Zyklus ist abgeschlossen. Da man bei der Polymerisation eine Polymerase aus einem hitze-resistenten Bakterium (*Thermus aquaticus*) verwendet, kann man die Polymerisierungsreaktion bei 74 °C ablaufen lassen (*Chien et al., 1976; Saiki et al., 1988*). Diese hohe Temperatur bei der Polymerisation erlaubt eine sehr hohe Genauigkeit und Spezifität der Reaktion, weil sich die Primer bei dieser Temperatur nur an identische Sequenzen anlagern können.

Im nächsten Zyklus werden die beiden DNA-Stränge durch Hitzedenaturierung wieder getrennt, die beiden Primer binden an ihre komplementäre Erkennungssequenz und die Polymerase ergänzt beide wieder zu doppelsträngiger DNA. Ein solcher Zyklus wird 30–50 mal wiederholt, was zu einer theoretischen Vervielfältigung von  $2^{30}$ – $2^{50}$  ( $10^9$ – $10^{15}$ -fach) führt. Das Amplifikationsprodukt (ein definiertes Stück DNA) ist gegeben durch diese zwei Primer und ist so gross wie die Distanz zwischen den 5'-Enden der beiden Primer. Das Resultat der Amplifikation kann in vielen Fällen mit Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### **VORTEILE DER PCR FÜR DIE DIAGNOSTIK**

Die grossen Vorteile der Methode liegen in den folgenden Punkten:

- 1) In der Einfachheit der Durchführung und dem relativ kleinen technischen Aufwand.
- 2) In der Schnelligkeit, mit der sie ausgeführt werden kann. Ein typischer PCR-Prozess ist nach etwa 2–3 Stunden abgeschlossen. Die Analyse dauert eine weitere Stunde, wenn das vervielfältigte DNA-Stück in einem Gel detektiert werden kann. In vielen Fällen muss jedoch eine zusätzliche Hybridisierung mit einer Sonde durchgeführt werden, was 1–2 Tage zusätzliche Arbeit bedeutet, bis klare Resultate erhalten werden. Mit dieser Hybridisie-

rung wird die Spezifität gewährleistet und zudem die Sensitivität 100fach gesteigert.

- 3) Der Heiz- und Kühlprozess kann mit einem computergesteuerten Heizblock automatisiert werden.

In einem Schnellverfahren können so z.B. Blutproben für die Untersuchung auf Viren oder andere Keime wie Bakterien und Parasiten innerhalb eines Tages verarbeitet und aussagekräftige Resultate erhalten werden (*Clewley, 1989*).

#### **NACHTEILE DER PCR**

Theoretisch ist es möglich, ein einziges Molekül aus einer Probe zu vervielfältigen und dann zu detektieren. Diese enorme Sensitivität ist aber auch einer der grössten Nachteile der Methode, weil schon minimste Kontaminationen zu falsch positiven Resultaten führen können (*Lo et al., 1988; Kwok und Higuchi, 1989*). In einem Aerosolpartikel von 20 Å können sich Tausende von DNA-Stücken befinden.

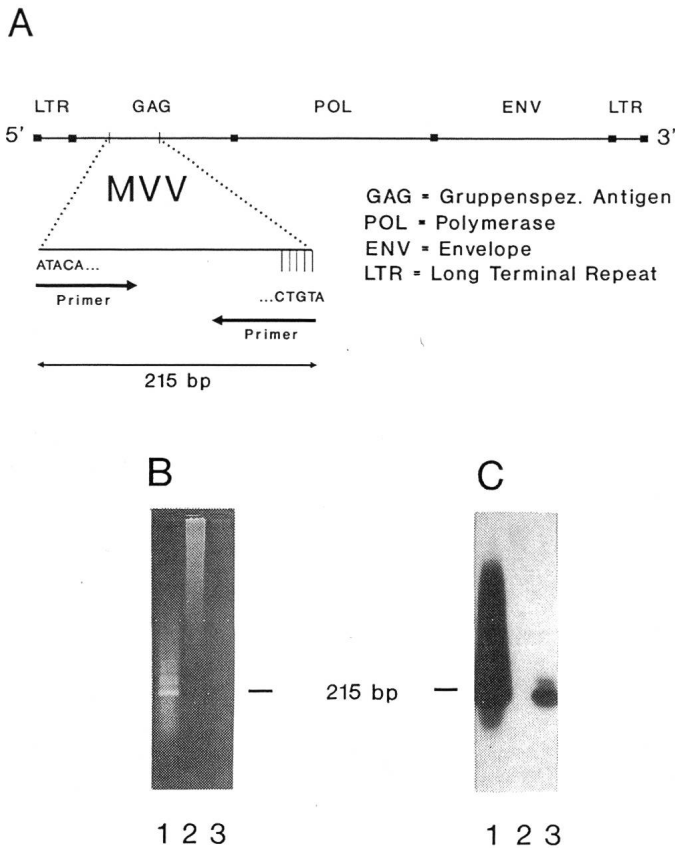
Der Gefahr der Kontamination kann entgegengewirkt werden mit einer Arbeitsweise, wie sie bei hochansteckenden Viren (z. B. Maul- und Klauenseuchevirus) angewendet wird. So können u.a. Massnahmen wie Arbeiten in einer sterilen Kammer, Abfüllen aller Reaktionslösungen in für eine Reaktion genügender Menge und das Trennen der Arbeitsräume für die verschiedenen Arbeitsschritte zu einer Verhinderung von Kontamination führen (*Kwok und Higuchi, 1989*).

Ein weiterer Nachteil ergibt sich aus der Tatsache, dass die Nukleotidsequenz des gesuchten Virus bekannt sein muss, um die Primer für die Amplifikation in der PCR herstellen zu können. Leider stehen zum heutigen Zeitpunkt nur für eine beschränkte Anzahl Viren diese Informationen zur Verfügung.

#### **NACHWEIS VON AMPLIFIZIERTER VIRUS-DNA EINES RETROVIRUS**

Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE) bei Ziegen und Maedi-Visna (MV) bei Schafen sind Krankheiten, die von nahe verwandten Lentiviren hervorgerufen werden (*Peterhans et al., 1988*.) Die übliche und in der Routine ausreichende Methode zum Nachweis einer Infektion mit diesen Viren ist der Antikörpernachweis (*Zwahlen et al., 1983; Zanoni et al., 1989*). Da bis zur Serokonversion mehrere Wochen bis Monate verstreichen können, wäre der Virusnachweis wünschbar für die Früherkennung von infizierten Tieren (*Sihvonen, 1980; Adams et al., 1983; DeBoer et al., 1979*). In der Frühphase der Infektion sind nur geringe Mengen von Virus im Organismus im Umlauf. Zudem verhält sich das Virus auch in Zellkultur wie ein echtes «Lenti»virus, d.h. es wächst sehr langsam. Eine Methode wie die PCR, die das Virus in klein-

Abb. 3: Beispiel einer PCR-Reaktion eines Retrovirus



A. Schematische Karte eines Retrovirus. MVV: Maedi-Visna Virus. 215 bp: 215 Basenpaare = Länge des zu amplifizierenden Stückes. Buchstaben oberhalb der Primer bezeichnen Teile der Primerzusammensetzung.

B. UV-Fotografie eines Agarosegels. Spur 1: positive Kontrolle (Zellkultur). Spur 2: Blutprobe eines nicht infizierten Schafes. Spur 3: Blutprobe eines infizierten Schafes. Die erwartete Bande bei 215 Basenpaaren ist mit einem Strick markiert.

C. Autoradiogramm des transferierten und hybridisierten Agarosegels aus B. Beschriftungen sind gleich wie in Abb. 3B.

sten Mengen direkt und schnell nachweisen kann, drängt sich hier geradezu auf.

Wir haben in einem ersten Schritt die PCR im Zellkultursystem etabliert (Zanoni et al., 1990). Da es sich um Retroviren handelt, d. h. Viren, die ihre RNA zuerst in doppelsträngige DNA umsetzen, bevor sie sich in der Zelle vermehren, kann ihre DNA-Form direkt nachgewiesen werden (Lowy, 1986). Für die Amplifikation haben wir ein Stück Nukleinsäure der

gruppenspezifischen Antigene ausgewählt, d. h. ein Stück DNA, das in der Evolution sehr konserviert sein sollte (Abb. 3A) (Doolittle et al., 1989; Pyper et al., 1984; 1986; Narayan und Clements, 1989). Dies sollte den Nachweis verschiedener Virus-Stämme mit den gleichen Primern für die Amplifikation in der PCR ermöglichen. Das Resultat einer solchen Amplifikation ist in Abb. 3 (Spur 1 = Maedi Visna Virus aus Zellkultur) zu sehen. Das amplifizierte Genomstück konnte in der erwarteten Größe im Gel (Abb. 3B) oder im Autoradiogramm (Abb. 3C) nachgewiesen werden. Die Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde bestätigte die virale Herkunft der amplifizierten Bande. Dass diese Bande spezifisch für das Virus ist, konnte auch gezeigt werden, indem die Nukleotidsequenz des vervielfältigten Stückes bestimmt und mit einer schon publizierten Sequenz verglichen wurde (Zanoni et al., 1990).

Der Nachweis des Virus aus Untersuchungsmaterial von infizierten Tieren scheint somit in Reichweite. Er ist aber noch mit einigen Hindernissen behaftet. In Abb. 3 haben wir ein Beispiel eines solchen Experiments dargestellt. Blutproben wurden von einem infizierten und einem nicht infizierten Tier entnommen und die Nukleinsäure wurde extrahiert. Aus diesem Nukleinsäuregemisch wurde dann mit Hilfe der PCR die Virusnukleinsäure nachgewiesen. Wie man sehen kann, ist die erwartete Bande, die im Zellkultursystem gut sichtbar ist (Abb. 3B, Spur 1), bei beiden Proben im Agarosegel nicht zu sehen (Abb. 3B, Spuren 2 und 3). Daher musste eine Hybridisierung mit einer virusspezifischen, radioaktiven Sonde durchgeführt werden, die nach der Autoradiographie das Vorhandensein der Virus-DNA in Spur 3 (infiziertes Tier) eindrücklich zeigt, währenddem in Spur 2 (nicht infiziertes Tier) kein Signal zu sehen ist. (Abb. 3C). Der einfache Weg der direkten Sichtbarmachung nach der Gelelektrophorese kann also in diesem Fall nicht beschrritten werden.

Die aus der Literatur bekannte Tatsache, dass Lentiviren genetisch instabil sind (Pyper et al., 1984; Yaniv et al., 1985; Shimizu et al., 1989; Doolittle et al., 1989; Folks et al., 1987; Yokoyama, 1988; Li et al., 1988), bestätigte sich auch bei der partiellen Sequenzierung des in unseren Experimenten verwendeten holländischen Maedi-Visna Virusstammes (Zanoni et al., 1990). Wir stellten fest, dass zwar die DNA-Sequenz um 13 % verschieden von derjenigen des publizierten Visna Virusstammes (Sonigo et al., 1985) ist, dass jedoch die Aminosäuresequenz nicht verändert wird. Das zeigt, dass der evolutionäre Druck mehr auf die Aminosäuresequenz, d. h. auf das Protein, gerichtet ist als auf die Basenabfolge. Dieser Befund deutet auf eine weitere Schwierigkeit der PCR für eine Virusdetektion mit einer beschränkten Anzahl an Primern hin.

### NACHWEIS EINES RNA-VIRUS MITTELS PCR

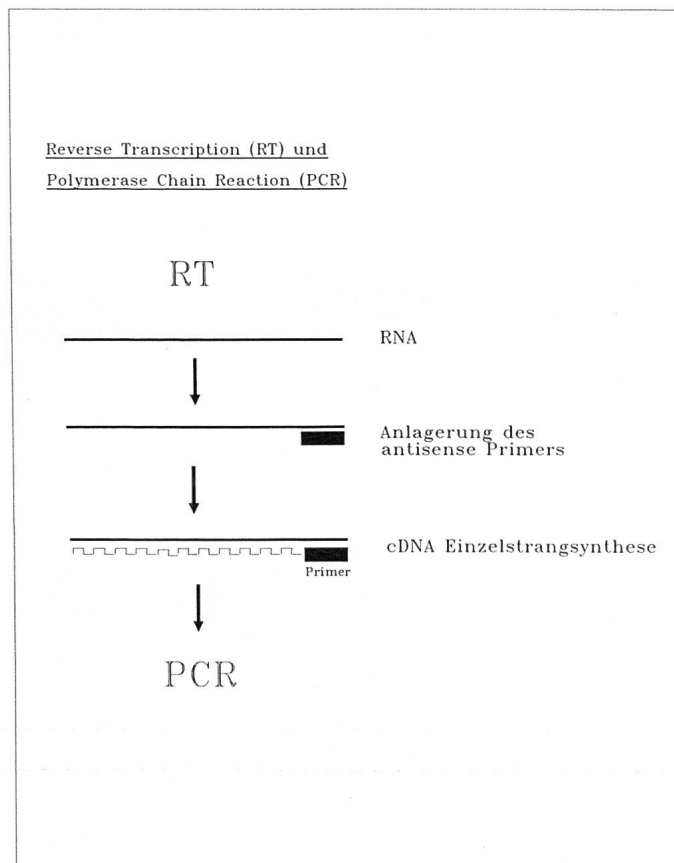
Für den Export von Stierensamen wird seit kurzem der Nachweis der Abwesenheit von Bovinem Virus Diarrhoe Virus (BVDV) in Samen verlangt. Da toxische Substanzen im Samen die Zellkulturen schädigen, ist die heute übliche Methode (Virusisolierung) für den Virusnachweis ungeeignet. Wir haben die PCR-Technik deshalb auch für dieses Virus, wie bei den Lentiviren, vorerst im Zellkultursystem etabliert (Hertig et al., im Druck).

Bevor man ein RNA-Virus mittels PCR nachweisen kann, muss seine RNA zuerst in vitro in einzelsträngige cDNA überschrieben werden (Abb. 4). Dazu benötigt man ein virus-spezifisches Oligonukleotid und das Enzym Reverse Transkriptase. Die Reverse Transkriptase verwendet die Virus-RNA als Vorlage und synthetisiert den komplementären Strang (cDNA = copy DNA). Durch Erhitzen auf 94 °C werden die virale RNA und die neu synthetisierte cDNA getrennt. Im ersten Zyklus der PCR wird die einzelsträngige cDNA mit Hilfe des zweiten Primers und der Taq-Polymerase zu einem Doppelstrang ergänzt. Der zweite Zyklus beginnt mit doppelsträngiger DNA, entspricht also dem ersten einer normalen PCR (siehe Abb. 2).

Das Beispiel einer Amplifikation aus Überständen infizierter Zellkulturen sieht man in Abbildung 5 anhand des Fragments pa. Es stammt aus einer Region der viralen Erbinformation, welche für ein stark konserviertes Nichtstrukturprotein (p80) codiert (Abb. 5A). Die Nachweisgrenze dieser Methode wurde mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt. Im Gel kann man noch bei einer Amplifikation, ausgehend von  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub> (= tissue culture infectious dose<sub>50</sub>) eine schwache Bande erkennen (Abb. 5B, Spur 4). Um die Empfindlichkeit zu steigern und die Spezifität zu demonstrieren, wurde eine Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde durchgeführt. Wie die Schwärzung auf dem Autoradiogramm in Abbildung 5C (Spur 5) zeigt, kann man mit der PCR und anschließender Hybridisierung bis zu  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub> BVD Virus nachweisen. Verglichen mit der heutigen Zellkultur-Technik ist die PCR  $10^4$  mal empfindlicher! (1 TCID<sub>50</sub> ist die Nachweisgrenze auf Zellkulturen). Da mit der PCR nicht nur intakte, infektiöse Viruspartikel, sondern lediglich kurze Stücke ihrer Erbinformation nachgewiesen werden, deutet dieses Resultat auf einen relativ hohen Anteil nichtinfektöser Viruspartikel pro TCID<sub>50</sub> hin.

Da über die genetischen Unterschiede zwischen verschiedenen BVD Viren praktisch nichts bekannt ist, wurde auch versucht, andere Stämme nachzuweisen. Weitere untersuchte bekannte Virus-Stämme konnten mit PCR nachgewiesen wer-

Abb. 4: Schematische Darstellung der Reversen Transkription zum Überführen von RNA in DNA vor der Polymerase Chain Reaction

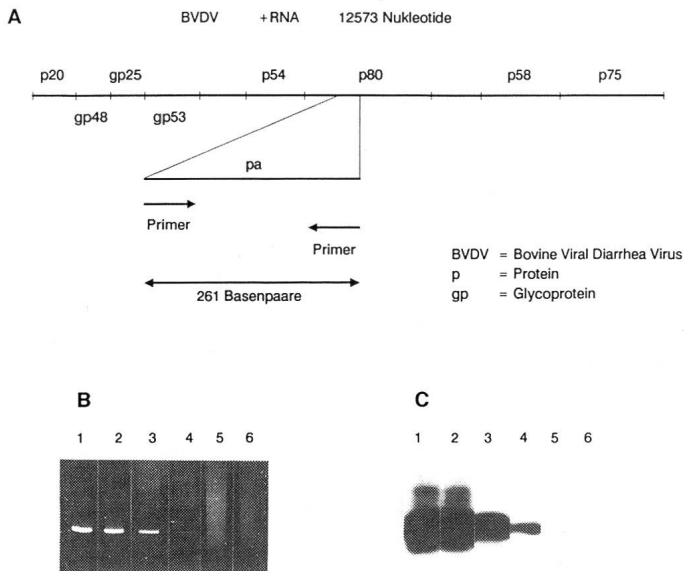


den. Auch der Nachweis von beigemischem Zellkulturvirus in Samen war erfolgreich. Gegenwärtig überprüfen wir, ob verschiedene in Europa und insbesondere in der Schweiz isolierte Virusstämme mittels PCR nachgewiesen werden können.

### SCHLUSSBEMERKUNGEN ZUR PCR

Mit der PCR-Technik sollte es in der Zukunft möglich sein, die Virusdiagnostik substanziell zu erweitern. Es wird möglich sein, Resultate in kurzer Zeit zu erhalten, die auch in bezug auf die sich ergebenden Kosten nicht viel teurer zu stehen kommen als in der traditionellen Diagnostik. Zudem wird sie Möglichkeiten eröffnen, in der veterinär-virologischen Grundlagenforschung Epidemiologie, Pathogenese, sowie auch molekularbiologische Mechanismen zu studieren und so ein vertieftes Verständnis verschiedenster Viruskrankheiten erlauben.

Abb. 5: Beispiel einer RT-PCR-Reaktion eines RNA-Virus



A. Schematische Darstellung des Bovinen Virus Diarrhoe Virus. Zahlen bezeichnen die Grösse der Proteine in Kilodalton. pa = Fragment, das für die Amplifikation verwendet wurde. 261 Basenpaare = Länge des zu amplifizierenden Fragmentes.

B. UV-Fotografie eines Gels. Spur 1–5:  $10^4$ ,  $10^2$ , 1,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub> wurden für den Nachweis verwendet. Spur 6: negative Kontrolle.

C. Autoradiogramm des transferierten und hybridisierten Gels aus Abb. 5B. Beschriftungen sind gleich wie in Abb. 5B.

**LITERATUR**

Adams D.S., Klevjer-Anderson P., Carlson J.L., McGuire T.C. (1983): Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1670–1675. — Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127, 1550–1557. — Clewley J.P. (1989): The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. *J. Virol. Methods* 25, 179–187. — Cox K.H., DeLeon D.V., Angerer L.M., Angerer R.C. (1984): Detection of mRNAs in Sea Urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Develop. Biol.* 101, 485–502. — DeBoer G.F., Terpstra C., Houwers D.J. (1979): Studies in epidemiology of maedi/visna in sheep. *Res. Vet. Sci.* 26, 202–208. — Doolittle R.F., Feng D.-F., Johnson M.S., McClure M.A. (1989): Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *The Quarterly Review of Biology* 64, 1–29. — Folks T.M., Bann S., Rabson A.B. (1987): Biologic and molecular

variations in AIDS retrovirus isolates. In: *Contr. Microbiol. Immunol.*, vol. 8. Eds. Julius M. Cruse and Robert E. Lewis. Karger, Basel: 90–102. — Hertig C., Pauli U., Zanoni R., Peterhans E. (im Druck): Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* — Kandijan E.W. (1987): Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. *Bio/Technology* 5, 165–167. — Kwok S., Higuchi R. (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237–238. — Langer-Safer P.R., Levine M., Ward D.C. (1982): Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4381–4385. — Lawrence J.B., Villave C.A., Signer R.H. (1988): Sensitive high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52, 51–61. — Li W.-H., Tanimura M., Sharp P.M. (1988): Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 5, 313–330. — Lo Y.-M.D., Mehal W.Z., Fleming K.A. (1988): False-positive results and the polymerase chain reaction. *Lancet* 2, 676–679. — Lowy D.R. (1986): Transformation and oncogenesis: retroviruses. In: *Fundamental Virology*. Eds. Bernard N. Fields and David M. Knipe. Raven. Press., New York: 235–263. — Narayan O., Clements J.E. (1989): Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 70, 1617–1639. — Peterhans E., Zanoni R., Krieg T., Balcer T. (1988): Lentiviren bei Schaf und Ziege: Eine Literatur-Übersicht. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 130, 681–700. — Pypers J.M., Clements J.E., Molineaux S.M., Narayan O. (1984): Genetic variation among lentiviruses: homology between visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus is confined to the 5' gag-pol region and a small portion of the env gene. *J. Virol.* 51, 713–721. — Pypers J.M., Clements J.E., Gonda M.A., Narayan O. (1986): Sequence homology between cloned caprine arthritis-encephalitis virus and visna virus, two neurotropic lentiviruses. *J. Virol.* 58, 665–670. — Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Ehrlich H.A., 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., Ehrlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491. — Shimizu N., Okamoto T., Moriyama E.N., Takeuchi Y., Gojobori T., Hoshino H. (1989): Patterns of nucleotide substitutions and implications for the immunological diversity of human immunodeficiency virus. *FEBS Lett.* 250, 591–595. — Sihvonen L. (1980): Late immune responses in experimental maedi. *Vet. Microbiol.* 9, 205–213. — Sonigo P., Alizon M., Staskus K., Klatzmann D., Cole S., Danos O., Retzel E., Tiollais P., Haase A., Wain-Hobson S. (1985): Nucleotide sequence of the Visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 42, 369–382. — Southern E. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517. — White T.J., Arnheim N., Ehrlich H.A. (1989): The polymerase chain reaction. *TIG* 5, 185–189. — Yaniv A., Dahlberg J.E., Tronick S.R., Chiu I.-M., Aaronson S.A. (1985): Molecular cloning of integrated caprine-encephalitis virus. *Virology* 145, 340–345. — Yokoyama S. (1988): Molecular evolution of the



human and simian immunodeficiency viruses. *Mol. Biol. Evol.* 5, 645–659. — *Zanoni R., Krieg A., Peterhans E.* (1989): Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.* 27, 580–582. — *Zanoni R., Pauli U., Peterhans E.* (1990): Detection of caprine arthritis-encephalitis-visna and maedi-visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia* 46, 316–319. — *Zwahlen R., Aeschbacher M., Balcer T., Stucki M., Wyder-Walther M., Weiss M., Steck F.* (1983): Lentivirusinfektionen bei Ziegen mit Carpitus und interstitieller Mastitis. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 125, 281–299.

**La médecine vétérinaire et la biologie moléculaire: possibilités et limites de la détection de virus**

La biologie moléculaire a depuis quelques années fait une entrée remarquable dans la médecine vétérinaire, ainsi par exemple dans l'élevage animal. Des méthodes dérivées de la biologie moléculaire ouvrent également de nouvelles perspectives dans le domaine du diagnostic de virus en permettant une détection rapide et sensible. Cet article présente un survol des méthodes de biologie moléculaire les plus utilisées actuellement pour le diagnostic de virus, ainsi que leurs limites et les développements potentiels qui en découlent. Une nouvelle technique est discutée plus précisément: la «polymerase chain reaction» (PCR). Cette méthode a déclenché une petite révolution dans la biologie moléculaire et a déjà démontré son utilité pour le diagnostic de virus. La PCR est présentée en détail à travers des exemples de détection de lentivirus ovins et caprins ainsi que du virus de la diarrhée bovine (BVDV).

**Medicina veterinaria e biologia molecolare: possibilità e limiti nella detezione dei virus**

Da qualche anno la biologia molecolare è entrata a far parte della quotidiana realtà della medicina veterinaria, per esempio contribuendo allo sviluppo zootecnico. Anche nella virologia diagnostica, l'uso di tecniche molecolarbiologiche ha permesso notevoli progressi, soprattutto grazie alla velocità e sensibilità di questi metodi. Questo articolo da una visione generale delle tecniche molecolarbiologiche più frequentemente usate nella virologia diagnostica e allo stesso tempo discute i possibili sviluppi futuri, tenendo conto anche dei limiti di questi metodi. Speciale attenzione viene rivolta a una nuova tecnica: la «polymerase chain reaction» (PCR). La PCR ha provocato una «minirivoluzione» nel mondo della biologia molecolare, e potrà essere indubbiamente di grande aiuto per la virologia diagnostica. Questa nuova tecnica è presentata nel contesto di esempi pratici, quali: la detenzione

di lentoviri ovini e caprini come anche del virus della diarrea bovina (BVD).

**VERDANKUNGEN**

Bedanken möchten wir uns bei Irene Nauta, die viele Experimente des PCR Nachweises von CAE und Maedi-Visna durchgeführt hat, und bei Dr. B. Unternährer und Dr. M. Weiss für das kritische Durchlesen des Manuskripts. Diese Arbeit wurde zum Teil unterstützt durch das Bundesamt für Veterinärwesen.

Adresse: Urs Pauli  
Institut für Veterinär-Virologie  
Universität Bern  
Länggass-Strasse 122  
CH-3012 Bern

Manuskripteingang: 2. Juli 1990