

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

**Band:** 138 (1996)

**Heft:** 2

**Artikel:** PCR : ein Blick hinter die Kulisse der Bovinen Virusdiarrhöe-Viren

**Autor:** Stalder, H.P. / Strasser, M. / Meier, P.

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-589337>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 17.11.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

Institut für Veterinär-Virologie<sup>1</sup> und Tierpathologie<sup>2</sup>, Universität Bern, Institut für Immunprophylaxe und Viruskrankheiten<sup>3</sup>, Mittelhäusern

## PCR: Ein Blick hinter die Kulisse der Bovinen Virusdiarrhöe-Viren

H.P. Stalder<sup>1</sup>, M. Strasser<sup>1</sup>, Ph. Meier<sup>1</sup>, A. Tontis<sup>2</sup>, M. Hofmann<sup>3</sup>, N. Ruggli<sup>3</sup>, E. Peterhans<sup>1</sup>

### Zusammenfassung

Mittels PCR und Sequenzanalyse kann man zeigen, dass die weltweit verbreiteten Bovinen Virusdiarrhöe-Viren (BVD-Viren) genetisch sehr heterogen sind. Trotz Unterschieden auf der Ebene der Genomsequenz findet sich im Nichtstrukturprotein NS3 der BVD-Viren eine Region, in welcher alle bisher untersuchten, in einem Zeitraum von über 40 Jahren in Europa, Nordamerika und Neuseeland isolierten BVD-Viren eine einheitliche Proteinsequenz aufweisen. Diese weicht von derjenigen der mit den BVD-Viren eng verwandten Europäischen Schweinepestviren ab und ermöglicht somit eine Unterscheidung dieser Viren. Die Analyse der 5' untranslierten Region eines in der Schweiz aus einem Rind mit hämorrhagischem Syndrom isolierten BVD-Virus zeigt, dass dieses nicht mit den kürzlich in den USA und in Kanada beobachteten epidemisch auftretenden, ebenfalls ein hämorrhagisches Syndrom verursachenden BVD-Viren, sondern mit in der Schweiz vorhandenen Virusstämmen verwandt ist.

**Schlüsselwörter:** Bovines Virusdiarrhöe-Virus – Europäisches Schweinepestvirus – Heterogenität – Hämorrhagisches Syndrom – Molekulare Epidemiologie

### PCR: a look behind the scenes at bovine viral diarrhoea virus

As indicated by their nucleotide sequences bovine viral diarrhoea viruses (BVD-virus) are genetically quite heterogenous. Despite differences in the nucleotide sequence in the NS3 region, we found that the derived amino acid sequence of all viral strains analyzed was identical and differed from that of classical swine fever viruses, thus allowing differentiation between bovine and porcine pestiviruses. Remarkably, the BVD viral strains were isolated over a time period of some 40 years in Europe, North America and New Zealand. The nucleotide sequence of the 5' untranslated genome region of a BVD virus recently isolated in Switzerland from a calf with hemorrhagic syndrome differs from that of BVD viruses causing similar symptoms in a large epidemic outbreak in North America.

**Key words:** bovine viral diarrhoea-virus – classical swine fever-virus – genetic heterogeneity – hemorrhagic syndrome – molecular epidemiology

### Einleitung

Der Nachweis von Viren mittels PCR ist nur ein Beispiel für die vielfältigen Anwendungen dieser bestechend eleganten Methode in der Virologie. Dass sich durch die PCR auch faszinierende Einblicke in die Verwandtschaftsverhältnisse von Viren ergeben, soll nachfolgend am Beispiel der bovinen Virusdiarrhöe-Viren (BVD-Viren) dargestellt werden (Übersicht zu BVD siehe Weiss et al., 1994). Zusammen mit dem Europäischen Schweinepestvirus (ESP-Virus) und dem Border Diseasevirus bilden die BVD-Viren das Genus Pestivirus der Flavivirus-Fami-

lie. Das bekannteste Flavivirus, das Gelbfiebertvirus, hat dieser Familie den Namen gegeben. Die verschiedenen Pestiviren gelten als «Spezialisten», die aber auch die jeweils andere Zielspezies befallen können (Moennig, 1990). Aus praktischer Sicht wichtig ist insbesondere die rasche Identifizierung des ESP-Virus, weil dieses zu den Tierseuchenerregern zählt und für befallene Bestände entsprechende Massnahmen angeordnet werden müssen.

## Resultate und Diskussion

In Abbildung 1 ist das Genom der Pestiviren dargestellt. Dieses besteht aus positivsträngiger RNA von ca. 12 500 Nukleotiden. Die das Viruspartikel bildenden Strukturproteine werden im 5' Teil, die im Zusammenhang mit der Virusreplikation wichtigen Nichtstrukturproteine im 3' Teil des Genoms kodiert. Vom BVD-Virus sind zytopathogene und nicht zytopathogene Biotypen bekannt. Erstere unterscheiden sich von den in der Natur viel häufigeren nicht zytopathogenen dadurch, dass das Nichtstrukturprotein NS2/3 durch eine genetische Veränderung in die Proteine NS2 und NS3 gespalten ist. (Meyers et al., 1991). Zum Nachweis von BVD-Viren entwickelten wir vor 5 Jahren ein PCR-Nachweisverfahren. Die dabei verwendeten Reaktionsbedingungen sind in der Arbeit von Hertig et al. (1991) detailliert dargestellt. In Abbildung 2 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer und Reaktionsbedingungen aufgeführt. Wir konzentrierten uns in der Etablierung der PCR zum Nachweis von BVD-Viren auf die Genomregionen, welche das virale Oberflächenglykoprotein E2 und das Nichtstrukturprotein NS3 kodieren. Im ersten Schritt wird die virale RNA mit dem Enzym Retrotranskriptase in DNA umgeschrieben und daran anschliessend mit der Polymerasekettenreaktion amplifiziert (RT-PCR). Der Virusnachweis mittels RT-PCR erwies sich als über 100mal sensitiver als die Isolierung aus der Zellkultur (Hertig et al., 1991). Wenn man in Rechnung stellt, dass mit der PCR auch die Nukleinsäure von nichtinfektiösen Viren nachgewiesen werden kann, ist die im Vergleich zur Zellkulturisolierung höhere Sensitivität der PCR nicht erstaunlich. Gewissermassen als Nebenprodukt dieser Untersuchung erhielten wir Anhaltspunkte dafür, dass die BVD-Viren sehr heterogen sind – eine Beobachtung, welche durch frühere Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern (Corapi et al., 1990) sowie Nukleinsäurehybridisierung (Dubovi, 1992) gestützt wird. Wir wählten für unsere Untersuchungen zur Heterogenität BVD-Virusstämme aus, welche als sogenannte «Laborvirusstämme» gut bekannt sind. Anschliessend an die RT-PCR bestimmten wir die Nukleotidsequenz dieser Viren. Die Resultate dieser Untersuchung zeigten, dass BVD-Viren tatsächlich genetisch sehr unterschiedlich sind. In der untersuchten NS3-Region fanden wir insgesamt 24% unterschiedliche Basen, in der E2-Region waren es gar 47% (Hertig et al., 1995). Dieser Befund bestätigt, dass in der Evolution der Viren die Nichtstrukturproteine konserviert, die an der Virusoberfläche gelegenen Glykoproteine dagegen variabel sind. Letzteres hängt auch damit zusammen, dass die Oberflächenglykoproteine – E2 ist das Hauptzielprotein für neutralisierenden Antikörper – dem Druck des

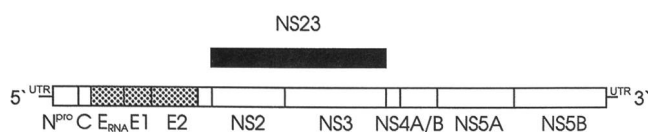


Abbildung 1: Das Genom der Pestiviren

Abbildung 2: Primer und Reaktionsbedingungen

### Primer spezifisch für BVD- zur Unterscheidung gegenüber ESP-Viren im NS3 Bereich:

NS3a 5' -GCGAGGATCC GTAGGTAGAGTGAAACCCGG  
6941-6960 sense  
NS3b 5' AGTCGAATTC CGGGACCTGGACTTCATAGC  
7255-7236 antisense

Reaktionsbedingungen: 30 Zyklen zu 30 sec 94 °C, 1 min 56 °C, 1 min 74 °C, zum Schluss 10 min 74 °C

### Primer spezifisch für Genotyp-1 zur Unterscheidung gegenüber Genotyp-2 BVD-Viren im 5'UTR-Bereich:

5UTRa 5' -TTGATCTAGA CGTGGACGAGGGCAGCCCA  
236-255 sense  
5UTRb 5' -AGACGAATTC TCAACTCCATGTGCCATGTAC  
395-375 antisense

Reaktionsbedingungen: 1×4 min 94 °C, 30 Zyklen zu 30 sec 94 °C, 1 min 62 °C, 1 min 74 °C, zum Schluss 10 min 74 °C

*Kursiv dargestellt sind Restriktions-Schnittstellen*

Immunsystems stärker ausgesetzt sind und sich schneller ändern. Bei der genaueren Analyse der Resultate machten wir eine unerwartete Entdeckung. Zwar war die Heterogenität im NS2-Abschnitt mit 24% ebenfalls erheblich. Nach Umsetzung der Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz zeigte sich aber, dass diese bei allen BVD-Viren identisch war (Hertig et al., 1995). Dieser Befund erstaunt besonders, weil die von uns untersuchten Virusstämme aus Europa, Nordamerika und Neuseeland stammten und in einem Zeitraum von über 40 Jahren isoliert worden waren. Offenbar waren wir bei unserer Untersuchung zufälligerweise auf einen Abschnitt im NS3-Protein gestossen, welcher für die Funktion dieses Proteins in bovinen Zellen derart wichtig ist, dass keinerlei Mutationen toleriert werden. NS3 hat mehrere enzymatische Funktionen; unter anderem ist es eine NTPase/Helikase (Zusammenhang mit der RNA Synthese) (Tamura et al., 1993) und spaltet grossmolekulare Virusproteine in kleinere Bruchstücke (Wiskerchen et al., 1991). Im Gegensatz zum NS3 fanden wir im E2 eine stark veränderte Aminosäuresequenz (42%) (Hertig et al., 1995).

Die NS3-Region hielt eine weitere Überraschung bereit. Wir verglichen die publizierten Nukleotidsequenzen von ESP-Virusstämmen derselben Region mit unseren Daten und stellten fest, dass die ESP-Viren sich in der untersuchten Region in 6 Aminosäuren von den BVD-Viren unterschieden (Hertig et al., 1995); sie zeigten also gewissermassen in dieser Gegend einen anderen, ebenfalls unverwechselbaren Fingerabdruck. Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit an einer grösseren Anzahl ESP-Virusstämme bestätigt und erweitert werden (Abbildung 3). Wie in diesem Heft an anderer Stelle dargestellt, unterscheiden sich BVD- von ESP-Viren auch in der Nukleotidsequenz der 5'-untranslierten Genomregion (Wirz et al., 1993; Hofmann et al., 1994). Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich zur Unterscheidung auch die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz in der NS3-Region eignet.

Abbildung 3:  
Aminosäure-Sequenz  
von BVD- und ESP-Viren  
im NS3-Bereich

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
NADL	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
SD-1	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
BVD1251	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
Burtenshire	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
Singer	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
Oregon, C24V	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
7443, USA	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
McCann	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
Osloss, 2482	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
New York	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
Indiana	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
Illinois	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
New Zealand	R	Y	R	S	Q	E	T	A	T
ESP Alfort	P	V						E	M
ESP Brescia	P	V						E	M
ESP Steiermark	P	V						E	V
ESP VR531	P	V	Y					E	M
ESP CAP	G	P						E	M

Das zweite Beispiel für eine epidemiologisch relevante Anwendung der PCR betrifft die Unterscheidung von BVD-Viren unterschiedlicher Virulenz. Infektionen mit BVD-Viren führen zu Krankheitssymptomen, welche sowohl in ihrer Art wie auch im Schweregrad sehr verschieden sein können (Perdrizet et al., 1987). Die bei uns bekannteste Form einer schwer verlaufenden Form ist die Mucosal Disease, welche bei Tieren auftritt, die aufgrund einer Infektion in der Frühphase der Gestation *in utero* infiziert werden und eine spezifische Immuntoleranz für das infizierende Virus entwickeln. Ausgelöst wird die Krankheit, wenn zusätzlich zum bereits im Tier vorhandenen, nicht zytopathogenen Virus ein antigenetisch identischer oder eng verwandter zytopathogener Biotyp auftritt. Letzteres ist die Folge einer Mutation des vorhandenen Virus oder auf eine Superinfektion mit einem antigenetisch eng verwandten BVD-Virus zurückzuführen (Brownlie et al., 1984; Bolin et al., 1985). In unserem Fall ging es um eine Verlaufsform, welche pathologisch-anatomisch durch Hämorrhagien in inneren Organen und in der Subcutis verbunden war. Von diesem Tier isolierten wir ein nicht zytopathogenes BVD-Virus. In Kanada und den USA trat in epidemischer Form eine ähnliche Art der BVD auf, verbunden mit einem fast vollständigen Verlust der Thrombozyten (Rebhun et al., 1989; Corapi et al., 1989). Mortalität und Letalität dieser Krankheit waren bemerkenswert: Allein in der Provinz Quebec erkrankten 120 000 Tiere, und 40 000 davon verendeten (Pellerin et al., 1994). Von mehreren Fällen isolierte man nicht zytopathogene Viren. Die Sequenzierung von Genomabschnitten dieser Viren zeigte bald, dass man es mit einer bisher nie aufgetretenen, neuen Klasse von BVD-Viren zu tun hatte. Deshalb bezeichnete man diese neuen Viren als BVD-Genotyp-2- und die bis anhin bekannten als BVD-Genotyp-1-Viren (Ridpath et al., 1994; Pellerin et al., 1994). In der Schweiz ist ein durch BVD-Viren verursachtes hämorrhagisches Syndrom bisher nur selten beobachtet worden (Ehrensperger, persönliche Mitteilung) und stellt vermutlich ein seltenes Ereignis dar. Wegen der möglichen Folgen eines Auftretens von «neuen» Viren in der Schweiz (man erinnert sich an IBR!) ist es naheliegend, aus Tieren mit hämorrhagischem Syndrom isolierte Viren mit den nordamerikanischen Virusstämmen zu vergleichen. Dazu stand uns bisher erst ein Virusisolat zur Verfügung, wel-

ches wir im 5'-untranslierten Teil des Genoms durch RT-PCR amplifizierten und anschliessend dessen Nukleotidsequenz bestimmten. Die Sequenz wurde mit dem phylogenetischen Analyse-Programm GCG im Computer verglichen mit den Genotyp-2-BVD-Viren und einer grösseren Anzahl von bekannten Genotyp-1-BVD-Viren. Zum Vergleich schlossen wir auch einige ESP-Virusstämme mit ein. Die Resultate sind in Abbildung 4 dargestellt. Es ist offensichtlich, dass das von uns untersuchte, in der Schweiz aus einem Tier mit hämorrhagischem Syndrom isolierte, nicht zytopathogene BVD-Virus nicht zum Genotyp 2 zählt. Es ist vielmehr zwei anderen, bei uns aus persistent infizierten, klinisch unauffälligen Tieren isolierten BVD-Viren ähnlich. Selbstverständlich ist diese eine Untersuchung nicht imstande, etwas über das Vorhandensein der bisher erst in Nordamerika festgestellten Genotyp-2-BVD-Viren zu sagen. Wir hoffen aber, damit

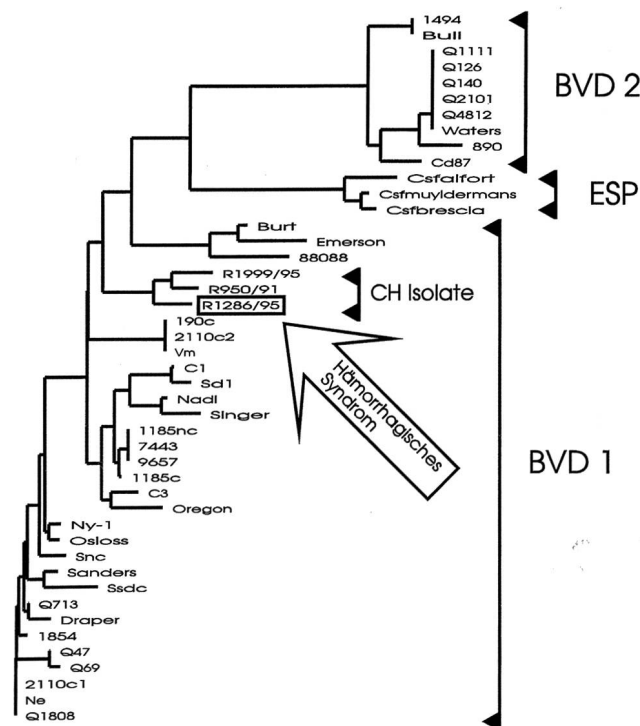


Abbildung 4: Verwandtschaftliche Beziehungen zwischen BVD-Genotyp-1, -Genotyp-2 und ESP-Viren

die in der Praxis tätigen Kolleginnen und Kollegen auf diese neue Form der Krankheit aufmerksam zu machen und sind für Hinweise auf verdächtige Fälle dankbar. Aus Abbildung 4 ist auch ersichtlich, dass die Genotyp-2-BVD-Viren den ESP-Viren im untersuchten Abschnitt des Genoms ähnlicher sind als den Genotyp-1-BVD-Viren.

## Ausblick

Die in diesem Artikel dargestellten Beispiele zeigen nur ein kleines Spektrum der bereits heute möglichen Anwendungen der PCR. Wesentlich ist, dass diese Technik nicht nur den Nachweis von Viren ermöglicht, sondern faszinierende Einblicke in deren Eigenleben ermöglicht (sofern man den definitionsgemäss leblosen Viren ein solches zubilligen will). Eine in Zukunft wichtige analytische Anwendung der PCR besteht darin, mittels PCR und Sequenzvergleichen die Evolution und molekulare Epidemiologie sowie Virulenzmarker der Viren zu untersuchen. Der erste Bereich zeigt gewissermassen die Kehrseite der antiviralen Immunantwort, indem die auf das Virus wirkenden Einflüsse an den Veränderungen der Nukleotidsequenz über die Zeit und innerhalb einer Infektionskette sichtbar werden. Das Auffinden von Virulenzmarkern wird erleichtert durch die Kenntnis der Heterogenität der Viren. Mittels PCR und automatisierter Sequenzierung stehen in kurzer Zeit Informationen über Viren aus Tieren mit verschiedenen klinischen Verlaufsformen zur Verfügung, welche einen Vergleich erst sinnvoll machen.

## Literatur

- Bolin S. R., McClurkin A. W., Cutlip R. C., Coria M. F. (1985): Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 46, 573-576.
- Brownlie J., Clarke M. C., Howard C. J. (1984): Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 2, 535-536.
- Corapi W. V., French T. W., Dubovi E. J. (1989): Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 63, 3934-3943.
- Corapi W. V., Donis R. O., Dubovi E. J. (1990): Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1388-1394.

- Dubovi E. J. (1992): Genetic diversity and BVD virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 155-162.
- Hertig C., Pauli U., Zanoni R., Peterbans E. (1991): Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 26, 65-76.
- Hertig C., Stalder H., Peterbans E. (1995): Genetic heterogeneity within the coding regions of E2 and NS3 in strains of bovine viral diarrhoea virus. *Gene* 153, 191-195.
- Hofmann M. A., Brechtbühl K., Stauber N. (1994): Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch. Virol.* 139, 217-229.
- Meyer G., Tautz N., Dubovi E. J., Thiel H. J. (1991): Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* 180, 602-616.
- Moennig V. (1990): Pestiviruses - A Review. *Vet. Microbiol.* 23, 35-54.
- Pellerin C., van den Hurk J., Lecomte J., Tussen P. (1994): Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.
- Perdrizet J. A., Rebbun W. C., Dubovi E. J., Donis R. O. (1987): Bovine viral diarrhoea clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Veterinarian* 77, 46-74.
- Rebbun W. C., French T. W., Perdrizet J. A., Dubovi E. J., Dill S. G., Karcher L. F. (1989): Thrombocytopenia associated with acute bovine viral diarrhoea infection in cattle. *J. Vet. Int. Med.* 3, 42-46.
- Ridpath J. F., Bolin S. R., Dubovi E. J. (1994): Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205, 66-74.
- Tamura J. K., Warrenner P., Collett M. S. (1993): RNA stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 193, 1-10.
- Weiss M., Hertig C., Strasser M., Vogt H. R., Peterbans E. (1994): Bovine viral diarrhoea mucosal disease - A Review. *Schw. Arch. Tierheilk.* 136, 173-185.
- Wirz B., Tratschin J. D., Müller H. K., Mitchell D. B. (1993): Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1148-1154.
- Wiskerchen M., Belzer S. K., Collett M. S. (1991): Pestivirus gene expression: The first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* 65, 4508-4514.

## Dank

Wir danken Dr. Reto Zanoni für die Durchsicht des Manuskripts. Die Arbeiten wurden unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds und das Bundesamt für Veterinärwesen.

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Ernst Peterbans, Institut für Veterinär-Virologie, Länggassstrasse 122, CH-3012 Bern