

Molekularbiologische Borna Disease Virus-Diagnostik mit Hilfe von 'Real Time PCR' (TaqMan)

Felix Ehrensperger¹, Regina Schindler¹, Mathias Ackermann²

¹Veterinärpathologie der Universität Zürich, Abteilung Immunpathologie, Winterthurerstrasse 268, CH-8057

Zürich, ²Virologisches Institut Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 266a, CH-8057 Zürich

Schlüsselwörter

Borna Disease Virus (BDV), Molekularbiologischer Nachweis, TaqMan RT PCR, Zecken als potentielle Vektoren, p24 / p40 Verhältnis

Problemstellung und Zielsetzung

Etablierung und Anwendung der Real Time RT PCR (TaqMan) zum Nachweis von Borna Disease Virus RNA in Sekreten, Exkreten, Geweben von mit BDV infizierten Haustieren und potentieller Vektoren.

Material und Methoden

- 1.) Etablierung der Real Time PCR (TaqMan) für das Borna Disease Virus
- 1.1) Auswahl von geeigneten Primern und Sonden (Probe) für die beiden Hauptproteine p40 und p24
- 1.2) Optimierung der Sonden- und Primerkonzentrationen
- 1.3) Extraktion mit RNeasy Mini Kit (Qiagen AG Basel)
- 1.4) Herstellung der cDNA mittels RT (Promega Dübendorf)
- 1.5) PCR gemäss Protokoll TaqMan (40 Zyklen)
- 1.6) Bestimmung der molekulare und zellulären Sensitivität
- 2.) Anwendung der Methode an BDV-infiziertem Hirngewebe von Pferden und Schafen
- 3.) Anwendung der Methode an künstlich infizierten Zecken (Ixodes ricinus)

Ergebnisse und Bedeutung

Es gelang, mit der TaqMan RT PCR Methode BDV RNA in Zellkulturen und Geweben spezifisch nachzuweisen. Die Spezifität wurde gegenüber verwandter Virusarten (Parainfluenza, Hundestaupe, Tollwut und porcine Coronaviren, PED) überprüft. Die Methode ist sehr sensitiv: In Verdünnungsreihen konnten 10 Moleküle bzw. 1 infizierte Zelle in 1 einer Million nicht infizierter Zellen nachgewiesen werden. Auch in gefrorenem Zustand gelagertem Gewebe konnte das Virus zuverlässig und sensitiv detektiert werden. Der Nachweis in fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe hingegen gelang nicht.

In Zusammenarbeit mit Dr. Lise Gern, Institut de Zoologie, Laboratoire de Parasitologie, Université de Neuchâtel konnten Zecken mit virusinfizierten Zellen künstlich gefüttert werden. Die Zecken wurden nach Intervallen von 1 bis 24 Tagen getötet und mit der TaqMan Methode untersucht. Virus-RNA konnte über die ganze Beobachtungszeit in den Zecken immer wieder detektiert werden, wenngleich in sehr geringen Mengen. Im Gegensatz zu den Gewebeproben infizierter Pferde und Schafe war das p40 / p24 -Verhältnis bei den Zecken grösser als 1, was in Analogie zu Untersuchung an Zellkulturen für eine aktive Virusreplikation spricht. Die Real Time PCR für den Nachweis von BDV RNA eröffnet uns nun neue Möglichkeiten für weitere Untersuchung an potentiellen Vektoren und auch an Patienten und rekonvaleszenten (Ausscheidung von Virus in Sekreten, Blut etc.).

Publikationen, Poster und Präsentationen

Schindler, A. R. (2004) Real Time RT-PCR for tracing and quantification of Borna Disease Virus RNA in diseased hosts compared to experimentally inoculated ticks. Dissertation, Vetsuisse Fakultät Zürich.

Schindler, R.; Vöglin, A.; Hilbe, M.; Zlinszky, K.; Ackermann, M.; Ehrensperger, F. Detection of Borna Disease Virus by Real Time PCR (TaqMan®). Posterpräsentation an der Jahrestagung der ESV 2003, Dublin

Projekt 1.01.20

Projektdauer Dezember 2001 - Mai 2004