

Rapid Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Viremic Cattle by Flow-Cytometry

G. Wolf and G. Rademacher

Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, and II. Med. Tierklinik, Tierärztliche Fakultät der Universität, D-8000 München 22, Germany

Einleitung

Die systematische Bekämpfung der BVD/MD ist ein vordringliches Problem in der Rinderhaltung. Impfkonzepte werden in ihrem Erfolg begrenzt durch die starken serologischen Unterschiede der einzelnen BVD Virusstämme. Zudem kann bei der Anwendung von Lebendvakzinen bei persistent infizierten Tieren eine Mucosal Disease ausbrechen (1). Bei Vakzinierung von Kühen um den Konzeptionszeitpunkt oder bis zur ersten Hälfte der Gravidität ist die Gefahr der Erzeugung immuntoleranter Nachkommen gegeben, die als dauerhafte Virusträger den Bestand belasten (5,6). Die Indikation für eine Impfung ist deshalb entsprechend streng zu stellen. Eine Bestandsdiagnostik ist erste Voraussetzung für die systematische Bekämpfung. Dabei ist der serologische Antikörpernachweis durchaus geeignet, in nicht geimpften Beständen auf die Präsenz von BVDV hinzuweisen. Für die Identifizierung von Virusträgern jedoch ist ein Antigennachweis notwendig. Unabhängig von einer weiteren Bekämpfungsstrategie ist insbesondere die Identifizierung und Abschaffung persistent infizierter Virusträger angezeigt. Im Fall von klinisch manifesten Erkrankungen ist eine rasche virologische BVD-Diagnostik wünschenswert.

Derzeit sind für den BVD Virusnachweis neben den klassischen Verfahren über Zellkulturvermehrung des Antigens einige zellkulturunabhängige Verfahren beschrieben. Als molekularbiologische Methoden sind eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) (9) und die in situ RNS-Hybridisierungstechnik (3) angewendet worden. Als immunologische Nachweisverfahren sind Antigen-Fänger ELISAs und ein fluoreszenzhistologisches Verfahren mittels

durchflußzytometrischer Meßtechnik veröffentlicht (8).

Thema der vorliegenden Untersuchung ist die Entwicklung eines einfachen, schnellen Nachweisverfahrens für die BVD Virämie. Dabei ist unabhängig von BVD Virusstamm und Krankheitszustand des Patienten eine sichere Diagnose mittels Immunofluoreszenztechnik an Blutleukozyten zu stellen.

Material und Methoden

Blutproben: Die Proben stammen von Patienten der Rinderklinik der Tierärztlichen Fakultät. EDTA stabilisiertes Vollblut wurde bis zur Verarbeitung kühl gelagert. Insgesamt wurden 304 Blutproben untersucht.

Antikörper: Der pan-Pestivirus reaktive monoklonale Antikörper Cl6 (7) wurde von der Fa. Bommeli (Schweiz) in affinitätschromatographisch gereinigter Form für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt (Proteingehalt 0,67g/l, Verdünnung 1:256). Als Konjugat wurden FITC markierte Schaf- α -Maus Antikörper (Fa. SIGMA, Nr. F625T, Verdünnung 1:100) verwendet.

Reagenzien: Phosphat gepufferte Saline ohne Ca/Mg (PBS), Hämolyse-Puffer (8,29 g/l NH_4Cl , 1,0 g/l KHCO_3 , 1 mM EDTA, in a.dest.), FACS-Puffer (10 mM Hepes, 10mM EDTA, 0,1% NaN_3 , 2% FBS, in PBS-Lösung), Digitoninpuffer (0,0025% Digitonin (SIGMA Nr. D1407) in PBS), Propidiumjodid (PI) 10^{-5}M (SIGMA Nr. P4170) in FACS-Puffer, Paraformaldehyd (PFA) 4% Stammlösung, Gebrauchsverdünnung 1%.

Technische Ausstattung: Zytofluorometer FACScan (Becton Dickinson), Software Consort 30

Probenvorbereitung: Vollblut (ca. 0,5ml) wird 1:4 mit Hämolysepuffer gemischt. Nach

vollständiger Hämolyse (1-5 min) werden die Leukozyten auf Eis 15 min. mit 1% PFA fixiert. Anschließend erfolgt die Permeabilisierung mit Digitoninpuffer 5 min. bei Raumtemperatur. Nach Abzentrifugieren (300g, 1 min.) des Digitonins wird das Zellpellet in ca. 200 µl FACS-Puffer suspendiert und in Reaktionsgefäße (Eppendorf Nr.3810 oder 96-Lochplatten) zur anschließenden Färbung gegeben.

Fluoreszenzfärbung: Die Zellen werden in Suspension (50µl) für 15 min. bei Raumtemperatur (RT) mit dem monoklonalen Antikörper Cl6 (100µl) inkubiert. Nach Abzentrifugieren wird in einem zweiten Inkubationsschritt mit dem αMaus Konjugat gefärbt (15 min, RT). Eine Konjugatkontrolle (ohne Cl6) wird für jede Probe mitgeführt. Nach Abzentrifugieren wird das Zellpellet in 300 µl PI-Puffer aufgenommen. Die Messung kann sofort erfolgen. Eine Lagerung im Kühlschrank über Tage ist ohne Verlust der Meßsignale möglich.

Durchflußzytometrische Messung: Bei der Messung werden an ca. 10000 Zellen für jede Zelle die Parameter Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC), FITC-Fluoreszenz (FL1) und PI-Fluoreszenz (FL2) erfasst und gelistet. Die Streulichtparameter werden zur Abgrenzung von Zellklustern herangezogen. Die PI-Fluoreszenz gibt den DNA-Gehalt der Zellen wieder und eignet sich zur Ausgrenzung von Zellverklumpungen und zur Schwellenwertsetzung beim Meßvorgang (4). Als BVDV spezifisches Signal wird die FL1-Intensität der Lymphozyten und der Granulozyten/Monozyten der Cl6 markierten Probe jeweils mit der Konjugatkontrolle verglichen und in einer Histogrammdarstellung mit 256 Kanälen (-Klassen) bewertet. Zellen, deren FL1-Signal mit Cl6 deutlich höher ist als bei der Konjugatkontrolle, werden als BVDV-Antigen positiv betrachtet und anteilmäßig angegeben. Der untere Grenzwert für "positiv" wurde dabei festgelegt als $\mu + 3\sigma$ (μ -mittlere FL1, σ -Standardabweichung)

Zellkulturanzucht (Vergleichsmethode): Nach Hämolyse wurden ca. 10^5 Leukozyten

auf fetalen bovinen Nierenzellkulturen angeimpft und nach jeweils 3 und 7 Tagen mit den o.g. Antikörpern gefärbt und fluoreszenzhistologisch ebenfalls mittels Durchflußzytometrie untersucht.

Ergebnisse

1. Permeabilisierung und Degranulierung von polymorphkernigen Blutzellen: Die Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin führt innerhalb von ca. 30 sec. zur Degranulation von über 90% der Granulozyten (s. Abb. 1). Nach der Degranulation verhalten sich diese Zellen im Laserstrahl optisch wie Monozyten. Insbesondere besitzen die degranulierten Granulozyten die gleiche Hintergrundfluoreszenz wie die Monozyten.

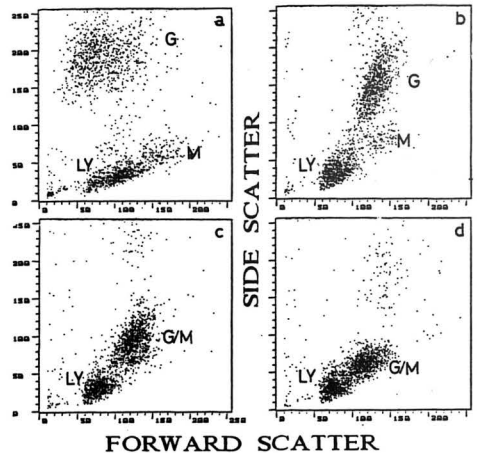


Abb. 1: Degranulierung und damit verbundene Abnahme des Seitwärtsstreulichtes (SSC) von Granulozyten. Dot plot Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen SSC, G-Granulozyten, M-Monozyten, LY-Lymphozyten. a-vor Digitoninzugabe, b-10sec, c-20sec, d-30sec nach Digitoninzugabe.

2. Propidiumjodid Färbung: Bei der gewählten Zellpräparation sind im Mittel 90% der gemessenen Partikel als Einzelzellen aufgrund des DNA-Gehaltes eingrenzbar (Abb. 2)

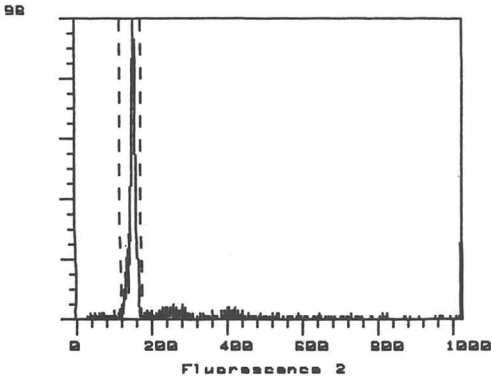


Abb. 2: Histogramm über FL2 bei Propidiumjodid gefärbten Leukozyten: hoher Peak-Einzelzellen, rechts davon Zellverklumpungen.

infizierten Blutzellen nachweisbar, fünf Tage später waren bereits 10% Granulozyten/Monozyten und keine Lymphozyten BVDV positiv.

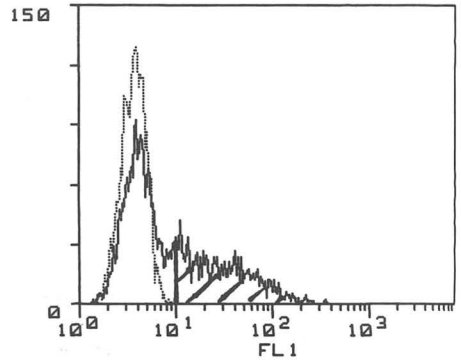


Abb. 3: FL1 Histogramm der Granulozyten/Monozyten eines virämischen Patienten. (..... -Konjugatkontrolle, — -Cl6 markierte Probe, schraffierte Fläche -BVDV-positiv bewertete Zellen.

3. Spezifisches FL1-Signal zur Quantifizierung des Antigens (BVDV pl25/80) in Leukozyten: Die in Abb. 1d dargestellten Zellkuster "LY" und "G/M" wurden - zusätzlich in der FL2 als Einzelzellen eingegrenzt - bezüglich FL1 des Cl6 gefärbten Präparates und der Konjugatkontrolle verglichen. Das spezifische FL1 Signal war bei allen Proben deutlich abgesetzt von der unspezifischen FL1 der Zellen. Die FL1-Verteilungsmuster (s. Abb. 3) der infizierten Zellen waren individuell unterschiedlich. Auch die Zahl infizierter Zellen variierte stark (s. Abb. 4)

Bei allen Tieren, welche in der Zellkulturanzucht BVD positiv diagnostiziert wurden, konnten auch im zytofluorometrischen Nachweis infizierte Zellen gefunden werden. In einem Fall waren bei der ersten Probennahme durchflußzytometrisch keine

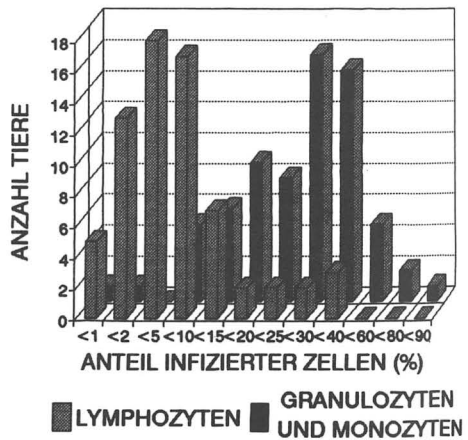


Abb. 4: Leukozyten von 70 BVD virämischen Tieren: Antigennachweis mit Cl6

4. Patientendaten und BVD-Virämie: Von 233 stationär aufgenommenen Rindern waren 46 BVD virämisch. Von 55 Kälbern bis zum Alter von 2 Wochen, vorwiegend mit Neugeborenenendiarrhoe, war nur eines BVD virämisch. Zur Altersverteilung siehe Abb. 5.

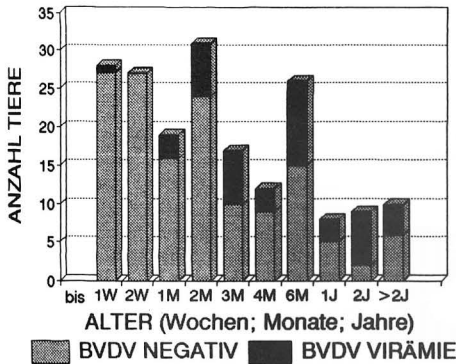


Abb. 5: Altersverteilung der untersuchten Rinder

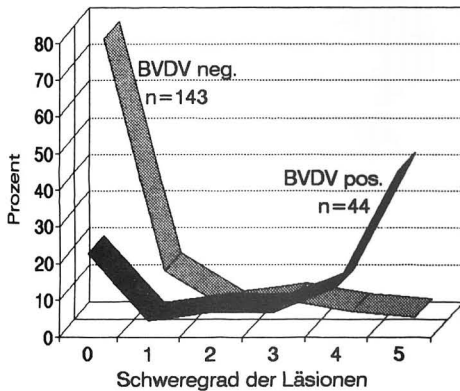


Abb. 6: BVD-Virämie und typische Erosionen an Maul-, Nasen-, und Genitalschleimhaut, Flotzmaul und im Zwischenklauenbereich.

Typische Erosionen wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei 77%, eine deutliche Ausprägung von Erosionen an allen untersuchten Stellen (Maul-, Nasen-, Genitalschleimhaut, Flotzmaul, Zwischenklauenbereich) bei 45% der virämischen Tiere beobachtet. Bei den nicht virämischen Tieren zeigten 76% keine Schleimhautläsionen. Eines aus 143 nicht virämischen Tieren erschien klinisch aufgrund von Läsionen an allen untersuchten Stellen typisch für BVD/MD.

Diskussion

Der IF-Nachweis des BVDV-Antigens in Leukozyten war bislang begrenzt durch die hohe Autofluoreszenz der Granulozyten. Bei der Mikroskopie ist diese kaum von der spezifischen FITC-Fluoreszenz zu unterscheiden. Bei der zytofluorometrischen Untersuchung können Granulozyten aufgrund von Streulichteffekten von mononukleären Blutzellen gut abgegrenzt werden, sind jedoch aufgrund der hohen Autofluoreszenz insbesondere bei schwachen spezifischen Fluoreszenzsignalen nur bedingt für die diagnostische Verwertung geeignet. Im Gegensatz zu Arbeiten von Qvist (8) wird mit der vorgestellten Technik die Analyse von Granulozyten sehr gut möglich. Die Behandlung der Leukozyten mit Digitonin führt zur Degranulation fast aller Granulozyten unter Erhalt des BVDV-Antigens. Die Zellen verlieren damit die hohe Autofluoreszenz (Abb. 1) und sind zusammen mit den Monozyten bezüglich FITC-Fluoreszenz bewertbar. Die Nachweismethode wird hierdurch sehr sensitiv. Auch Patienten ohne oder mit schwachem BVDV-Signal in den Lymphozyten sind gut diagnostizierbar. Die Laborzeit der Diagnostik beträgt dabei weniger als zwei Stunden.

Bei einer Blutprobe konnte im Zellkulturnachweisverfahren eine BVD-Virämie nachgewiesen werden, die in der Leukozytenfärbung nicht feststellbar war.

Der Patient war wegen einer Umbilikalhernie stationär in der Tierklinik. In der Wiederholungsprobe nach fünf Tagen waren bereits 9,5% Granulozyten/Monozyten BVDV positiv. Eine BVD/MD Symptomatik wurde nicht beobachtet.

Neben der Schnelligkeit der Methode ist die hohe Sensitivität bei gleichzeitiger Unabhängigkeit von einem Zellkulturlabor für den Diagnostikeinsatz von Vorteil.

Die Zytofluorometrie hat ihre Hauptanwendungsbereiche in der morphologischen und funktionellen Zytodiagnostik und in der quantitativen DNA Messung an Einzelzellen (2). Die Multiparametermessung ermöglicht die Verbindung der Infektionsdiagnose an der Einzelzelle mit weiteren funktionellen wie morphologischen Parametern. Dies sind methodische Voraussetzungen für die Erkennung pathogenetischer Mechanismen.

Bei entsprechender Automatisierung läßt sich die Technik auch für Serienuntersuchungen in Routinelabors einsetzen.

Summary

A fast and simple assay with high sensitivity to BVDV in blood samples, independent of blood storage and clinical status of animals, is described. A pan-pestivirus reactive monoclonal antibody Cl6 (BVDV-p 80/125 specific) was applied for immunofluorescence (IF) in flow cytometry with leukocytes and for IF with infected bovine kidney cells as a reference method. From 304 blood samples of patients of the veterinary clinic 63 NCP- and 7 CP- BVDV strains were isolated. There is a high BVDV-specific IF in granulocytes and monocytes, whereas in lymphocytes the IF intensity per cell is weaker. The percentage of antigen positive cells varies from 1% to 87% (mean 22%) in granulocytes/monocytes and 0% to 37% (mean 8%) in lymphocytes. There is a total correlation between conventional BVDV-diagnosis with tissue culture isolation and leukocyte analysis with flow cytometry. After blood freezing or storage at +8°C for

6 weeks BVDV detection in leukocytes is not significantly influenced.

Flow cytometry provides a quantitative, objective analysis of leukocyte associated BVDV-antigen. Both low levels of antigen per cell and low percentages of antigen positive cells are detectable. Direct leukocyte analysis with flow cytometry is a rapid (2 hours), easy and reliable method for detection of viremic cattle.

Zusammenfassung

Ein einfacher, hoch sensitiver Schnelltest für den Nachweis von BVDV in Blutproben von gesunden und kranken Rindern wird beschrieben. Ein pan-Pestivirus reaktiver monoklonaler Antikörper diente zum Antigennachweis mittels indirekter Immunofluoreszenz (IF). Die Analyse von Leukozyten erfolgte über Durchflußzytofluorometrie. Als diagnostische Referenzmethode wurde IF mit beimpften Zellkulturen durchgeführt. Aus 304 Blutproben von Patienten der Tierklinik wurden 63 NCP und 7 CP-BVDV Stämme isoliert. Das spezifische IF Signal in Granulozyten/Monozyten war im Vergleich zu den kleineren Lymphozyten entsprechend höher. Die relative Anzahl BVDV-positiver Zellen variierte von 1%-87% (Mittelwert 22%) bei Granulozyten/Monozyten und 0%-37% (Mittelwert 8%) bei Lymphozyten. Bei allen Patienten konnte das Ergebnis der Leukozytenfärbung durch die Zellkultur-IF bestätigt werden. Einfrieren der Blutproben oder längere Lagerung im Kühlschrank beeinflusst den BVDV Nachweis nur unerheblich.

Die Durchflußzytometrie ermöglicht eine quantitative und objektive Erfassung von BVDV Antigen in Leukozyten. Bereits geringe Antigenmengen pro Einzelzelle und anteilsmäßig wenige infizierte Zellen erlauben eine sichere Diagnose. Die zytofluorometrische Methode zum Nachweis BVD virämischer Tiere ist aufgrund der differenzierten Aussage bezüglich infizierter Zellen, der kurzen Testdauer (ca. 2 Stunden) und der einfachen Färbetechnik allen anderen Methoden überlegen.

Résumé

Nous décrivons ici une méthode simple, sensible et rapide de mise en évidence du BVDV dans des prélèvements sanguins; elle est indépendante du statut clinique des animaux. La mise en évidence de l'antigène se fait par immunofluorescence indirecte, grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal réagissant avec le pestivirus. Le décompte de leucocytes est réalisé par cytofluorométrie de flot. La méthode diagnostique de référence est réalisée par immunofluorescence avec des cultures cellulaires infestées. Parmi les 304 échantillons sanguins prélevés sur les patients de la clinique en a isolé 63 souches NCP et 7 souches CP BVDV. Le signal spécifique enregistré par immunofluorescence s'est avéré être plus fort dans les granulocytes et les monocytes que dans les petits lymphocytes. Le pourcentage de cellules BVDV-positives a varié entre 1% et 87% (moyenne 22%) pour les granulocytes/monocytes et entre 0% et 37% (moyenne 8%) pour les lymphocytes chez tous les patients on a observé une corrélation parfaite entre les résultats enregistrés lors de diagnostic BVDV classique sur culture cellulaire et ceux obtenus par décompte des leucocyte grâce à la méthode cytométrique. La réfrigération des échantillons sanguins à 8°C pendant 6 semaines n'a nullement perturbé la mise en œuvre de cette méthode. La cytométrie de flot est donc une méthode permettant une mise en évidence quantitative et objective des antigènes BVDV associés aux leucocytes. Elle s'applique même aux cas où les antigènes dans les cellules sont faibles et où le pourcentage de cellules antigène-positives est bas. Le décompte des leucocytes par cytométrie de flot est par conséquent une méthode rapide (2h), facile et fiable de détection du virus BVDV dans les troupeaux.

Literaturverzeichnis

1. BROWNIE J. (1991): The Pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Archives of Virology Suppl.* 3, 79-96.
2. DARZYNKIEWICZ, Z., H.A. CRISSMAN, (1990): *Methods in Cell Biology* (ed. by L. Wilson), Vol. 33: *Flow Cytometry*. Academic Press, San Diego/California
3. JENSEN, J., J. AIKEN, R.D. SCHULTZ, (1989): Detection of bovine viral diarrhoea virus genome in leukocytes from persistently infected cattle by RNA-cDNA hybridization. *Can. J. Vet. Res.* 54, 256-259.
4. LAFFIN, J., J.M. LÉHMAN, (1990): Detection of Intracellular virus and viral products. Chapter 26 in: *Methods in Cell Biology* (ed. by L. Wilson), Vol. 33: *Flow Cytometry*. Academic Press, San Diego/California
5. LIESS, B. (1985): Bedeutung der Immuntoleranz für die Pathogenese der Bovinen Virusdiarrhoe. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 98, 420-423.
6. OSBORNE, B.I., G.CASTRUCCI, (1991): Diaplacental infections with ruminant pestiviruses *Archives of Virology Suppl.* 3, 71-78.
7. PETERS, W., I. GREISER-WILKE, V.MOENNIG, B.LIESS, (1986): Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 12, 195-200.
8. QVIST, P., B. AASTED, B. BLOCH, A. MEYLING, L. RØNSHOLT, H. HOUE (1990): Flow Cytometric Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Peripheral Blood Leukocytes of Persistently Infected Cattle. *Can. J. Vet. Res.* 54, 469-472.
9. WARD, P., V. MESRA, (1991): Detection of bovine viral diarrhoea virus, using degenerate oligonucleotide primers and the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 52(8), 1231-1236.