

4. Material und Methoden

4.1. Untersuchungsgebiete

Die Untersuchungsgebiete lagen entlang der Grenze zu den Niederlanden in den Bundesländern Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen. Dieses Areal wurde aufgrund seiner geographischen Lage (Nähe zu den MKS-Ausbruchsgebieten in den Niederlanden im Jahr 2001) ausgesucht. Die Auswahl der Jagdreviere in Nordrhein-Westfalen erfolgte durch Einsicht in die Revierkarten und Jagdstrecken vom Reh bei den betreffenden Unteren Jagdbehörden im Landkreis Borken, Kleve, Wesel sowie Steinfurt. In Niedersachsen wurden die an der Studie beteiligten Forstämter vom Niedersächsischen Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten benannt. Weiterhin wurde ein Negativ-Kontrollgebiet innerhalb Schleswig-Holsteins (Landkreise Schleswig-Flensburg, Rendsburg-Eckernförde) untersucht.

Abb. 4-1: Übersichtskarte Deutschland und die Niederlande

innerhalb der schwarzmarkierten Region: Untersuchungsgebiete in Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen sowie Ausbruchsgebiete des MKS-Seuchenzuges in den Niederlanden (siehe Abb. 4-2);

innerhalb der gelbmarkierte Region: Negativ-Kontrollgebiet in Schleswig-Holstein (siehe Abb. 4-3)



4.1.1. Nordrhein-Westfalen

Die Proben aus Nordrhein-Westfalen stammten aus ausgewählten Revieren innerhalb der Landkreise Borken, Kleve, Wesel und Steinfurt. In Abbildung 4-2 ist die Lage der Untersuchungsgebiete zusammen mit dem MKS-Ausbruchsgebiet in den Niederlanden dargestellt.

4.1.2. Niedersachsen

Die Proben aus Niedersachsen wurden von den Niedersächsischen Forstämtern Palsterkamp (Bad Rothenfelde, Landkreis Osnabrück), Lingen (Landkreis Emsland) und Neuenburg (Zetel-Neuenburg, Landkreis Friesland) eingesendet (siehe Abb. 4-2).

Dabei stammten die Proben des Niedersächsischen Forstamtes Palsterkamp von verpachteten Jagdrevieren in den Gemeinden Bad Essen und Bissendorf, außerdem von Revierförstereien der Stadt Dissen und der Gemeinden Bad Rothenfelde, Ankum und Bersenbrück (alle Landkreis Osnabrück).

Das Forstamt Lingen stellte Proben von Revierförstereien der Gemeinden Freren, Spelle (Ortsteil Venhaus) und Emsbüren (Ortsteil Elbergen) zur Verfügung (alle Landkreis Emsland).

Die Proben vom Niedersächsischen Forstamt Neuenburg stammten von Revierförstereien in der Gemeinde Hesel (Landkreis Leer), der Stadt Aurich (u.a. Ortsteil Egels, Landkreis Aurich) .

4.1.3. Schleswig-Holstein

Das Kontrollgebiet in Schleswig-Holstein umfasste die Reviere der Försterei Idstedtwege, Kropp, Satrup (alle Landkreis Schleswig-Flensburg) und Sehestedt (Landkreis Rendsburg-Eckernförde) (siehe Abb. 4-3).

Abb. 4-2: Untersuchungsgebiete in Nordrhein-Westfalen (□, Regierungsbezirk Münster) und Niedersachsen (◆, Regierungsbezirk Weser-Ems)

- 1 Untersuchungsgebiete im Landkreis Kleve
- 2 Untersuchungsgebiete im Landkreis Wesel
- 3a 3b Untersuchungsgebiete im Landkreis Borken
- 4 Untersuchungsgebiete im Landkreis Steinfurt
- ◆ Niedersächsisches Forstamt Neuenburg (Gemeinde Zetel)
- ◆ Niedersächsisches Forstamt Lingen (Stadt Lingen)
- ◆ Niedersächsisches Forstamt Palsterkamp (Gemeinde Bad Rothenfelde)
- ★ MKS-Ausbrüche in den Niederlanden

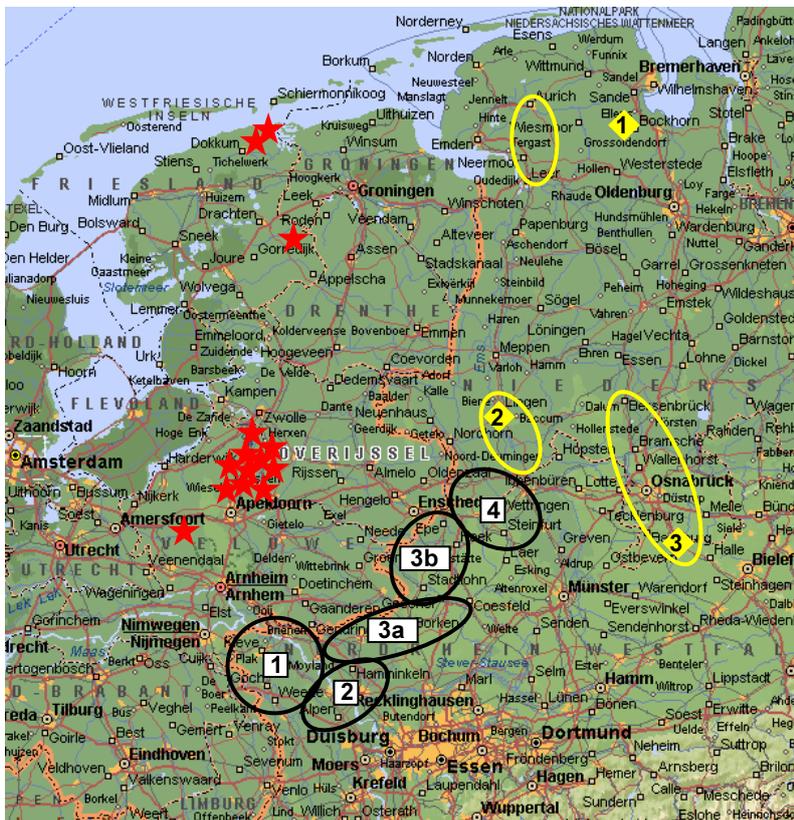
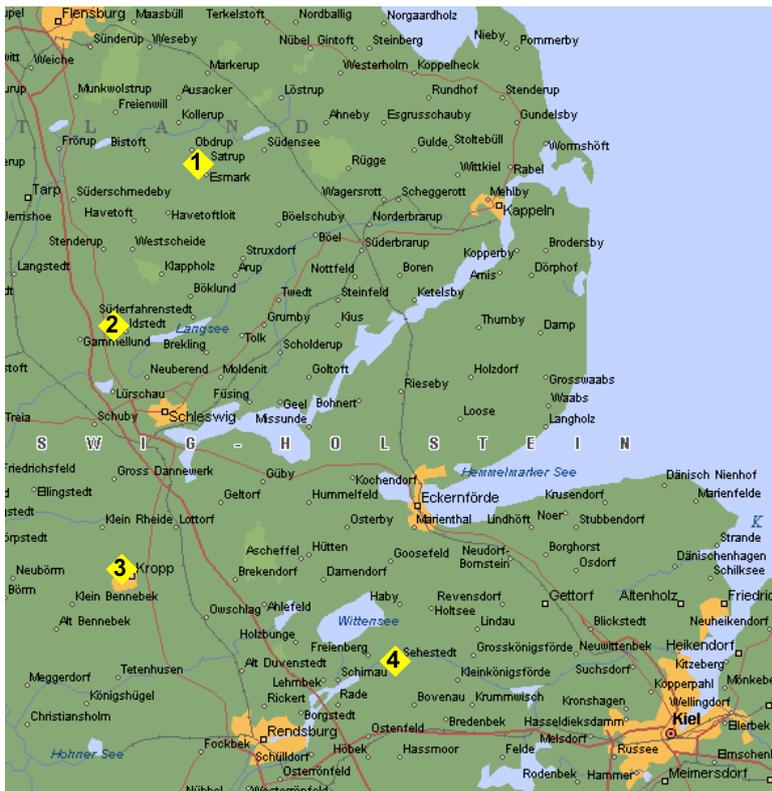


Abb. 4-3: Negativ-Kontrollgebiet in Schleswig-Holstein

- 1 Försterei Satrup (Gemeinde Satrup)
- 2 Försterei Idstedtwege (Gemeinde Idstedt)
- 3 Försterei Kropp (Gemeinde Kropp)
- 4 Försterei Sehestedt (Gemeinde Sehestedt)



4.2. Probensammlung

Zu Beginn der Studie wurden die zuständigen Revierförster, Revierpächter und Jagdausübungsberechtigten in einem Anschreiben über die Studie informiert. Das Anschreiben enthielt detaillierte Angaben über: Projektrahmen und Ziel der Studie, Projektzeitraum, Probenentnahme und Lagerung der Proben bis zum Versand.

Zusammen mit diesem Schreiben gingen den Jagdausübungsberechtigten der betreffenden Reviere Probenröhrchen (Zentrifugenröhrchen 11ml, PS, konisch, steril, Nr. 347856, Nunc, Wiesbaden), 5ml Spritzen (Injekt 5ml Luer, B. Braun Melsungen AG, Melsungen), Begleitzettel sowie frankierte und adressierte Versandumschläge zu. Auf dem Begleitzettel

sollten Angaben gemacht werden über Alter, Geschlecht, Erlegungsdatum, Erlegungsort des erlegten Rehs sowie über den Einsender der Probe. Die Proben aus Nordrhein-Westfalen und Schleswig-Holstein wurden an das Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) in Berlin gesendet; die Proben aus Niedersachsen gingen an die Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV) in Tübingen.

4.3. Untersuchungszeitraum

Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von Oktober 2001 bis Oktober 2002.

4.4. Referenzlabor

Die serologischen Untersuchungen der Proben wurden im deutschen Referenzlabor zur labordiagnostischen Abklärung von MKS-Verdachtsfällen durchgeführt. Dieses Labor ist Bestandteil der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (ab 2004: Friedrich-Loeffler-Institut) und war zu dem Zeitpunkt der Untersuchungen im Anstaltsteil in Tübingen angesiedelt.

Wegen der hohen Kontagiosität des MKSV darf mit diesem Virus nur in Hochsicherheitslaboratorien gearbeitet werden, wobei die Laboratorien nach den Vorschriften der Food and Agriculture Organization (FAO) und der EU strenge Auflagen zu erfüllen haben (Haas, 2001b). Die Laboratorien, die in Europa mit diesem Virus arbeiten dürfen, sind in der Richtlinie des Rates über Maßnahmen der Gemeinschaft zur Bekämpfung der Maul- und Klauenseuche (85/511/EWG bzw. 2003/85/EG) festgelegt. Zusätzlich ist in Deutschland die Verordnung über das Arbeiten mit Tierseuchenerregern (Tierseuchenerreger-Verordnung) vom 25. November 1985 in der jeweils geltenden Fassung zu beachten, nach der es für das Arbeiten mit Tierseuchenerregern einer Erlaubnis der zuständigen Behörde bedarf.

4.5. Labordiagnostik

4.5.1. Serumproben

Von den erlegten Tieren wurde unmittelbar nach dem Abschuss mittels einer sterilen Spritze aus der Brustkammer Blut entnommen und in das Probenröhrchen eingefüllt. Bis zum

Versand sollten die Probenröhren im Kühlschrank aufbewahrt werden. Es wurde ausschließlich koaguliertes Vollblut an das IZW in Berlin (Proben aus Nordrhein-Westfalen und Schleswig-Holstein) und die BFAV in Tübingen (Proben aus Niedersachsen) eingeschickt.

Zur Serumgewinnung wurden die Proben für 20 Min. bei 4300 U/Min., 5°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Wegen der hämolytischen Veränderung der Proben und zur besseren Trennung von Detritus und Serum wurden die Proben noch einmal 10 Min. bei 14000 U/Min., Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg).

Anschließend wurden die Seren bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Verringerung unspezifischer Reaktionen wurden die Seren vor der Testung im Wasserbad bei 56°C für 30 Min. inaktiviert (Komplementinaktivierung).

4.5.2. Eigene Untersuchungen

4.5.2.1. Serologische Verfahren

4.5.2.1.1. Reagenzien

A: Puffer

(1) Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer pH 9,6)

- 1,59g Natriumcarbonat
 - 2,93g Natriumhydrogencarbonat
- ad 1 Liter Aqua dest.

(2) Verdünnungspuffer 1 (dilution buffer; DB1)

- phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4
- 0,1% Tween 20 (Nr. 37470, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

(3) Verdünnungspuffer 2 (DB2)

- DB1
- 5% Milchpulver (Naturaflo, Töpfer GmbH, Dietmannsried)

(4) Verdünnungspuffer 3 (DB3)

- PBS pH 7,4
- 0,05% Tween 20

(5) Verdünnungspuffer 4 (DB4)

- DB3
- 10% Fetales Kälberserum (FKS)
- 2% Kaninchen-Normalserum (KNS)

(6) Waschpuffer:

- 80g NaCl
 - 2g KCl
 - 29g Na₂HPO₄
 - 2g KH₂PO₄
 - 5ml Tween 20
- ad 10 Liter Aqua dest.

(7) Substratpuffer:

- 4,76g Zitronensäure
 - 9,15g di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat
- ad 1 Liter Aqua dest.

B: Reagenzien

(1) Antigen:

MKSV-Antigen vom Serotyp O_{MANISA}. Das Antigen stammte aus „baby hamster kidney“ Zellüberständen (BHK21-CT Zellen) und war inaktiviert.

(2) Catching IgG:

Kaninchen-Antiserum gegen MKSV Serotyp O_{MANISA} (Kaninchen-anti-MKSV-Antikörper)

(3) Detecting IgG:

Meerschweinchen-Antiserum gegen MKSV Serotyp O_{MANISA}.

Um unspezifische Reaktionen zwischen MKSV-spezifischen Kaninchen- und Meerschweinchenseren zu verhindern, wurde das Meerschweinchen-Antiserum vor dem Gebrauch für 60 Min. bei 37°C mit KNS inkubiert.

(4) Konjugat:

Peroxidase (POD) konjugiertes Ziege anti-Meerschweinchen IgG (Nr. 106-035-003, Dianova, Hamburg).

Das Konjugat wurde vor dem Gebrauch mit KNS für 60 Min. bei 37°C vorinkubiert.

(5) Substrat:

Orthophenylendiamin (OPD) (Nr. P 2903, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)

In einem Liter Substratpuffer wurden lichtgeschützt 0,5g OPD gelöst, danach aliquotiert (10ml) und bei -20°C eingefroren. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde die Substratlösung aufgetaut, auf Raumtemperatur erwärmt und mit 30%igem Wasser-

stoffperoxyd (H_2O_2) versetzt (Endkonzentration 0,05%). Die gebrauchsfertige Substratlösung wurde sofort verwendet.

C: Qualitätskontrollserum (Positivkontrolle)

Für die Durchführung des LPBE, SPCE und VNT wurde als Qualitätskontrollserum das Hyperimmunserum (HIS) vom Rind, Nr. 795, verwendet.

4.5.2.1.2. Liquid-phase-blocking ELISA

Die Durchführung des LPBE erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von Hamblin et al. (1986a) und an die Beschreibung im "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" (Lists A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees) des OIE (Anonymus, 2000).

Kaninchen anti-MKSV-Antikörper werden als „Catching IgG“ auf eine ELISA-Platte gebunden. Daraufhin werden die Testseren zusammen mit dem MKSV-Antigen in einer Rundbodenplatte inkubiert, so dass in den Testseren vorhandene MKSV-spezifische Antikörper Epitope des Antigens blockieren können. Das Antigen/Testserumgemisch wird anschließend in den beschichteten ELISA-Platten inkubiert, wobei nicht blockiertes Antigen festgehalten wird. Daraufhin binden MKSV-spezifische Meerschweinchen-Antikörper („Detecting IgG“) an das gebundene und nicht blockierte Antigen. Diese Meerschweinchen-Antikörper werden dann anhand einer Farbreaktion mittels POD konjugiertem Ziege anti-Meerschweinchen IgG (Konjugat) und dem Substrat OPD nachgewiesen (siehe Abb. 4-5). Es erfolgt eine Messung der optischen Dichte nach dem Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure.

Der LPBE wurde wie im folgenden beschrieben durchgeführt.

Die Seren wurden nach dem Auftauen und der Inaktivierung mit DB1 verdünnt und die Anfangsverdünnungen (AV) 1:20 und 1:40 hergestellt. Das Qualitätskontrollserum wurde analog zum Testserum verdünnt, jedoch wurde hier eine AV von 1:1600 hergestellt.

Für die durchgeführten Assays wurden ELISA-Platten (ImmunoTM Platten MaxiSorp F96, Nr. 439454, Nunc, Wiesbaden) verwendet, die am 27.06.2001 (für die Proben Nr. 1 bis 111) und am 25.09.2002 (für die Proben Nr. 112 bis 182 und die Proben aus Niedersachsen) in der BFAV beschichtet und bei $-20^{\circ}C$ gelagert worden waren. Zur Beschichtung der ELISA-

Platten wurde Kaninchen-Antiserum gegen den MKSV Serotyp O_{MANISA} mit Beschichtungspuffer im Verhältnis 1:5000 verdünnt. Die einzelnen Löcher der Mikrotiterplatten wurden mit 50µl Kaninchen-Antiserum so beschickt, dass der Boden aller Wells vollständig bedeckt war. Die Mikrotiterplatten wurden mit selbstklebender Folie luftdicht verschlossen und über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem Puffer bei -20°C gelagert.

Nach einer Testung, bei der das Kontrollserum mit einer Plattencharge und einer Antigencharge einen gültigen Titer ergeben muss, gelten diese Komponenten in der gewählten Kombination als geprüfte Diagnostikreagenzien.

Für die Inkubation der Testseren mit dem MKSV Serotyp O_{MANISA} Antigen in der Liquid Phase wurde das Antigen gemäß Angaben in Tabelle 4-1 in DB1 verdünnt. In jede Vertiefung einer Rundbodenplatte (PS-Microplatte, Greiner GmbH, Frickenhausen) wurden zuerst 50µl dieser Antigenverdünnung überführt und anschließend in jede Vertiefung 50µl der vorverdünnten Testseren bzw. des Qualitätskontrollserums gegeben. Hierbei ergaben sich für die Testseren die Endverdünnungen (EV) von 1:40 bzw. 1:80. Die Inkubation der Testseren sowie des Qualitätskontrollserums erfolgte im Doppelansatz über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4°C.

Tab. 4-1: Verdünnungsfaktoren für den Serotyp O_{MANISA} (LPBE)

Kaninchen-Antiserum	1:5000
MKSV-Antigen vom 29.07.96	1:350 Platten vom 27.09.01
MKSV-Antigen vom 04.04.02	1:80 Platten vom 25.09.02
Meerschweinchen-Antiserum	1:2000 (1:2 vorverdünnt mit KNS)
Ziege anti-Meerschweinchen-IgG-Peroxidase-Konjugat	1:2000 (1:2 vorverdünnt mit KNS)

Pro Platte wurde ein Block mit folgenden Kontrollen mitgeführt: Acht Wells (100%-Wert) enthielten 50µl DB1 statt der Serumverdünnung und 50µl Antigenverdünnung, vier Wells (BLANK-Wert) enthielten ausschließlich DB1 (100µl).

Die fertig beschichteten ELISA-Platten wurden aufgetaut, anschließend mit Waschpuffer dreimal gewaschen (Power Washer 96, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) und

Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf ein Papiertuch entfernt. Anschließend wurden die ELISA-Platten gemäß Abbildung 4-4 mit je 50µl Testserum/Antigengemisch, Qualitätskontrollserum/Antigengemisch bzw. der Kontrollen pro Well beschickt.

Abb. 4-4: Plattenaufteilung LPBE

x: fortlaufende Nummer Testserum (EV 1:40 und 1:80, Doppelansatz)

HIS: Qualitätskontrollserum MKSV Serotyp O_{MANISA}

100%: 100%-Wert (DB1 und Antigen)

BLANK: BLANK-Wert (DB1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 1:40		2		3		4		5		HIS	
B	1:80											
C	6 1:40		7		8		9		10		100%	
D	1:80											
E	11 1:40		12		13		14		15			
F	1:80											
G	16 1:40		17		18		19		20		BLANK	
H	1:80											

Die Platten wurden für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die Inkubation mit dem wie in Tabelle 4-1 angegeben in DB2 verdünnten Meerschweinchen-Antiserum (50µl/Well) für 60 Min. bei 37°C. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde in alle Vertiefungen 50µl in DB2 verdünntes (siehe Tab. 4-1) POD konjugiertes Ziege anti-Meerschweinchen IgG pipettiert und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde anschließend fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und 50µl Substrat-Gebrauchslösung in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde sie 10 bis 15 Min.

lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und die Farbreaktion mit 1:4 verdünnter Schwefelsäure (50µl/Well) gestoppt.

Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte mittels eines ELISA Readers (Digiscan, Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 492 nm. Während der einzelnen Inkubationsschritte wurden die Platten jeweils luftdicht mit einer selbstklebenden Folie verschlossen.

Die BLANK-Wellen , welche nur DB1 enthielten, dienten der Qualitätskontrolle des Tests und sollten einen absoluten OD-Wert <0,150 ergeben.

Zur Auswertung wurde der Durchschnitt der absoluten OD-Werte der 100%-Wellen, welche nur DB1 und Antigen enthielten, ermittelt (OD 100%). Dieser entspricht 100% und alle anderen absoluten OD-Werte wurden in prozentuale OD-Werte umgerechnet.

$$\text{OD\% (Probe)} = \frac{\text{OD (Probe)}}{\text{OD (100\%)}} \times 100$$

Der „cut off“ lag bei 50% (EV 1:40), d.h. als positive Reaktion wurde gewertet, wenn die Farbreaktion mehr als 50% im Vergleich zur negativen Kontrolle (100%-Wellen) gehemmt wurde (prozentualer OD-Wert < 50%). Als Titer ist diejenige Serumverdünnung definiert, mit der sich ein prozentualer OD-Wert von 50% ergibt, wobei Enverdünnungstiter $\geq 1:40$ als positiv bewertet werden. Näherungsweise können die Titer als die erste positive Endverdünnungsstufe angegeben werden. Durch Inter- bzw. Extrapolation aus den für die eingesetzten Serumverdünnungen ermittelten optischen Dichten können die Titer aber auch exakt bestimmt werden.

Für die Gültigkeit des Tests mussten die Qualitätskontrollseren einen prozentualen OD-Wert von < 50% ergeben.

4.5.2.1.3. Solid-phase-competition ELISA

Die Durchführung des SPCE erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von Mackay et al. (2001).

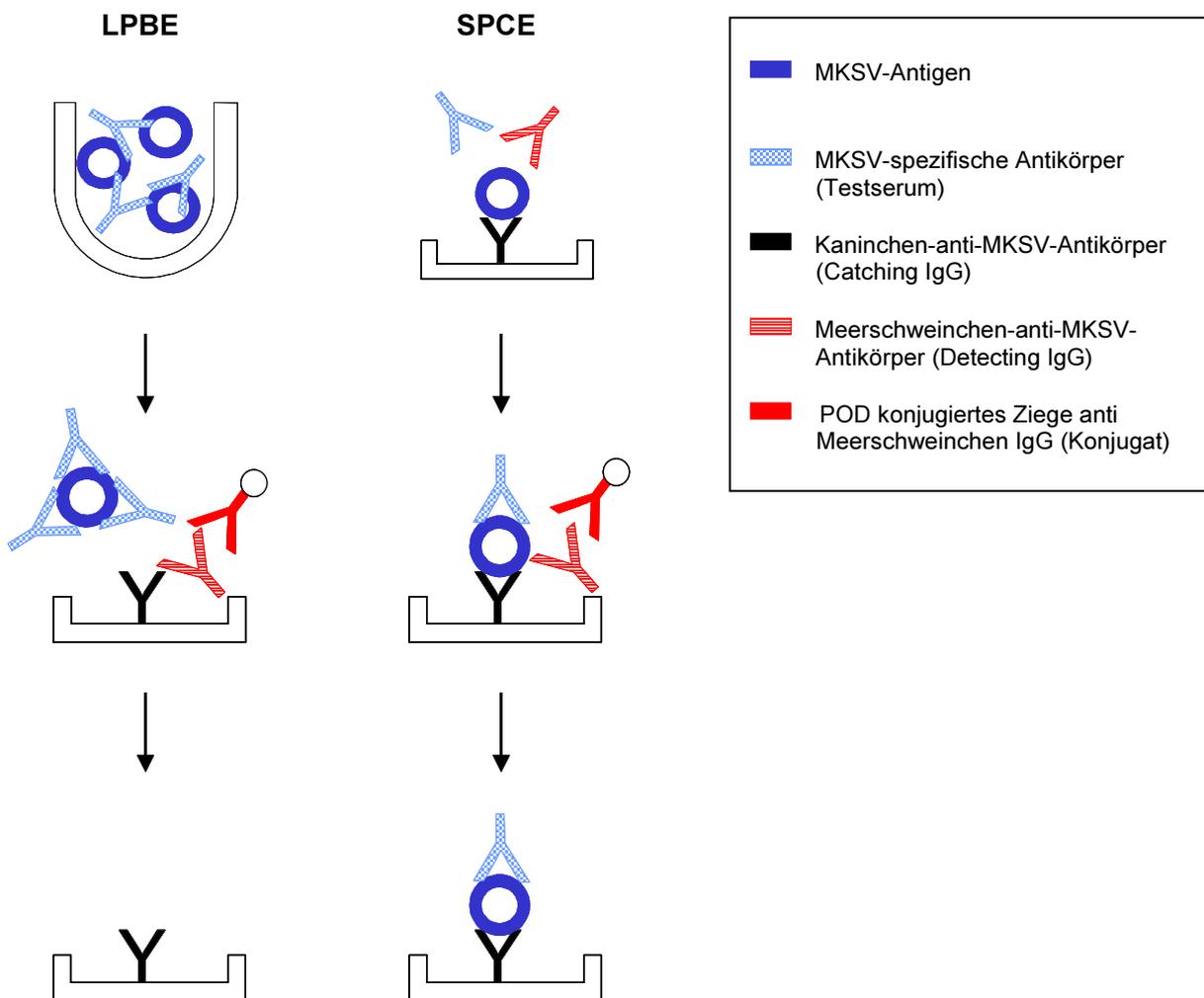
Auch bei diesem Testverfahren werden Kaninchen anti-MKSV-Antikörper als „Catching IgG“ auf eine ELISA-Platte inkubiert. Im ersten Schritt wird das MKSV-Antigen an das Catching IgG gebunden. Danach werden gleichzeitig das Testserum und MKSV-spezifisches Meerschweinchenserum („Detecting IgG“) auf die ELISA-Platte gegeben und inkubiert, wobei beide Antiseren um die Bindung an die Epitope des MKS-Antigens konkurrieren. Die

Meerschweinchen-Antikörper können nur an das nicht von MKSV-spezifischen Antikörpern aus dem Testserum blockierte Antigen binden. Sie werden anhand einer Farbreaktion durch POD konjugiertes Ziege anti-Meerschweinchen-IgG (Konjugat) und dem Substrat Orthophenylendiamin nachgewiesen (siehe Abb. 4-5). Es erfolgt die Messung der optischen Dichte nach dem Stoppen der Farbreaktion mit Schwefelsäure.

Abb. 4-5: Testmethoden LPBE und SPCE im Vergleich

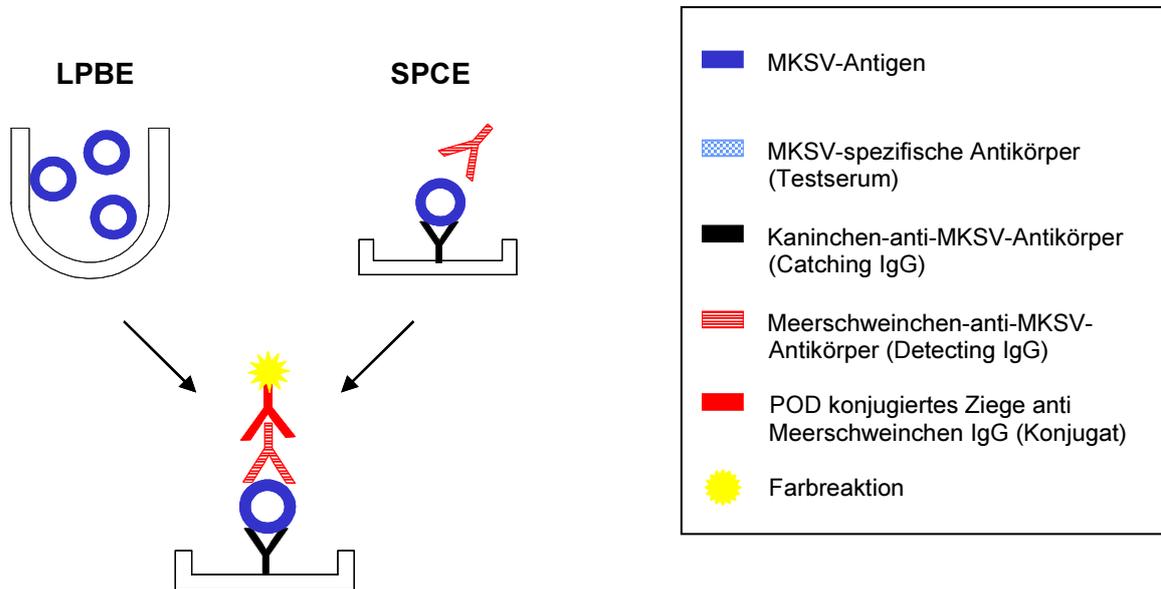
- a) positives Testergebnis: keine Farbreaktion
- b) negatives Testergebnis: Farbreaktion

a) positiv



Fortsetzung Abb. 4-5: Testmethoden LPBE und SPCE im Vergleich

b) negativ



Der SPCE wurde wie im folgenden beschrieben durchgeführt.

Die Testseren (25µl/Well) wurden in einer Rundbodenplatte (Greiner GmbH, Frickenhausen) mit in DB4 verdünntem (siehe Tab. 4-2) Meerschweinchen-Antiserum (100µl/Well) gemischt und so die Endverdünnung 1:5 hergestellt. Das „cut off“ Serum (Qualitätskontrollserum) wurde analog zum Testserum verdünnt. Für den Kontrollblock wurden in den 100%-Wells und BLANK-Wells 25µl DB4 mit 100µl verdünntem Meerschweinchen-Antiserum vermischt.

Tab. 4-2: Verdünnungsfaktoren für den Serotyp O_{MANISA} (SPCE)

Kaninchen-Antiserum	1:5000
MKSV-Antigen	1:50
Meerschweinchen-Antiserum	1:8000 (1:2 vorverdünnt mit KNS)
Ziege anti-Meerschweinchen-IgG-Peroxidase-Konjugat	1:2000 (1:2 vorverdünnt mit KNS)

Die Beschichtung der ELISA-Platten mit Catching IgG für den SPCE erfolgte in der gleichen Vorgehensweise wie für den LPBE (siehe Kap. 4.5.2.1.2.). Die bei -20°C gelagerten ELISA-Platten für den Serotyp O_{MANISA} wurden aufgetaut und anschließend mit DB3 dreimal gewaschen. Nach dem Ausschütten wurden letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf ein Papiertuch entfernt.

Abb. 4-6: Plattenaufteilung SPCE

x: fortlaufende Nummer Testserum (EV 1:5, Doppelansatz)

Cut off: Qualitätskontrollserum MKSV Serotyp O_{MANISA}

100%: 100%-Wert (DB4 und Antigen)

BLANK: BLANK-Wert (DB3 und DB4)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1		2		3		4		5		HIS	
B	6		7		8		9		10			
C	11		12		13		14		15		100%	
D	16		17		18		19		20			
E	21		22		23		24		25			
F	26		27		28		29		30			
G	31		32		33		34		35		BLANK	
H	36		37		38		39		40			

Die Beschickung der ELISA-Platten erfolgte gemäß Abbildung 4-6 im Doppelansatz. Das MKSV Serotyp O_{MANISA} Antigen wurde, wie für den Virusstamm angegeben, 1:50 in DB3 verdünnt und 50µl je Well auf die ELISA-Platte pipettiert. Ausgenommen waren die BLANK-Wells. Diese erhielten nur DB3 (ohne Antigen). Anschließend erfolgte die Inkubation für 60 Min. bei 37°C. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nun wurden aus der Rundbodenplatte 50µl je Well auf die ELISA-Platte überführt und 60 Min. bei 37°C inkubiert. Aus einem Rundbodenplattenwell wurden zwei ELISA-Plattenwells hergestellt. Nach

dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem wie in Tabelle 4-2 angegeben in DB4 verdünnten POD markiertem Ziege anti-Meerschweinchen IgG (50µl/Well) für 30 Min. bei 37°C. Die Platte wurde anschließend fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und 50µl Substrat-Gebrauchslösung in jedes Well pipettiert. Nachdem die Platte 10 bis 15 Min. lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert worden war, wurde die Substratreaktion durch Zugabe von 50µl 1:4 verdünnter Schwefelsäure in jedes Well gestoppt.

Die Messung der OD erfolgte mittels eines ELISA Readers (Digiscan, Asys Hitech GmbH; Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 492 nm. Während der Inkubationsschritte wurden die Platten jeweils luftdicht mit einer selbstklebenden Folie verschlossen.

Die BLANK-Wellen, welche nur DB1 enthielten, dienten der Qualitätskontrolle des Tests und sollten einen absoluten OD-Wert <0,150 ergeben.

Zur Auswertung wurde der Durchschnitt der absoluten OD-Werte der 100%-Wellen, welche nur DB4 und Antigen enthielten, ermittelt (OD 100%). Dieser entspricht 100% und alle anderen absoluten OD-Werte wurden in prozentuale OD-Werte umgerechnet.

$$\text{OD\% (Probe)} = \frac{\text{OD (Probe)}}{\text{OD (100\%)}} \times 100$$

Der „cut off“ lag bei 70% (EV 1:5), d.h. als positive Reaktion wurde gewertet, wenn die Farbreaktion mehr als 30% im Vergleich zur negativen Kontrolle (100%-Wellen) gehemmt wurde (prozentualer OD-Wert < 70%)

Für die Gültigkeit des Tests mussten die „cut off“-Kontrollseren einen prozentualen OD-Wert von <70 ergeben.

4.5.3. Fremduntersuchung

4.5.3.1. Virusneutralisationstest

4.5.3.1.1. Reagenzien

(1) Medium:

Minimum Essential Medium (MEM, Gibco BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA)

- 10% Tryptose-phosphat-Brühe
- 5% FKS
- Penicillin/Streptomycin-Lösung (0,1ml/10ml Medium)

(2) Zellen:

eingefrorene BHK21-CT Zellen aus Rollerkulturen (2×10^6 Zellen/ml)

4.5.3.1.2. Durchführung

Der VNT wurde in der BFAV von Herrn Dr. B. Haas durchgeführt. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von Golding et al. (1976) und an die Beschreibung im "Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" (Lists A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees) des OIE (Anonymus, 2000).

Es können im Testserum enthaltene spezifische Antikörper gegen das MKSV im Mikroneutralisationstest nachgewiesen werden, da sie die Fähigkeit besitzen, das Auftreten eines zytopathogenen Effektes (ZPE) zu verhindern. Es werden dazu die Testseren mit MKSV von bekanntem Titer inkubiert und dann mit MKSV-sensitiven Zellen gemischt.

Der VNT erfolgte auf Nunclon™ 96 MicroWell™ Platten (Nr. 1608055, Nunc, Wiesbaden). Es wurden eine Viruskontrollplatte (Virustitration), eine Serumkontrollplatte und Testserumplatten angelegt.

Auf der Serumkontrollplatte wurden 50µl MEM pro Well vorgelegt. Anschließend wurde diese gemäß Abbildung 4-7 mit dem Qualitätskontrollserum gegen den Serotyp O_{MANISA} beschickt. Es wurde eine Serumvorverdünnung von 1:20 hergestellt und von dieser Vorverdünnung wurden 50µl in die Vertiefungen A1 bis A12 pipettiert. Daraus ergibt sich eine AV von 1:40. 50µl von der Verdünnung 1:40 wurden in die nächste Reihe, welche 50µl Vorlage enthielt, überpipettiert (AV 1:80). So wurde weiter fortgefahren bis zur AV 1:5120.

Die Beschickung der Platte mit den Viruslösungen CV1, CV2, CV3 (50µl/Well) erfolgte nach Abbildung 4-7.

Abb. 4-7: Plattenaufteilung Serumkontrolle

CV: Challengevirusverdünnung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:40				1:40				1:40			
B	1:80				1:80				1:80			
C	1:160				1:160				1:160			
D	1:320				1:320				1:320			
E	1:640				1:640				1:640			
F	1:1280				1:1280				1:1280			
G	1:2560				1:2560				1:2560			
H	1:5120				1:5120				1:5120			
	CV1				CV2				CV3			

Für den VNT wurden BHK21-CT Zell-Rollerkulturen mit MEM, supplementiert mit Penicillin/Streptomycin-Lösung (0,1ml/10ml), als Nährlösung eingesetzt. Das MKSV Serotyp O_{MANISA} wurde in BHK21-CT Monolayern nach Standardprotokollen angezüchtet und Aliquots mit einem Titer von 10⁶ kulturinfektiöse Dosen 50% (KID₅₀) bezogen auf die Virusmenge pro 0,1ml hergestellt. Für die Durchführung des VNT wurden drei Challengevirusverdünnungen (CV1, CV2 und CV3) angesetzt. Sie unterschieden sich jeweils um einen vierfachen Verdünnungsschritt, d.h. CV2 enthielt ein Viertel und CV3 ein Sechzehntel der Virusmenge von CV1. 50µl der CV2 enthielten 100 KID₅₀. Der Verdünnungsfaktor für CV1 für den Serotyp O_{MANISA} betrug für die verwendete Charge 1: 1000.

Für die Viruskontrolle (Viruskontrollplatte) wurde eine Mikrotiterplatte mit MEM beschickt. Dann wurde eine Verdünnungsreihe beginnend mit der CV1 angelegt und gemäß Plattenaufteilung in Abbildung 4-8 in 4er Schritten ausverdünnt. Je Platte wurden zwei Säulen (Nr. 11 und 12) als Zellkontrolle mitgeführt.

Abb. 4-8: Plattenaufteilung Viruskontrolle

CV: Challengevirusverdünnung

ZK: Zellkontrolle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CV1	1:4 =CV2	1:16 =CV3	1:64	1:256	1:1024	1:4096	$10^{-4,2}$	$10^{-4,8}$	$10^{-5,4}$	ZK	ZK
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Zur Verringerung unspezifischer Reaktionen durch Serumbestandteile wurden die Testseren im Wasserbad bei 56°C für 30 Min. inaktiviert.

Die Testserumplatten wurden gemäß Abbildung 4-9 mit den Testseren beschickt. Hierfür wurden in die Vertiefungen A1 bis A12 75µl MEM pro Well vorgelegt und in die übrigen Wells je 50µl MEM. 25µl Testserum wurden den Wells der ersten Verdünnungsstufe hinzugegeben und dann 50µl überpipettiert. So wurde weiter fortgefahren bis zur AV 1:512. Die Beschickung der Testserumplatten mit den CV 1 bis 3 erfolgte so, dass pro Platte eine CV (50µl/well) verwendet wurde. Somit war es erforderlich, jedes Serum auf drei Platten zu testen.

Abb. 4-9: Plattenaufteilung Testseren

Sechs Proben über acht Verdünnungsstufen, jeweils eine CV pro Platte
x: fortlaufende Nummer Testserum

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:4											
B	1:8											
C	1:16											
D	1:32											
E	1:64											
F	1:128											
G	1:256											
H	1:512											
	1	2	3	4	5	6						

Die Inkubation von Serumkontrollplatte und Testserumplatten erfolgte für 2 Std. bei 37°C, 5% CO₂. Anschließend wurden 100µl einer BHK21-CT Zellsuspension, eingestellt auf 2 x 10⁶ Zellen/ml, auf alle Platten hinzugegeben und diese 4 bis 5 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Ablesung erfolgte am 4. Tag, wobei der Ansatz tag als Tag 0 bezeichnet wird. Die Platten wurden nativ mit einem Invertmikroskop abgelesen und der ZPE beurteilt.

Die Berechnung der Titer erfolgte nach der Methode von Spaerman und Kärber (Horzinek, 1985). Der Serومتiter wird definiert als Kehrwert derjenigen Serumverdünnung, welche in 50% der Testobjekte bei Inkubation mit 100 KID₅₀ pro Well die Ausprägung eines ZPE verhindert. Titer ≥ 8 werden als positiv bewertet.

Die Gültigkeit des Tests wurde überprüft, indem der Virustiter (Viruskontrollplatte) bestimmt wurde. Der angestrebte Virustiter betrug 100KID₅₀ = 2,0 log₁₀. Dabei war eine Abweichung von +/- 0,5 log₁₀ zulässig, d.h. der Test war gültig von 31,6 bis 316 KID₅₀ pro Well bzw. 50µl Viruslösung. Zudem wurde der Titer des Referenzserums bestimmt, da dieser nicht mehr als das Zweifache vom seinem Zieltiter abweichen sollte.

4.6. Angewandte statistische Verfahren

Um den LPBE und den SPCE miteinander bzw. beide jeweils mit dem VNT zu vergleichen wurde der McNemar Test zur Untersuchung von Vierfelder-Tafeln mit abhängigen Stichproben verwendet. Eingegeben wurden die Anzahlen übereinstimmender bzw. nicht übereinstimmender Resultate zweier Untersuchungen an ein- und derselben Stichprobe (Vierfelder-Tafel). Dabei wurde das Signifikanzniveau auf $\alpha=0,05$ festgelegt.

Da drei verschiedene Verfahren paarweise gegeneinander getestet wurden, wurde eine Bonferroni-Adjustierung vorgenommen (Signifikanzniveau geteilt durch die Anzahl der parallel durchgeführten Testverfahren).