

Aus der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung

Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer,

Prof. Dr. W. Klee

im Zentrum für Klinische Tiermedizin der tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Büttner

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

# **Humorale und zelluläre Immunreaktionen nach der Impfung gegen BTV-8 bei Schafen und Rindern in ausgewählten Betrieben in Bayern**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Alexandra Hund

aus Riedhausen

München 2010

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. W. Klee

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Werckenthin

Tag der Promotion: 24.Juli 2010

Meinen Eltern



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
1. Erregercharakteristika.....	3
1.1. Aufbau des Virus .....	3
1.2. Antigene Eigenschaften des Virus .....	3
2. Bluetongue in Europa .....	5
2.1. Bluetongue in Deutschland .....	6
3. Impfung gegen BTV.....	7
3.1. Impfstoffe gegen verschiedene Serotypen von BTV .....	7
3.1.1. Impfstofftypen .....	7
3.1.2. Impfkampagnen .....	8
3.1.3. Impfung in Deutschland .....	9
4. Immunreaktionen .....	10
4.1. Immunreaktionen nach natürlichen BTV-Infektionen.....	10
4.2. Immunreaktionen nach der Impfung gegen BTV .....	11
5. Möglichkeiten der BTV-Diagnostik.....	13
5.1. Serologische Diagnostik.....	13
5.2. Nachweis der zellulären Immunantwort.....	15
5.3. Virologische Diagnostik .....	17
<b>III. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
1. Material .....	20
1.1. Herkunft der Tiere .....	20
1.2. Fragebogen.....	22
1.3. Probenentnahme und Aufbereitung .....	22
1.4. Impfstoffe .....	23
1.5. Viren .....	25
1.6. Zellen .....	25
1.7. Antikörper, Enzym und Mitogene für ELISPOT .....	26
1.8. Chemikalien .....	26
1.9. Reagenzien .....	27
1.9.1. cELISA .....	27
1.9.2. Serumneutralisationstest.....	28
1.9.3. Interferon-gamma ELISPOT .....	28
1.10. Reverse Transkriptions real time Polymerasekettenreaktion .....	29
1.11. Kits .....	33
1.12. Verbrauchsmaterialien .....	33

1.13. Geräte .....	34
1.14. Computerprogramme .....	36
2. Methoden .....	36
2.1. Antikörper-ELISA.....	36
2.2. Serumneutralisationstest .....	38
2.3. IFN- $\gamma$ ELISPOT .....	40
2.4. Reverse Transkriptions real time Polymerasekettenreaktion.....	44
2.5. Statistik.....	47
2.6. Ermittlung der Herdenprävalenz von BTV-8 .....	47
2.7. Maßnahmen zur Impfwirksamkeitskontrolle .....	48
2.7.1. Untersuchungen zur Antikörperentwicklung (ELISA) .....	48
2.7.2. Proben zur Bestimmung neutralisierender Antikörper .....	53
2.7.3. Untersuchungen zur BTV Serotyp Kreuzneutralisation .....	54
2.7.4. Bestimmung der IFN- $\gamma$ Sekretion .....	55
2.8. Untersuchungen zur Wirkung fehlerhafter Impfstoffapplikation .....	55
2.9. Wiederholte Applikation des Impfstoffes bei Schafen.....	57
2.9.1. Antikörperbestimmung .....	58
2.9.2. Bestimmung der zellulären Immunreaktion .....	59
2.10. Untersuchung der Immunreaktionen bei natürlich infizierten Rindern . .....	59
<b>IV. Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
1. Fragebogen.....	61
1.1. Zukäufe und Abgänge .....	61
1.2. Symptome .....	61
2. Herdenprävalenz von BTV-8.....	62
3. Impfwirksamkeitskontrolle .....	62
3.1. Antikörperentwicklung (ELISA).....	62
3.1.1. Antikörpertiter von Schafen und Rindern nach der Grundimmunisierung .....	63
3.1.2. Antikörperentwicklung bei Rindern im zweiten Jahr der Impfung	64
3.1.3. Antikörperentwicklung bei Schafen im zweiten Jahr der Impfung	66
3.2. Entwicklung der neutralisierenden Antikörper .....	67
3.2.1. Neutralisierende Antikörper bei Rindern und Schafen nach der Grundimmunisierung .....	67
3.2.2. Neutralisierende Antikörper bei Rindern im zweiten Jahr der Impfung .....	68
3.2.3. Neutralisierende Antikörper bei Schafen im zweiten Jahr der Impfung .....	72
3.3. Zelluläre Immunreaktion .....	73
4. Unschädlichkeit und Wirkung fehlerhafter Impfstoffapplikation .....	78

4.1.	Intramuskuläre und intravenöse Impfstoffapplikation bei Schafen	78
4.2.	Subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation bei Schafen	78
4.3.	Applikation einer erhöhten Impfstoffdosis bei Rindern .....	80
5.	Auswirkung einer Wiederholung der Impfstoffapplikation bei Schafen .....	83
5.1.	Antikörperentwicklung (ELISA).....	83
5.2.	Neutralisierende Antikörper.....	84
5.2.1.	Kreuzneutralisation .....	87
5.3.	Zelluläre Immunreaktion.....	88
6.	Immunreaktionen bei natürlich infizierten Rindern .....	91
6.1.	Antikörper-ELISA .....	91
6.2.	Neutralisierende Antikörper.....	92
6.3.	Zelluläre Immunreaktion.....	95
<b>V.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>98</b>
1.	Fragebogen .....	98
2.	Herdenprävalenz .....	98
3.	Impfwirksamkeitskontrolle.....	99
3.1.	Antikörperentwicklung .....	99
3.2.	Nachweis neutralisierender Antikörper.....	102
3.3.	Nachweis der IFN- $\gamma$ Sekretion.....	104
4.	Unschädlichkeit und Wirkung fehlerhafter Impfstoffapplikation.....	107
4.1.	Intramuskuläre und intravenöse Impfstoffapplikation beim Schaf .	107
4.2.	Subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation.....	108
4.3.	Applikation einer erhöhten Impfstoffdosis beim Rind .....	108
5.	Auswirkungen der Wiederholung der subkutanen Applikation des Impfstoffes bei Schafen .....	109
5.1.	Antikörperentwicklung .....	109
5.2.	Zelluläre Immunreaktionen.....	110
6.	Untersuchung der Immunreaktionen von natürlich infizierten Rindern....	112
6.1.	Antikörpertiter im ELISA .....	112
6.2.	Nachweis neutralisierender Antikörper.....	113
6.3.	Zelluläre Immunreaktion.....	114
<b>VI.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>116</b>
<b>VII.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>120</b>
<b>VIII.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>IX.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>135</b>
1.	Material und Methoden .....	135
1.1.	Fragebogen.....	135
2.	Ergebnisse.....	140

2.1.	Ergebnisse der Auswertung der Fragebögen .....	140
2.2.	Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Schafe mit i.v. und i.m. Applikation des Impfstoffes.....	140
3.	Tabellenverzeichnis .....	145
4.	Abbildungsverzeichnis .....	149
<b>X.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>152</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
BHQ-1	<i>BlackHole Dark Quencher</i>
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BT	<i>Bluetongue Disease</i> (Blauzungkrankheit)
BTV	<i>Bluetongue Virus</i>
BTV-1	<i>Bluetongue Virus</i> Serotyp 1
BTV-16	<i>Bluetongue Virus</i> Serotyp 16
BTV-4	<i>Bluetongue Virus</i> Serotyp 4
BTV-8	<i>Bluetongue Virus</i> Serotyp 8
C	Cytosin
c <sub>q</sub>	Quantification cycle
cELISA	Kompetitiver ELISA
sELISA	Sandwich ELISA
ConA	Concanavalin A
cpe	<i>Cytopathic effect</i> (zytopathischer Effekt)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIVA	<i>Differentiating infected from vaccinated animals</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme linked immuno spot technique</i>
ELP	Erythrozytenlysispuffer
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EU	Europäische Union
Fam	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fetales bovines Serum
G	Guanin
Hex	Hexa-chloro-6-carboxyfluorescein
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma

KID <sub>50</sub>	Kulturinfektiöse Dosis 50
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LM	Leukozytenmedium
Med <sub>ges</sub>	Mittelwert der Mediane der untersuchten Betriebe
MLV	<i>Modified Live Virus</i> (attenuierter Lebendimpfstoff)
MM	Magermilch
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
nn	Nicht nachweisbar
nu	Nicht untersucht
OD	Optische Dichte
OD corr	Korrigierte optische Dichte
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Mononukleäre Leukozyten aus dem Blut)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBS <sub>0</sub>	<i>Phosphat Buffered Saline</i> , ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
QS	Qualitätssicherung
R	Wobble, steht für Adenin und Guanin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium für Leukozyten)
RT-qPCR	Reverse Transkriptions real time Polymerasekettenreaktion
s.c.	Subkutan
S-HRP	Streptavidin-Horseradishperoxidase
SNT	Serumneutralisationstest
T	Thymidin
Tamra	N, N, N', N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin
TE	Tris/EDTA
tPBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> , mit Tween
U/Min	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
Y	Wobble, steht für C und T
ZAM	Zellanzuchtmedium
ZEM	Zellerhaltungsmedium

## **I. EINLEITUNG**

Seit den Ausbrüchen der Blauzungenkrankheit (BT), verursacht durch den Serotyp 8 im Jahr 2006, spielt die Krankheit auch in Deutschland eine Rolle. Der Weg der Einschleppung dieses Serotyps, der vorher in der Europäischen Union (EU) nicht vorgekommen war, ist unklar. Mit dem Persistieren des Virus und der Weiterverbreitung im Jahr 2007 wurde auch das Bundesland Bayern von der Krankheit erreicht.

Ein wichtiges Merkmal dieser Epidemie durch BTV-8 sind die deutlichen klinischen Veränderungen nicht nur bei Schafen sondern auch bei Rindern. Die wirtschaftlichen Folgen der BT Epidemie sind immens. Sie resultieren einerseits aus der Krankheit selbst, dem damit verbundenen Verlust von Tieren, aber auch den Behandlungskosten und der Reduktion der Fruchtbarkeit und Milchleistung. Andererseits werden Bekämpfungsmaßnahmen wie Handelsbeschränkungen für Tiere oder Impfungen notwendig.

Die Impfung empfänglicher Tiere ist die Methode der Wahl zur Kontrolle von BT. In nicht endemisch verseuchten Gebieten sind inaktivierte Impfstoffe attenuierten Lebendimpfstoffen (MLV) aus Gründen der Sicherheit vorzuziehen. Da die 2008 verfügbaren inaktivierten Impfstoffe noch nicht zugelassen waren, wurde zunächst eine Studie zur Sicherheit der verwendeten Impfstoffe durchgeführt, bevor eine befristete Ausnahme von der Zulassung erteilt und deutschlandweit die obligatorische Impfung aller Wiederkäuer durchgeführt wurde. Diese Studie war limitiert auf Tiere aus einigen wenigen Betrieben, schloss jedoch die Belastungsinfektion unter Hochsicherheitsbedingungen mit ein, was die Schutzwirkung der Impfung beweisen konnte (Eschbaumer et al. 2009a). Mit den hier vorgestellten Untersuchungen sollte praxisnah und verteilt über das Bundesland Bayern kurz vor und während der laufenden Impfkampagne in ausgewählten Betrieben die Wirkung der Impfung immunologisch und diagnostisch geprüft werden.

Folgende Ziele wurden mit der vorliegenden Studie verfolgt:

1. Bestimmung der Herdenprävalenz von BTV-8 in ausgewählten bayerischen Rinder- und Schafbetrieben, sowie Mischbetrieben (Rind und Schaf)

2. Untersuchung der Wirkung ausgewählter Impfstoffe, welche in den Jahren 2008 und 2009 bei Rindern und Schafen in Bayern zum Einsatz kamen hinsichtlich
  - der Antikörperentwicklung (ELISA-Nachweis)
  - der Bildung neutralisierender Antikörper gegen BTV-8
  - der Bildung neutralisierender Antikörper gegen BTV-1, -2, -4 und -16 (Kreuzneutralisation)
  - der Fähigkeit zur Induktion zellulärer Immunreaktionen, messbar an Hand der Interferon-gamma Sekretion bei *in vitro* Restimulation von peripheren mononukleären Blutzellen mit BTV-8 und BTV-1
  
3. Untersuchung der Unschädlichkeit und des Effektes von BTV-8 Impfstoff
  - nach intramuskulärer und intravenöser Applikation hinsichtlich Nachweisbarkeit im Schaf und Nebenwirkungen
  - nach intramuskulärer und subkutaner Applikation bei Schafen
  - nach Applikation einer erhöhten Dosis bei Rindern
  
4. Untersuchung der Wirkung der Wiederholung der Impfung bei Schafen
  - auf die ELISA-Serum-Ak-Entwicklung
  - auf die Bildung neutralisierender Antikörper gegen BTV-8
  - hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) Sekretion bei *in vitro* Restimulation von peripheren mononukleären Blutzellen mit BTV-8 und BTV-1
  
5. Untersuchung der Immunreaktionen von natürlich infizierten Rindern repräsentiert durch folgende Parameter:
  - Antikörpertiter im ELISA
  - neutralisierende Ak im SNT
  - IFN- $\gamma$  Sekretion bei *in vitro* Restimulation von peripheren mononukleären Blutzellen mit BTV-8 und BTV-1

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Erregercharakteristika**

Die Blauzungenkrankeheit (BT) ist eine nicht direkt von Wirt zu Wirt übertragbare Infektionskrankheit bei Wiederkäuern. Verursacht wird sie von einem durch Arthropoden übertragbaren Virus aus der Familie der Reoviridae, Genus Orbivirus. Das Bluetongue Virus (BTV) schließt neben 24 seit längerem bekannten auch einen mutmaßlich neuen Serotyp, das Toggenburg Orbivirus, ein (Hofmann et al. 2008).

BT hat das Potential für eine schnelle Ausbreitung sowie ernsthafte ökonomische Folgen und wird somit vom Office International des Epizooties (OIE) als meldepflichtige Tierseuche geführt.

#### **1.1. Aufbau des Virus**

Das BTV enthält 10 Segmente doppelsträngiger RNA (dsRNA), die sieben Struktur- und vier Nichtstrukturproteine kodieren (Roy 2008). Die Strukturproteine werden ihrer abnehmenden Größe nach als VP1 bis VP7 bezeichnet und die Nichtstrukturproteine als NS1, NS2, NS3 und NSA3 (Roy 1992). Die innerste Hülle ist ikosaedrisch geformt und besteht aus VP3. Sie enthält die drei Strukturproteine VP1, VP4, VP6 und die dsRNA (Huismans und Van Dijk 1990). Umgeben wird sie von VP7. Die äußere Hülle des BTV-Virions besteht aus VP5 und VP2.

#### **1.2. Antigene Eigenschaften des Virus**

Das Strukturprotein VP7 ist spezifisch für die Serogruppe. VP2 ist das am wenigsten konservierte Protein und ist verantwortlich für die Adsorption an und das Eindringen in Wirtszellen, Hämagglutination und Neutralisation. VP2 bestimmt maßgeblich den Serotyp von BTV (Huismans und Erasmus 1981; Kahlon et al. 1983). Eine Neutralisation des Virus ist durch Antikörper gegen VP2 möglich (DeMaula et al. 1993).

Es gibt Arbeiten, die darauf hindeuten, dass VP5 ebenfalls eine Rolle bei der Neutralisation von BTV spielt (Mertens et al. 1989; Lobato et al. 1997). Die isolierten Proteine VP2 und VP5 vom Serotyp BTV-10 können in Kombination verabreicht bei Schafen die höchsten neutralisierenden Antikörpertiter im Plaquereduktionsneutralisationstest hervorrufen. Andere Strukturproteine haben keinen Einfluss auf die Bildung neutralisierender Antikörper (Roy et al. 1990).

Das BTV bindet durch das Strukturprotein VP2 an die Zellmembran von Blutzellen und wird rasch durch Endozytose in Vesikel aufgenommen. Anders als in kernhaltigen Zellen gelangt das Virus in Erythrozyten nicht ins Zytoplasma und wird repliziert, sondern bleibt in den Vesikeln. Antikörper können in diese nicht eindringen und so ist es möglich, dass durch die Persistenz in Erythrozyten Virusgenom trotz der Anwesenheit hoher Antikörpertiter lange Zeit im Blut nachweisbar bleibt (Whetter et al. 1989; Brewer und MacLachlan 1992; Brewer und MacLachlan 1994).

Bei Kälbern, die auf natürlichem Weg mit BTV infiziert waren, war bis 160 Tage nach dem vermuteten Zeitpunkt der Infektion mit BTV-11 und -17 noch BTV-Genom, allerdings schon 100 Tage nach der Infektion kein infektiöses Virus mehr nachweisbar. Bei experimentell infizierten Schafen war BTV-Genom mindestens bis zum 89. Tag nach der Inokulation nachweisbar, infektiöses Virus aber schon am 50. Tag nicht mehr. Es ist unklar, ob das Virus seine Infektiosität durch die Übertragung durch den Vektor wiedererlangen könnte (Katz et al. 1994).

Andere Autoren konnten bei Schafen 42 Tage und bei Rindern bis 56 Tage nach der Infektion aus dem Blut Zellkultur-infektiöses Virus gewinnen (Richards et al. 1988).

Das BT Virus weist mit 24 Serotypen und unterschiedlichen Stämmen innerhalb der Serotypen eine beträchtliche genetische Variabilität auf. Dies erklärt sich durch die Fehleranfälligkeit der RNA-Polymerase, die Gendrifts verursacht, und die Möglichkeit des Reassortments der RNA Segmente. Des Weiteren wurde ein „Gründereffekt“ durch Vektoren festgestellt, die BTV Quasispezies aus dem Blut der Wirte aufnehmen und verbreiten: Eine einzigartige Variante aus der heterogenen Population eng verwandter Varianten, die durch ein oder mehrere dominante Genomsequenzen charakterisiert sind (Quasispezies), wird zufällig von

einer *Culicoides*-Mücke aus einem Wirt, der nur schwach virämisch ist, aufgenommen. Somit wird ein neuer Genotyp geschaffen (Gründereffekt) (Bonneau et al. 2001).

## 2. Bluetongue in Europa

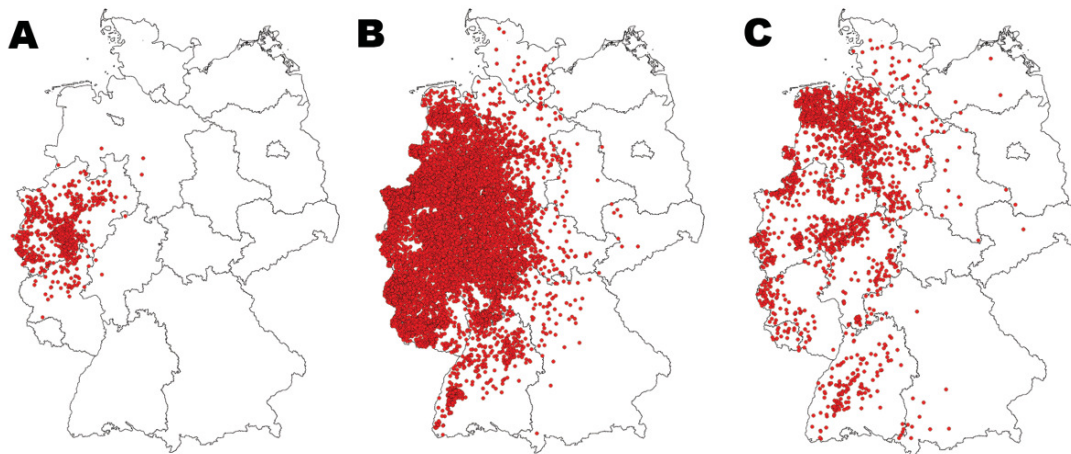
Die Vektoren der Blauzungkrankheit, die Mücken der Spezies *Culicoides imicola*, kommen normalerweise ausschließlich in den Tropen und gemäßigten Klimazonen vor. Daher war die Blauzungkrankheit lange Zeit auf diese Gebiete beschränkt. Vermutlich durch den Eintrag von infizierten Vektoren durch Wind und begünstigt durch die Klimaerwärmung gab es aber in einigen südlichen Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU) seit 1998 Epidemien der Blauzungkrankheit mit den Serotypen BTV-1, 2, 4, 9 und 16 (Mellor und Wittmann 2002). Nördlich der Alpen wurde der Serotyp 8 erstmals im August 2006 fast zeitgleich in den Niederlanden, Belgien, Deutschland und Frankreich nachgewiesen (Toussaint et al. 2007b; Hoffmann 2008). Auch in Großbritannien, Dänemark, der Schweiz und der Tschechischen Republik gab es 2007 erste Ausbrüche (Saegerman et al. 2008). Der Weg der Einschleppung dieses Serotyps, der vorher in der Europäischen Union (EU) nicht vorgekommen war, ist unklar (Mintiens et al. 2008).

Seit 2006 hat sich ein algerischer BTV-1 Stamm nach Norden über die Iberische Halbinsel und Frankreich ausgebreitet. Die weitere Verbreitung nach Deutschland und in die Beneluxstaaten scheint bevorzugen zu werden (Hateley 2009).

Im Jahr 2008 gab es Ausbrüche von BTV-6 in den Niederlanden und angrenzenden Regionen in Niedersachsen. BTV-11 wurde im selben Jahr bei Rindern in 14 Betrieben in Belgien entdeckt. Sowohl der BTV-6 als auch der BTV-11 Stamm haben große genetische Ähnlichkeit mit südafrikanischen attenuierten Lebendimpfstoffen (MLV). Daher werden die illegale Impfung von Tieren mit diesen Impfstoffen oder der Import solcher und die Weiterverbreitung des Impfvirus durch Vektoren als Ursache der Ausbrüche vermutet. Die Einfuhr von infizierten Vektoren oder Wirtstieren stellt eine weitere Möglichkeit der Einschleppung dar (De Clercq et al. 2009; Eschbaumer et al. 2009b).

## 2.1. Bluetongue in Deutschland

In Deutschland wurde im Jahr 2006 in 885 Betrieben BTV-8 nachgewiesen (Abb. II.1). Entgegen aller Hoffnungen, das Virus könne einen mitteleuropäischen Winter nicht überstehen (Gibbs und Greiner 1994), traten im darauf folgenden Jahr neue Fälle auf (Wilson et al. 2008). Im ersten Halbjahr 2007 waren 76 Betriebe betroffen, wobei sich die Infektionen hier vermutlich größtenteils im Vorjahr ereigneten und aufgrund der langen Nachweisbarkeit von BTV-Genom in der PCR erst 2007 festgestellt wurden (Katz et al. 1994). Im zweiten Halbjahr 2007 stieg die Zahl auf 20623 Betriebe an. Die Zahl der infizierten Tiere in diesen Betrieben lag bei 26772 Rindern und 32116 Schafen (Conraths et al. 2009).



**Abb. II.1:** Ausbrüche der Blauzungenkrankheit bei allen betroffenen Spezies in Deutschland (Conraths et al. 2009)

A: 2006, B: 2007, C: 2008 bis 31. August

rote Punkte: Ausbruch in einem Betrieb oder Einzelfall

Im Jahr 2008 wurden in Deutschland insgesamt 5125 Ausbrüche registriert, davon 3056 Neuausbrüche. Im Jahr 2009 waren noch insgesamt 142 Betriebe betroffen (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2006; Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2007; Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2008; Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2009).

Während die Mortalität in Deutschland in beiden Jahren relativ gering blieb, war die Letalität bei Schafen sowohl 2006 als auch 2007 deutlich höher als bei Rindern (2006 37.5 % bzw. 6.4 %, 2007 41.5 % bzw 13.1 %). Es muss jedoch betont



werden, dass bei dieser Epidemie zahlreiche klinische Fälle von Blauzungenkrankheit bei Rindern auftraten, während an anderen Serotypen hauptsächlich Schafe erkrankten (Thiry et al. 2006; Conraths et al. 2009).

Als wichtigster Vektor für diesen Seuchenausbruch in Deutschland konnte *Culicoides obsoletus* identifiziert werden (Mehlhorn et al. 2007; Clausen et al. 2009).

Neben dem Vektor sind auch der Wirt und die Virulenz des Virus wichtige Faktoren für die Epidemiologie der Blauzungenkrankheit. So sind z.B. alle Schafrassen für BTV empfänglich, aber in unterschiedlichem Maße. Rassen, die in endemischen Gebieten nicht vorkommen und dorthin importiert werden, oder Schafe am Rand eines enzootischen Gebietes erkranken schwerwiegender (Ward 1994; MacLachlan et al. 2008).

### **3. Impfung gegen BTV**

Impfkampagnen gegen die Blauzungenkrankheit sollen mehrere Zwecke erfüllen. Hauptsächlich geht es um das Verhindern einer klinischen Erkrankung beim Individuum. Durch das Ausbleiben der Virämie wird auch die Verbreitung des Virus verhindert und die Sicherheit beim Verbringen von empfänglichen Tieren in und aus endemischen Gebieten gewährleistet (Savini et al. 2008).

Der ideale Impfstoff gegen BTV würde nach einmaliger Anwendung gegen möglichst viele Serotypen schützen, könnte seine Virulenz nicht zurückerlangen und nicht mit zirkulierenden Stämmen rekombinieren. Außerdem würde das Impfvirus nicht in den Vektoren replizieren und wäre von einer natürlichen Infektion zu unterscheiden (DIVA) (Roy et al. 2009).

#### **3.1. Impfstoffe gegen verschiedene Serotypen von BTV**

##### **3.1.1. Impfstofftypen**

Ein Schutz vor Viruserkrankungen kann durch attenuierte Lebendimpfstoffe (modified live vaccines, MLV), inaktivierte Viren oder virale Fragmente gewährleistet werden. Letztere werden entweder aus infektiösem Material isoliert

(Subunit-Impfstoffe) oder mittels gentechnischer Methoden produziert, indem kodierende Virusgene in Bakterien, Hefen, andere Zellen oder Viren eingeschleust werden. Träger, die z.B. BT-Virusprotein herstellen, sogenannte Vektoren, nennt man rekombinante Impfstoffe (Roy et al. 1990). Speziell mit BTV ist es auch gelungen, so genannte leere Partikel (empty particles) herzustellen, die keine genetische Information mehr enthalten, also nicht infektiös sind, aber sonst alle Partikelproteine besitzen. Das wären ideale Impfantigene. Sie sind aber nicht in ausreichendem Maßstab herstellbar (French und Roy 1990).

MLV Impfstoffe sind günstig in großen Mengen herzustellen und gewährleisten eine gute Immunantwort nach einmaliger Applikation, da sie im geimpften Tier begrenzt replizieren können. Dadurch ist es aber möglich, dass das Impfvirus durch den Vektor weiterverbreitet wird, seine Virulenz wiedererlangt und sich eventuell mit einem Feldvirus reassortiert. Außerdem sind nach Impfungen mit MLV Impfstoffen Fieber, Aborte, Rückgang der Milchproduktion und Verminderung der Spermaqualität bei Schafen und Rindern festgestellt worden (Savini et al. 2008).

Inaktivierte Impfstoffe sind weniger effektiv als MLV und erfordern in der Regel ein Adjuvans (Eschbaumer et al. 2009a). Ihr Nachteil besteht in den hohen Produktionskosten, da große Mengen an Antigen benötigt werden. Außerdem erfordern sie mehrere Immunisierungen, da sie nur eine transiente Immunität induzieren (Savini et al. 2008).

Rekombinante Impfstoffe wurden mehrfach experimentell beschrieben. Sie bieten eine hohe Sicherheit, da sie nicht übertragbar sind. Außerdem sind sie leicht als polyvalente Impfstoffe einzusetzen und bieten rasch eintretenden Schutz. Sie ermöglichen die Unterscheidung geimpfter von natürlich infizierten Tieren (DIVA). Allerdings erfordern sie noch weitere Entwicklung, bevor sie im großen Stil im Feld eingesetzt werden können (Roy et al. 2009).

### **3.1.2. Impfkampagnen**

MLV Impfstoffe wurden in Europa gegen BTV-2, -4, -9 und -16 eingesetzt. Sie wurden für diesen Zweck mit Sondergenehmigung aus Südafrika importiert.

Der erste inaktivierte Impfstoff, der in Europa angewendet wurde, war der Impfstoff gegen BTV-2 im Jahr 2005. Monovalente BTV-4 und bivalente BTV-2 und -4 Impfstoffe wurden entwickelt und in Korsika, Spanien, Portugal und Italien angewendet (Savini et al. 2008). Sie erwiesen sich als sicher und effektiv durch Prävention von Krankheitssymptomen und Virämie bei Belastungsinfektion von Rindern (Savini 2009). Auch ein inaktiverter Impfstoff gegen BTV-16 wurde mit demselben Resultat an Schafen getestet (Savini et al. 2007).

### **3.1.3. Impfung in Deutschland**

Laut Verordnung zur Durchführung gemeinschaftlicher Vorschriften über Maßnahmen zur Bekämpfung, Überwachung und Beobachtung der Blauzungenkrankheit (EG–Blauzungenbekämpfungs-Durchführungsverordnung) dürfen „empfindliche Tiere [...] gegen Blauzungenkrankheit des Serotyps 8 nur mit inaktivierten Impfstoffen, bei deren Herstellung Virusstämme des Serotyps 8 verwendet worden sind, geimpft werden. Wer Rinder, Schafe oder Ziegen hält, hat die Rinder, Schafe und Ziegen seines Bestandes [...] impfen zu lassen“.

„[...] Die nachfolgend aufgeführten Impfstoffe [...] bedürfen keiner Zulassung für das Inverkehrbringen und das Anwenden:

1. BTVPUR AISap 8 der Firma Merial
2. Zulvac 8 der Firma Fort Dodge
3. BLUEVAC-8 der Firma CZ Veterinaria
4. Bovilis BTV 8 der Firma Intervet.“

(Verordnung über bestimmte Impfstoffe zum Schutz vor der Blauzungenkrankheit; BlauzungenImpfStV)

Impfstoff-Zulassungsverfahren auf EU-Ebene sind langwierige Unterfangen und erfordern eine ganze Reihe von Schritten (Schwanig 2002). Deshalb sind solche Ausnahmen von der Zulassung nötig, wenn Notsituationen angesichts neuer Infektionskrankheiten entstehen. Eine neue Infektionskrankheit ist eine Krankheit, deren Inzidenz in einer bestimmten Population während einer bestimmten Zeit signifikant steigt im Vergleich zur üblichen epidemiologischen Situation dieser

Infektionskrankheit (Saegerman et al. 2007). Die Möglichkeit der Ausnahme von der Zulassung ist in Artikel 8 der EU-Richtlinie 2001/82/EC festgehalten.

Der Impfstoff BTVPUR AISap 8 der Firma Merial ist seit März 2009 EU-weit zugelassen (EMA 2009).

Durch die Immunität konvaleszenter Tiere gegen eine Reinfektion und die Durchführung der Impfung ging die Zahl der BTV-Ausbrüche in Deutschland 2008 erheblich zurück (Conraths et al. 2009).

## **4. Immunreaktionen**

### **4.1. Immunreaktionen nach natürlichen BTV-Infektionen**

Sowohl humorale als auch zelluläre Mechanismen tragen abhängig vom infektiösen Agens in unterschiedlichem Maße zur Immunität bei (Onions 1983).

Antikörper spielen bei BTV eine wichtige Rolle beim Schutz vor Reinfektionen, indem sie das Virus noch vor der ersten Replikation neutralisieren. Dies konnte durch Transfer von Immuneserum auf naive Schafe (passive Immunisierung) und anschließende experimentelle Infektion mit BTV belegt werden (Jeggo et al. 1984a). Die Qualität des Schutzes durch neutralisierende Antikörper vor homologer Belastungsinfektion variiert je nach Experiment. Dies liegt meist an der Art, wie Protektion gemessen wurde. Statt der durch viele Faktoren beeinflussbaren klinischen Reaktion sollte Entwicklung, Titer und Dauer der Virämie als Maßstab gelten (Stott et al. 1985). Die Korrelation zwischen Titern der neutralisierenden Antikörper und Protektion bei Belastungsinfektion mit dem homologen Serotyp gemessen an der Virämie ist gut (Luedke und Jochim 1968; Lobato et al. 1997) bis nicht vorhanden (Jeggo et al. 1984b). Obwohl also ein Serotyp-spezifischer Schutz durch Antikörper nachgewiesen wurde, korreliert dieser nicht unbedingt mit der Menge an neutralisierenden Antikörpern (Jeggo 1985).

Generell kommt es kaum zu Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern gegen einen Serotyp mit anderen Serotypen von BTV. Dennoch könnte dies bei eng verwandten Serotypen vorkommen (Roy et al. 1994).

Schafe, die mit BTV-5 infiziert worden waren, entwickelten einen maximalen Titer an neutralisierenden Antikörpern von 1:120 am fünfzehnten Tag nach der Infektion. Es konnte im Agargelimmunodiffusionstest (AGID) keine Kreuzreaktion mit anderen Serotypen festgestellt werden. Dasselbe gilt für die experimentelle Infektion mit BTV-2, -3 und -4. Jedoch waren Schafe, die nacheinander mit BTV-3 und -4 infiziert worden waren, gegen eine Infektion mit BTV-6 geschützt. Hierbei war jedoch nicht klar, ob dies ausschließlich auf neutralisierende Antikörper oder auch auf eine zelluläre Immunantwort zurückzuführen war (Jeggo et al. 1986).

Nach einer Infektion mit BTV konnten zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen werden, die nicht Serotyp-spezifisch waren. Dies gelang in Mäusen (Jeggo und Wardley 1982a) und in Schafen (Takamatsu und Jeggo 1989).

T-Lymphozyten, die zwei Wochen nach der Infektion mit BTV-3 von Schafen gewonnen wurden, konnten bei deren naiven Zwillingen Fieber und Virämie nach einer Infektion mit dem homologen Serotyp reduzieren. Virusspezifische T-Lymphozyten spielen also ebenfalls eine wichtige Rolle beim Schutz gegen BTV (Jeggo et al. 1984a).

#### **4.2. Immunreaktionen nach der Impfung gegen BTV**

Bei inaktivierten Impfstoffen gegen BTV ist die Zugabe von Adjuvans entscheidend für die Entwicklung einer Immunantwort und ihrer Schutzwirkung gegen eine Infektion (Stott et al. 1985).

Bei einmalig mit Bovilis BTV-8 geimpften Schafen wurde am Tag 14 nach der Impfung mit dem sensitivsten ELISA bei 90 % der Tiere eine Serokonversion festgestellt. 24 Tage nach einer zweiten Impfung, die vier Monate nach der ersten erfolgte, zeigten alle verwendeten ELISA Testkits eine Serokonversion an. Von 20 geimpften Schafen hatten 16 nach der ersten Impfung Antikörpertiter im SNT zwischen 1 und 1,9 ( $\log_{10}$ ). Nach der zweiten Impfung hatten alle Schafe neutralisierende Antikörper mit signifikant höheren Titern als nach der ersten Impfung. Die Studie ergab des Weiteren, dass einmalig mit Bovilis BTV-8 geimpfte Schafe 10 Monate nach der Impfung noch vor klinischen Symptomen und Virämie bei einer Belastungsinfektion geschützt waren. Es war eine Korrelation zwischen

den Titern der Antikörper bei der Belastungsinfektion (cELISA und SNT) und dem Schutz gegeben (Oura et al. 2009).

In einer Studie, welche die Sicherheit der drei 2008 in Deutschland verwendeten Impfstoffe untersucht hat, wurde der cELISA von VMRD zur Feststellung der Serokonversion verwendet. Mit BLUEVAC-8 und BTVPUR AISap 8 geimpfte Rinder serokonvertierten drei Wochen nach der ersten Impfung zu 39 %, bzw. 64 %. Drei Wochen nach der zweiten Impfung hatten 98,7 % der Rinder unabhängig vom Impfstoff serokonvertiert. Die mit den beiden oben genannten Impfstoffen geimpften Schafe hatten drei Wochen nach der Impfung zu 71 % bis 87 % nachweisbare Antikörper gebildet. Ein weiterer Impfstoff (Zulavac 8 Ovis, Fort Dodge) muss laut Herstellerangaben zwei Mal appliziert werden. Drei Wochen danach hatten 90 bis 100 % der Schafe serokonvertiert (Gethmann et al. 2009). Insgesamt drei Monate nach der ersten und neun Wochen nach der zweiten Impfung waren bei diesen zweimal geimpften Schafen die höchsten Antikörpertiter im ELISA und SNT nachweisbar. Die Antikörpertiter der Schafe, die einmalig mit BLUEVAC-8 geimpft worden waren, hatten die niedrigsten Antikörpertiter von 1:1 im Median im cELISA, 1:4 bis 1:16 im sELISA und <1:2 bis 1:8 im SNT. Nach einer Belastungsinfektion zu diesem Zeitpunkt stiegen die Antikörpertiter bei allen Schafen deutlich an. Auch wenn der cELISA weniger sensitiv als der sELISA war, war der festgestellte Trend der Antikörpertiter doch derselbe. Obwohl der Nutzen von zweifacher Impfstoffapplikation auf die Höhe des Antikörpertiters beim Schaf gezeigt wurde, waren unabhängig vom Impfstoff alle geimpften Schafe nach einer Belastungsinfektion geschützt und entwickelten weder eine Virämie noch klinische BT Symptome (Eschbaumer et al. 2009a). Eine Arbeitsgruppe (Oura et al. 2009) konnte einen und sieben Tage nach der s.c. Impfung von Schafen mit Bovilis BTV-8 mittels Reverse Transkriptase realtime Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) keine RNA des Impfvirus nachweisen. Dies wird durch eine weitere Untersuchung mit dem Impfstoff BTVPUR AISap 8 für die s.c. Applikation des Impfstoffes bestätigt (Eschbaumer et al. 2010). Auch mit unverdünntem Impfstoff konnten aufgrund von enthaltenen PCR-Inhibitoren keine quantification cycle (c<sub>q</sub>) Werte erhoben werden. Jedoch wurden im verdünnten Impfstoff selbst und bei i.v. geimpften Schafen bis zu drei Tage nach der Impfung BTV Genom nachgewiesen. Es wurden eine Pan- und eine BTV-8-RT-qPCR verwendet, wovon erstere mit der in dieser Arbeit verwendeten übereinstimmt. Die

vollständige intravenöse Applikation des Impfstoffes ist unwahrscheinlich, aber in kleinen Dosen nicht auszuschließen. Daher spielt die Nachweisbarkeit von Impfvirus mit der RT-qPCR eine Rolle (Eschbaumer et al. 2010).

## **5. Möglichkeiten der BTV-Diagnostik**

### **5.1. Serologische Diagnostik**

Zum Nachweis von Antikörpern gegen BTV wurden Agargelimmunodiffusion (AGID), Antikörper-ELISA und Komplementbindungsreaktion (OIE), weniger häufig auch Serumneutralisationstest, Hämagglutinationshemmtest, und Plaque-neutralisationstest angewendet (Afshar 1994).

Der AGID ist zwar rasch und einfach anzuwenden, aber wenig sensitiv und wenig spezifisch und lässt keine quantitative Aussage zu. Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen andere Orbiviren sind dokumentiert (Afshar 1994).

Afshar beschreibt in seinem Übersichtsartikel diverse Antikörper-ELISAs, die als Alternative zum AGID Test in den 1980ern entwickelt wurden. Der indirekte ELISA erwies sich als sensitiv aber wenig spezifisch. Ein später entwickelter blocking ELISA war sowohl sehr spezifisch als auch sensitiv. Der gebräuchlichste und auch als kommerzielles Kit erhältliche ELISA war aber der kompetitive ELISA (cELISA), der sich gegenüber den damals bekannten serologischen Methoden als überlegen erwies (Afshar 1994). Nicht nur Sensitivität und Spezifität spielen hierbei eine Rolle, sondern auch rasche Durchführbarkeit, hoher Probendurchsatz und geringe Kosten.

Ein kommerzielles ELISA Kit, welches in dieser Arbeit allerdings nicht verwendet wurde, wurde während der Epidemie 2006 in Belgien parallel zur Anwendung einer RT-qPCR als Goldstandard evaluiert. Es ergab sich eine Sensitivität von 85,05 bei Schafen und von 88,65 bei Rindern. Dieses Ergebnis resultiert wahrscheinlich daraus, dass am Beginn einer BTV-Infektion zwar schon Virusgenom aber erst später Antikörper nachweisbar sind. Die Spezifität lag für Schafe bei 98,46 und für Rinder bei 97,80. Das heißt, es gab keinen signifikanten

Unterschied bei der Effizienz des Testes zwischen den beiden untersuchten Spezies (Vandenbussche et al. 2008).

Das in dieser Arbeit verwendete Testkit der Firma VMRD wurde in Frankreich anhand natürlich mit BTV-2 infizierter und mit einem attenuierten Lebendimpfstoff desselben Serotyps geimpfter Schafe evaluiert. Goldstandard für den Nachweis der Viruspräsenz war wiederum eine RT-qPCR. Mit dem vom Hersteller vorgeschlagenen cut-off von 50 % des Mittelwertes der optischen Dichte (OD) der Negativkontrolle lag die Sensitivität des ELISA 14 Tage nach der Impfung bei 35,7 % und am Tag 28 nach der Impfung bei 100 %. Bis zur dritten Woche nach der Impfung ist die Sensibilität höher bei einem cut-off unter 50 %. Die Spezifität lag knapp unter 100 %. Sensitivität und Spezifität lagen bei der Untersuchung natürlich infizierter Schafe bei 78 % bzw. 85 % (Biteau-Coroller et al. 2006).

Bei einem Ringversuch in 23 Europäischen Referenzlaboren wurde zunächst die Fähigkeit der verwendeten kommerziellen ELISA Kits untersucht, Antikörper gegen alle 24 bekannten Serotypen von BTV festzustellen. Der in dieser Arbeit verwendete VMRD ELISA war dazu in der Lage, während sich andere Kits als weniger zuverlässig erwiesen.

In einem weiteren Ringversuch in 19 Referenzlaboren wurde die Kapazität der dort verwendeten cELISA Kits und PCRs evaluiert, den aktuell zirkulierenden BTV-8 Stamm nachzuweisen. Dazu wurden Blutproben von experimentell infizierten Rindern und Schafen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von den Laboren untersucht. Dabei konnte der VMRD ELISA wie drei weitere Kits beim Schaf sieben und beim Rind neun Tage nach der Infektion erstmals Antikörper nachweisen. Mit einem Kit gelang dies schon am Tag sechs bzw. sieben und mit einem weiteren erst am 21. Tag nach der Infektion (Batten et al. 2008).

Mittlerweile gibt es neue kommerzielle Sandwich ELISA (sELISA) Kits auf dem Markt. Bei einem direkten Vergleich mit drei cELISA Kits konnten die sELISA Kits bei einer größeren Anzahl geimpfter Tiere sieben Tage nach der Impfung Antikörper nachweisen. Das in dieser Arbeit verwendete Testkit von VMRD konnte 14 Tage nach der Impfung bei allen untersuchten Rindern und bei 16 von 17 untersuchten Schafen Antikörper nachweisen. Bei der Untersuchung von



Verdünnungen von Seren geimpfter und feldinfizierter Rinder und Schafe erwiesen sich ebenfalls die sELISA als die sensitivsten und konnten die höchsten Antikörpertiter nachweisen. Der cELISA vom VMRD erwies sich im Vergleich zu den beiden anderen cELISA als weniger sensitiv, dafür spezifischer als das überarbeitete Pourquier Bluetongue Competition Kit, welches zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht verfügbar war (Wäckerlin et al. 2009).

Beim Nachweis von Antikörpern bei Schafen, die mit Bovilis BTV-8 geimpft wurden, konnten die sELISA 7, 14 und 28 Tage nach der Impfung signifikant mehr serokonvertierte Schafe identifizieren als die cELISA, was mit der höheren Sensitivität der ersteren Tests zusammenhängt (Oura et al. 2009).

Der Goldstandard zur Feststellung Serotyp-spezifischer Antikörper ist der SNT. Er weist nicht wie die verwendeten cELISA Kits das in allen Serotypen hoch konservierte Strukturprotein VP7 nach, sondern direkt die Fähigkeit der gebildeten Antikörper, das BT Virus zu neutralisieren und somit die Zellinfektion zu verhindern.

## **5.2. Nachweis der zellulären Immunantwort**

Die Aktivität von T-Zellen kann entweder direkt durch Nachweis von spezifischen Aktivierungsmarkern der Zellen selbst oder indirekt durch den Nachweis von Zytotoxizität oder der Antigen-induzierten Sekretion von Zytokinen gemessen werden.

Ein Test zur Messung der Zytotoxizität von T-Lymphozyten ist der <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest. Mit radioaktivem Chrom markierte Zellen werden mit BTV infiziert und mit PBMC von dem zu untersuchenden Tier inkubiert. Die zytotoxische Aktivität der T-Lymphozyten wird anhand der Radioaktivität im Überstand gemessen (Jeggo und Wardley 1982b).

Limitierende Verdünnungskulturen (*limiting dilution assays*, LDA) werden je nach Versuchsaufbau zum Nachweis von Zytokinen oder Zytotoxizität verwendet. Man testet die Reaktion von T-Zellen auf ein Antigen in Form von Zytokinfreisetzung oder zytotoxischer Aktivität mit verschiedenen Anzahlen von T-Zellen. Diese Tests sind aufwändig und unzuverlässig (Doherty 1998).

Eine Möglichkeit, eine antigenspezifische Reaktion sowohl von T-Helferzellen als auch durch zytotoxische T-Zellen zu überprüfen, ist der Nachweis von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) (Smith et al. 2001). Die ELISPOT Technik erlaubt es, aktivierte T-Zellen als individuelle IFN- $\gamma$  sekretierende Zellen nachzuweisen (Czerkinsky et al. 1988). Somit ist diese sensitiver als der Zytokin-ELISA (Cox 2006) und als LDA (Lalvani et al. 1997).

IFN- $\gamma$  erfüllt eine Reihe von Funktionen. Unter anderem reguliert es die Antigenpräsentation bei Makrophagen und wirkt chemotaktisch auf Leukozyten. Es verstärkt die Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK) und reguliert die Bildung von Immunglobulinen durch B-Lymphozyten (Schroder et al. 2004). Die T-Lymphozyten Subpopulation der so genannten T-Effektor-Memory-Zellen stellt ein Korrelat zu einem Schutz vor Infektionen dar, der binnen weniger Stunden wirksam werden kann, indem zahlreiche Effektormoleküle wie IFN- $\gamma$  sezerniert werden (Todryk et al. 2009).

IFN- $\gamma$  wurde früher als Immuninterferon bezeichnet und wird auf antigenspezifischen Reiz gebildet. Die Säugerspezies haben alle eigene IFN- $\gamma$  Molekülstrukturen. Die Struktur von bovinem IFN- $\gamma$  wurde untersucht und mit der von Hase und Mensch verglichen. Beim Schaf ist lediglich die Primärstruktur des Proteins bekannt. Diese stimmt zu 97 % mit bovinem IFN- $\gamma$  überein (Randal und Kossiakoff 2000).

Die Bildung von IFN- $\gamma$  ist starken Schwankungen unterworfen. Der interindividuelle Unterschied nach einer polyklonalen Stimulation mit Mitogenen wie ConA lag bei Schafen beim Faktor zehn. Auch die intraindividuellen Unterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten der Untersuchung waren ähnlich hoch (Wattegedera et al. 2004).

Neben ConA eignen sich als Mitogene für bovine und ovine PBMC auch Phytohämagglutinin (PHA) (Stirtzinger et al. 1986) und Pokeweed Mitogen (PWM) (Taylor und Strickland 1998).

Der direkte Nachweis von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen kann auch über deren Proliferation erfolgen. Die Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch ein Antigen wird gemessen durch Inkubation mit dem Antigen unter Zugabe von radioaktiv markiertem Thymidin und anschließender Messung der Inkorporation

des Radionuklids in die zelluläre DNA (Stott et al. 1985). Solche und ähnliche (Lacetera et al. 2002) Lymphoproliferationsassays sind allerdings nicht quantitativ und können keine T-Zell Subpopulationen unterscheiden. Mithilfe der Durchflusszytometrie kann dies mittlerweile erreicht werden. Die PBMC werden z.B. mit Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) gefärbt. Die Farbintensität der Zellen nimmt von Generation zu Generation ab, somit kann die Anzahl der Zellteilungen bestimmt werden. Des Weiteren können T-Zell Subpopulationen mithilfe von spezifischen Oberflächenmarkern unterschieden werden (Sathiyaseelan und Baldwin 2000). Die durchflusszytometrische Untersuchung von CFSE-gefärbten Zellen ist momentan eine der informativsten Techniken, um Zellproliferation zu untersuchen (Luzyanina et al. 2007).

### **5.3. Virologische Diagnostik**

Die am raschesten durchführbare und sensitivste sowie hoch spezifische Methode ist sicherlich die PCR, die BTV-spezifische RNA detektiert.

In einem Ringversuch, an dem 19 Europäische Referenzlabore teilnahmen, wurde die Sensitivität der verwendeten BTV-PCRs evaluiert. Das Blut von experimentell infizierten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion sollte untersucht werden. Die in Deutschland verwendete RT-qPCR fand sich in der Gruppe der sensitivsten Methoden. BTV-Genom beim Schaf konnte von beiden Laboren, die diese RT-qPCR angewendet haben, drei Tage nach der Infektion nachgewiesen werden. Beim Rind gelang dies in einem der beiden Labore zwei Tage nach der Infektion und im anderen Labor zum nächsten Untersuchungszeitpunkt, nämlich fünf Tage nach der Infektion (Batten et al. 2008).

Die in dieser Arbeit verwendete PanBTV RT-qPCR amplifiziert 75 Basen am 5' Ende des Gensegments 5. Dieses wurde ausgewählt, weil es ausreichend konservierte Sequenzen enthält, um Primer und Sonden herzustellen, die alle 24 Serotypen von BTV erkennen (Toussaint et al. 2007a). Die spezifische BTV-8 RT-qPCR weist eine Genomsequenz des Segments 6, das für NS1 kodiert, nach (Conraths et al. 2009). Die verwendeten internen Kontrollen (IC) zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse entstammen einer Auswahl neuer und optimierter IC (Hoffmann et al. 2006).

Eine ältere und weniger sensitive, dafür zeitaufwändigere Methode, virale RNA nachzuweisen, ist die Hybridisierung definierter und markierter Sonden mit extrahiertem Virusgenom (Northern Blot), welches an Feststoffe gebunden ist.

Eine seit langem bekannte Methode ist die Virusisolierung. Sie gelingt bei akut infizierten Tieren am besten aus Blut, aber auch aus Sperma und Läsionen an Schleimhäuten des Atmungs- und Verdauungstraktes und der Gefäße. Das aufbereitete Probenmaterial wird bebrüteten Hühnereiern i.v. injiziert. BTV infizierte Hühnerembryonen sterben binnen 24 Stunden ab und sind durch massive Hämorrhagien kirschtrot. Organsuspensionen infizierter Embryonen werden daraufhin auf Zellkulturen überführt und das Virus *in vitro* adaptiert. Bei Kultivierung des BTV in Säugerzellen tritt ein zytopathischer Effekt in Form von Zytolyse auf (Afshar 1994). Typisch für BTV-infizierte Zellen sind tubuläre Strukturen im Zytoplasma, die aus NS1 bestehen (Eaton und Crameri 1989). Die Isolierung des Virus mittels Zellkultur oder in Schafen ist weniger sensitiv als über embryonierte Hühnereier. Alle drei Methoden sind von der OIE anerkannt (OIE).

Mittels Immunfluoreszenz können BT-Viren nachgewiesen aber keine Serotypen unterschieden werden. Anwendung findet dies in diversen Studien beim Nachweis von BTV in infizierten Zellkulturen, embryonierten Hühnereiern und in *Culicoides spp* (Ruckerbauer et al. 1967; Jennings und Boorman 1980; Jochim und Jones 1983; Afshar 1994). Eine weitere immunhistochemische Methode ist die Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Technik, die eine rasch durchführbare, präzise und spezifische Methode darstellt, BTV nachzuweisen (Cherrington et al. 1985). Auch die Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Detektion fand erfolgreich Anwendung.

Ein Antigen-ELISA erwies sich als hochsensitiver Test zum Nachweis von BTV in Gewebesuspensionen von *Culicoides spp*. (Afshar 1994).

Ein Virusneutralisationstest oder Plaqueneutralisationstest kann nicht nur zum Nachweis Serotyp-spezifischer neutralisierender Antikörper sondern auch zur Serotypisierung von BTV angewendet werden (El Hussein et al. 1989; Afshar 1994).

Hämagglutinations- und Hämagglutinationshemmtest haben sich als nicht für die Diagnostik standardisierbar herausgestellt und wurden daher nicht in großem Umfang genutzt (Hübschle 1980; Van der Walt 1980; Afshar 1994).

---

Mittels Elektronenmikroskopie können zwar Strukturen von Reoviren erkannt, aber BTV nicht eindeutig identifiziert werden. Hierfür sind weitere immun-elektronenmikroskopische Schritte notwendig (Afshar 1994).

## III. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Material

#### 1.1. Herkunft der Tiere

Aus umfangreichem Datenmaterial wurden Betriebsleiter kontaktiert. Sofern die Tiere noch nicht gegen BTV-8 geimpft waren und die Betriebsleiter dem Vorhaben zustimmten, wurden die Tiere beprobt.

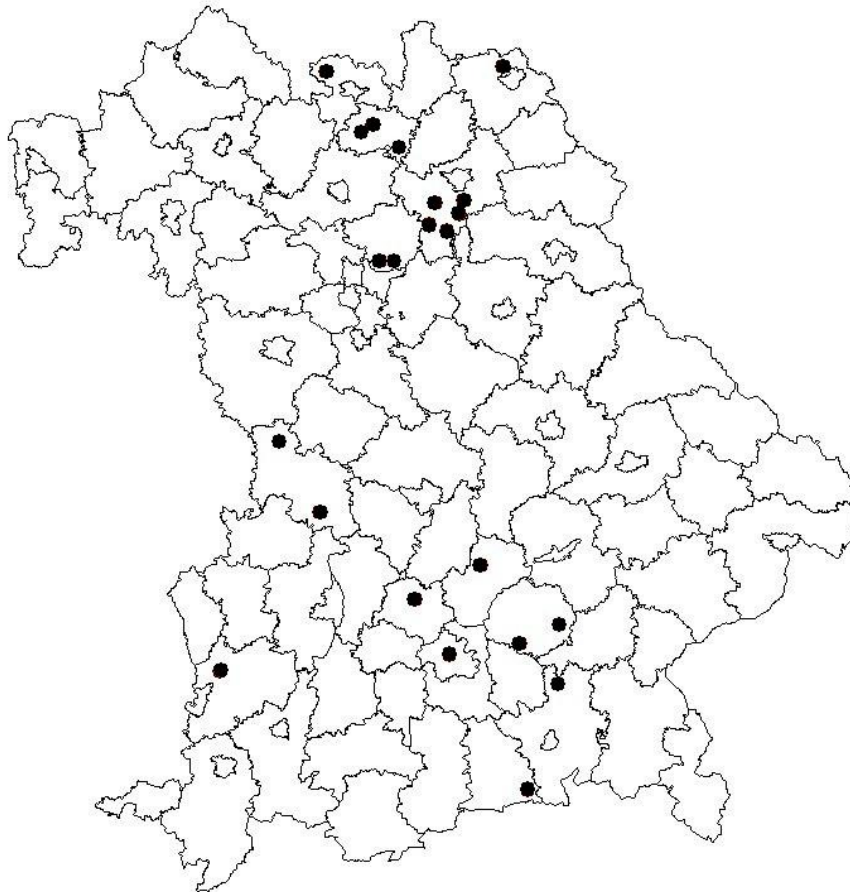


Abb. III.1: Standorte der 22 Betriebe in Bayern

In die Untersuchung wurden insgesamt 22 Betriebe aus ganz Bayern integriert. Davon waren sechzehn Mischbetriebe, vier reine Schafbetriebe und zwei

Rinderbetriebe. Die Gesamtanzahl der Rinder und Schafe sowie die Zahl der davon untersuchten Tiere sind in Tab. III.1 angegeben.

**Tab. III.1:** Ausgewählte Betriebe mit Angabe der Gesamtzahlen der Tiere und der davon untersuchten Tiere.

<b>Betriebs Nr.</b>	<b>n<sub>insg</sub> Rind</b>	<b>n<sub>prob</sub> Rind</b>	<b>n<sub>insg</sub> Schaf</b>	<b>n<sub>prob</sub> Schaf</b>
1	55	37	11	11
2	126	56	58	39
3	78	46	23	21
4	133	60	20	18
5	160	62	12	12
6	105	42	22	19
7	37	25	23	18
8	39	27	220	66
9	62	39	13	10
10	101	50	14	13
11	167	61	41	30
12	108	51	13	13
13	13	13	0	0
14	95	50	24	20
15	183	60	50	20
16	0	0	19	19
17	4	4	19	19
18	0	0	19	14
19	0	0	19	19
20	0	0	19	19
21	13	13	78	78
22	18	18	0	0
<b>Summe</b>	<b>1497</b>	<b>714</b>	<b>717</b>	<b>478</b>

n<sub>insg</sub>: Gesamtzahl der Tiere im Betrieb

n<sub>prob</sub>: Zahl der untersuchten Tiere

grau hinterlegt: Tiergruppe, aus der Rinder oder Schafe zur Impfkontrolle ausgewählt wurden

Es wurden zwischen vier und 183 Rinder und zwischen elf und 220 Schafe in den Betrieben gehalten. Im Durchschnitt waren das 83 Rinder pro Rinder- oder Mischbetrieb und 38 Schafe pro Schaf- oder Mischbetrieb.

Einige Proben aus der Routinediagnostik des LGL, bei denen BTV-8 Genom nachgewiesen worden war, wurden im Rahmen dieser Studie mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) und Serumneutralisationstest untersucht. Von diesen Tieren lagen mit Ausnahme von denen aus dem Betrieb Nr. 22 keine weiterreichenden Informationen oder weitere Proben vor. Sie sind in Tab. III.1 nicht aufgeführt, werden aber im Kapitel „Immunreaktionen bei natürlich infizierten Tieren“ (III.2.10) erwähnt. Erste Proben der Rinder aus dem Betrieb Nr. 22 stammten auch aus der Routinediagnostik des LGL. Die Tiere wurden aber mehrmals mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD), IFN- $\gamma$  ELISPOT und Serumneutralisationstest (SNT) untersucht. Daher wird der Betrieb zu den ausgewählten (Tab. III.1) gezählt.

## **1.2. Fragebogen**

Bei allen untersuchten Betrieben wurden folgende Daten in Form eines Fragebogens erhoben:

1. Allgemeine Informationen zum Betrieb: Adresse und Kontaktdaten
2. Tiere: Alle auf dem Hof gehaltenen Tiere und Anzahl der Rinder und Schafe (eingeteilt in Altersgruppen), Nutzungsart und Rassen der Rinder und Schafe
3. Haltung der Rinder und Schafe: Haltungsform, Weidenutzung
4. Zukäufe und Abgänge (Gründe)
5. BT-ähnliche Symptome bei Rindern
6. Impfung gegen BTV-8 und Insektenbekämpfung

Dieser Fragebogen ist vollständig in Kapitel IX.1.1 dargestellt.

## **1.3. Probenentnahme und Aufbereitung**

Die Blutproben wurden beim Rind aus der Vena coccygea, beim Schaf aus der Vena jugularis mittels Vacutainer System (Becton Dickinson GmbH) entnommen. Zum Transport ins Labor wurden die Proben in einer Kühlbox und im Labor bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlraum bei 2-7 °C gelagert.



Beim Nativblut wurde durch Zentrifugation (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) das Blutserum von zellulären Bestandteilen und Fibrin getrennt. Das Serum wurde in ein verschließbares Röhrchen überführt und bei -20 °C bis zur Untersuchung gelagert.

Das EDTA-Vollblut wurde spätestens innerhalb von 3 Tagen nach der Blutentnahme mittels BTV-RT-qPCR untersucht.

Für den IFN- $\gamma$  ELISPOT sind lebende Zellen notwendig und daher musste das entnommene Blut noch am selben Tag verarbeitet werden. Neben EDTA-Vollblut für den IFN- $\gamma$  ELISPOT selbst wurde von gleichen Individuen auch Nativblut entnommen, so dass der Ak-Titer bestimmt werden konnte.

#### **1.4. Impfstoffe**

Die bei den Untersuchungen verwendeten Impfstoffe sowie ihre Bestandteile, Dosierung und Art der Anwendung sind im Folgenden aufgeführt. Diese Informationen stammen aus der jeweiligen Gebrauchsinformation.

##### **BLUEVAC-8**

Hersteller:

CZ Veterinaria S.A. (Porrino, Spanien)

Zusammensetzung:

Blauzungenvirus Serotyp 8	$\geq 32 E^1$ anti-VP7
Thiomersal	0,2 mg
Lösungsmittel Al(OH) <sub>3</sub> und Quil A	ad 2 ml

Dosierung:

Schafe: 2 ml, Rinder: 4 ml

Art der Anwendung:

Schafe: Eine Impfdosis ab einem Alter von 3 Monaten.

Rinder: Ab einem Alter von 3 Monaten sollen 2 Impfdosen im Abstand von 3 bis 4 Wochen verabreicht werden.

---

<sup>1</sup> Eine Elisaeinheit: Inverse höchste Serumverdünnung mit positiver anti-VP7 Antwort

## **BTVPUR AISap 8**

Dieser Impfstoff ist von der European Medicines Agency (EMA) zugelassen.

Hersteller:

Merial S.A.S. (Hallbergmoos)

Zusammensetzung:

Blauzungenvirus Serotyp 8 Antigen	≥0,72 SN.E. <sup>1</sup>
Aluminiumhydroxid	2,7 mg
Saponin	30 HE <sup>2</sup>
Lösungsmittel	ad 1 ml

Dosierung:

Schafe und Rinder: 1 ml

Art der Anwendung:

Schafe: Eine Injektion ab einem Alter von einem Monat. Lämmer von geimpften Müttern ab einem Alter von 2,5 Monaten.

Rinder: 1. Injektion ab einem Alter von einem Monat. Kälber von geimpften Müttern ab einem Alter von 2,5 Monaten.  
2. Injektion: einen Monat später.

<sup>1</sup> Impfdosis, um eine Serokonversion von 1 log<sub>10</sub> (PD<sub>50</sub>) zu erreichen

<sup>2</sup> Hämolytische Einheiten

## **Bovilis BTV8**

Hersteller:

Intervet (Unterschleißheim, Deutschland)

Zusammensetzung:

BTV-8 Antigen <sup>1</sup>	500 Einheiten
Aluminiumhydroxid (100 %)	16,7 mg
Saponin	0,31 mg

Dosierung:

Schafe und Rinder: 1 ml

Art der Anwendung:

Schafe: Schafe ab einem Alter von einem Monat sollten einmal mit einer

Dosis von 1 ml s.c. geimpft werden. Der Zeitpunkt für eine Auffrischungsimpfung ist bis jetzt noch nicht festgelegt aber es wird empfohlen, die Tiere spätestens 2 Wochen vor jeder Risikoperiode zu impfen.

Rinder: Rinder ab einem Alter von einem Monat sollten zweimal im Abstand von 3 Wochen mit je einer Dosis von 1 ml s.c. geimpft werden. Auffrischungsimpfung siehe Schafe.

<sup>1</sup> Antigen des viralen Erregers der Blauzungenkrankheit (Serotyp 8) in einer Menge, die vor der Inaktivierung mindestens 500 Antigeneinheiten/ml entsprach

### 1.5. Viren

Alle Serotypen des Bluetongue Virus (BTV), die bei den im folgenden beschriebenen Tests zum Einsatz kamen, wurden dankenswerterweise von Dr. G. Savini, OIE Reference Laboratory for Bluetongue, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Italien, zur Verfügung gestellt.

**Tab. III.2:** Stamm und Herkunft der eingesetzten BTV Serotypen

Virus	BTV1	BTV2	BTV4	BTV8	BTV16
<b>Stamm</b>	88703 (2006)	10826/12 (2005)	93036 (2003)	80747/13 (2008)	94280 (2002)
<b>Herkunft</b>	Italien	Italien	Italien	Italien	Italien
<b>Charge</b>	04/'07	01/'07	03/'06	01/'08	01/'06

### 1.6. Zellen

Bovine und ovine mononukleäre Leukozyten aus dem Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC):

Diese Zellen wurden aus dem Blut der für die Versuche herangezogenen Rinder und Schafe gewonnen und direkt nach ihrer Gewinnung als frische PBMC verwendet.

Vero-Zelllinie (ATCC, Nr. CCL-81)

Diese Zellen wurden zur Vermehrung der eingesetzten Serotypen von

BTV und als Indikatorzellen bei der BTV Titration und beim Serumneutralisationstest verwendet.

### 1.7. Antikörper, Enzym und Mitogene für ELISPOT

#### a) Antikörper

Fängerantikörper (FAk): MCA2112                      AbD Serotec, Düsseldorf  
(Mouse Anti Bovine Interferon Gamma)

Detektorantikörper (DAk): MCA1783B                AbD Serotec, Düsseldorf  
(Mouse Anti Bovine Interferon Gamma:Biotin)

#### b) Enzym

Streptavidin:HRP (S-HRP)                              AbD Serotec, Düsseldorf

#### c) Mitogene

Concanavalin A (ConA)                                 Sigma Aldrich, München

Phytohemagglutinin (PHA)                          Sigma Aldrich, München

Lectin from *Phytolacca americana*                Sigma Aldrich, München  
(pokeweed mitogen, PWM)

### 1.8. Chemikalien

0,5% Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Amino Acids Non Essential (NEA)	PAA, Linz, Österreich
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Aqua destillata (Water Purification System)	Millipore, Schwalbach
DEPC-treated Water	Ambion, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Serva, Amstetten, Österreich
Dulbecco's PBS (DPBS)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's PBS without Ca & Mg	PAA, Linz, Österreich
Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Serva, Amstetten, Österreich

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin
Foetal Bovine Serum (FBS)	PAA; Linz, Österreich
Formaldehyd 35%	Carl Roth, Karlsruhe
Gentamicin (50 mg/ml)	PAA, Linz, Österreich
Gentamicin Reagent Solution (50 mg/ml)	Gibco, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Serva, Amstetten, Österreich
Kaliumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Lymphocyte Separation Medium LSM 1070	PAA, Linz, Österreich
Minimal Essential Medium + Earle's + L-Glutamine	Gibco, Karlsruhe
Natriumchlorid	Serva, Amstetten, Österreich
RPMI 1640	PAA, Linz, Österreich
100 x TE Puffer	Sigma Aldrich, München
Trypan blue 0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

## 1.9. Reagenzien

### 1.9.1. cELISA

#### NaCl-Lösung:

Natriumchlorid	8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

#### Stammlösung:

Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	7 g
Kaliumhydrogenphosphat	2 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

#### Natriumphosphatpuffer:

NaCl-Lösung	80 %
Stammlösung	20 %

### 1.9.2. Serumneutralisationstest

#### Kristallviolettstammlösung:

Kristallviolett	15 % (w/v)
Ethanol	q.s.

#### Kristallviolettlösung:

Kristallviolettstammlösung	25%
Formaldehyd	5%
Aqua dest.	70%

#### Trypsinlösung:

0,5 % Trypsin	10 %
PBS ohne Ca und Mg	90 %

#### Zellanzuchtsmedium (ZAM):

FBS	10 %
Gentamicin	0,2 %
Minimal Essential Medium (MEM)	89,8 %

#### Zellerhaltungsmedium (ZEM):

FBS	2 %
Gentamicin	0,2 %
Minimal Essential Medium (MEM)	97,8 %

### 1.9.3. Interferon-gamma ELISPOT

#### Blockingpuffer Protokoll 1:

RPMI	95 %
FBS	5 %

#### Blockingpuffer Protokoll 2 und Leukozytenmedium:

RPMI	88,8 %
FBS	10 %
NEA	1 %
Gentamicin	0,2 %

**Detektorantikörper-Verdünnungslösung:**

PBS	99,5 %
FBS	0,5 %

**Erythrozytenlysispuffer:**

Ammoniumchlorid	8,02 g/l
Kaliumhydrogencarbonat	0,8 g/l
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	0,37 g/l

**Trypanblaulösung:**

PBS	9,4 ml
Trypanblau	0,5 ml

**1.10. Reverse Transkriptions real time Polymerasekettenreaktion****Kontrollen**

Interne Kontrolle (IC), entspricht EGFP (enhanced green fluorescent protein) Plasmid	INTYPE IC-RNA von Labor Diagnostik Leipzig,
Extraktionskontrolle (EK)	DEPC-Wasser wird bei der Extraktion mitgeführt und dient als EK
No Template Control (NTC)	Als NTC dient der Mastermix, der ohne Zugabe von Probenmaterial den Thermocycler durchläuft
Positivkontrolle (PK)	BTV-8 aus eigener Vermehrung

**Primer und Sonden**

Die in Tab. III.3 und Tab. III.5 dargestellten Primer und Sonden dienen der Detektion von BTV-spezifischen Genomsequenzen. Die in Tab. III.4 und Tab. III.6 genannten Primer und Sonden dienen der Detektion der Genomsequenz der Internen Kontrolle (IC).

**Tab. III.3:** BTV-8 Primer und Sonden für die BTV-8 RT-qPCR

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Hersteller
BTV-8 for	AAT GGG ATG TGT GTC AAA CAA AAT	TIB
BTV-8 rev	CAA CTA ATT TAT ACG CTT TCG CC	Molbiol, Berlin
BTV-8 Sonde	FAM-CTC CTC CGC ATC GGT CGC CGC-TAMRA	

**Tab. III.4:** Enhanced Green Fluorescent Protein Nr. 4 (EGFP) Primer und Sonden zur Detektion der IC für die BTV-8 RT-qPCR

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Hersteller
EGFP (4) for	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G	TIB
EGFP (4) rev	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	Molbiol, Berlin
EGFP (4) Sonde	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1	

**Tab. III.5:** PanBTV Primer und Sonden für die PanBTV RT-qPCR

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Hersteller
PanBTV for	GGC AAC YAC CAA ACA TGG A	TIB
PanBTV rev	AAA GTY CTC GTG GCA TTW GC	Molbiol, Berlin
PanBTV Sonde	FAM- CYC CAC TGA TRT TGT ATT TTC TCA A-TAMRA	

**Tab. III.6:** Interne Kontrolle: Enhanced Green Fluorescent Protein Nr. 1(EGFP) Primer und Sonden zur Detektion der IC für die PanBTV RT-qPCR

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Hersteller
EGFP (1) for	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC	TIB
EGFP (1) rev	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G	Molbiol, Berlin
EGFP (1) Sonde	Hex-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1	



### Primer- und Sondenmixe

Der zur Herstellung der Mixe verwendete 100 x TE Puffer wurde 1:1000 mit DEPC-Wasser verdünnt, so dass ein 0,1 TE Puffer entstand.

**Tab. III.7:** BTV-8 Mix für die BTV-8 RT-qPCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>Volumen</b>
BTV-8 for	100 pmol/μl	20 μl
BTV-8 rev	100 pmol/μl	20 μl
BTV-8 Sonde	100 pmol/μl	2,5 μl
TE Puffer	0,1	157,5 μl
Gesamtmenge BTV-8 Mix		200 μl

**Tab. III.8:** EGFP Mix Nr. 4 für die BTV-8 RT-qPCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>Volumen</b>
EGFP for	100 pmol/μl	5 μl
EGFP rev	100 pmol/μl	5 μl
EGFP Sonde	100 pmol/μl	2,5 μl
TE Puffer	0,1	187,5 μl
Gesamtmenge EGFP Mix		200 μl

**Tab. III.9:** PanBTV Mix für die PanBTV RT-qPCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>Volumen</b>
PanBTV for	100 pmol/μl	30 μl
PanBTV rev	100 pmol/μl	30 μl
PanBTV Sonde	100 pmol/μl	2,5 μl
TE Puffer	0,1	137,5 μl
Gesamtmenge PanBTV Mix		200 μl

**Tab. III.10:** EGFP Mix Nr. 1 für die PanBTV RT-qPCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>Volumen</b>
EGFP for	100 pmol/μl	10 μl
EGFP rev	100 pmol/μl	10 μl
EGFP Sonde	100 pmol/μl	8,46 μl
TE Puffer	0,1	171,54 μl
Gesamtmenge EGFP Mix		200 μl

### **Mastermixe**

**Tab. III.11:** Mastermix für die BTV-8 RT-qPCR

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
DEPC Wasser	3 μl
QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12,5 μl
QuantiTect Reverse Transkriptase (RT) Mix	0,25 μl
BTV-8 Mix	2 μl
EGFP Mix Nr. 4	2 μl
Interne Kontrolle RNA (IC)	0,25 μl
Total Volumen Mastermix	20 μl

**Tab. III.12:** Mastermix für die PanBTV RT-qPCR

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
DEPC Wasser	10,5 µl
QuantiTect Virus Master Mix	5 µl
QuantiTect Virus Reverse Transkriptase (RT) Mix	0,25 µl
PanBTV Mix	2 µl
EGFP Mix Nr. 1	2 µl
IC	0,25 µl
Total Volumen Mastermix	20 µl

### **1.11. Kits**

Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA	VMRD, Pullman, WA, USA
Peroxidase Substrat Kit Vector VIP SK-4600	Vector Laboratories; Eching
ELISA Test zum Nachweis von Antikörpern gegen das VP7 Protein des Bluetongue Virus (Pourquier Bluetongue Competition)	Institut Pourquier, Montpellier, Frankreich
QIAmp Viral RNA Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Virus RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden

### **1.12. Verbrauchsmaterialien**

Combitips plus 2,5 ml, 5 ml und 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Cellstar Gewebekulturflasche	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrowellplatten TC Microwell 96F	Nunc, Darmstadt
Multiscreen HTS 96-well Filtration System (ELISPOT-Platte)	Millipore, Schwalbach
PP-Röhrchen, steril, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Safe-Lock-Tubes 2 ml	Eppendorf, Hamburg

Serologische Pipetten (steril, einzeln verpackt), 1 ml, 2 ml, 5 ml und 10 ml

VWR International, Darmstadt

**Blutentnahme:**

BD Precisionglide Kanüle, steril

Becton Dickinson GmbH,  
Heidelberg

BD Vacutainer EDTA Röhrrchen

Becton Dickinson GmbH,  
Heidelberg

BD Vacutainer Röhrrchen für die Serumanalyse

Becton Dickinson GmbH,  
Heidelberg

**1.13. Geräte**

**Brutschrank:**

CO<sub>2</sub> Brutschrank

Binder, Tuttlingen

**ELISPOT Reader:**

VirusSpot Reader

AID, Strassberg

**Heizblöcke:**

Block Heater (HB-2)

Wealtec Corp., Sparks, NV, USA

Thermomixer Comfort

Eppendorf, Hamburg

**Mikroskope:**

Diavert

Leitz, Wetzlar

CKX 41

Olympus, Hamburg

**Mikrotiterplattenschüttler:**

Mikroshaker

Dynatech, Denkendorf

MTS 4

IKA, Staufen

**Mikrotiterplattenwascher:**

Atlantis-washer

Asys-Hitech, Gödensdorf

**Pipetten:**

Einkanalpipette LTS 10-100 µl

Rainin, Gießen

Mehrkanalpipette L8 200 µl

Rainin, Gießen

Reference 0,5-10 / 2-20 / 10-100 / 50-200 /

Eppendorf, Hamburg

100-1000 µl

Research 10-100 / 100-1000 / 500-5000 µl Eppendorf, Hamburg

Research (8-Kanal) 30-300 µl Eppendorf, Hamburg

Multipette plus Eppendorf, Hamburg

**Pipettierhilfe:**

Easypet Eppendorf, Hamburg

**Photometer:**

Expert 96 Asys-Hitech, Gödensdorf

**Sicherheitswerkbänke:**

Laminar Air Flow Class 100 Gelaire, Sydney, Australien

BSB 6 Gelaire, Sydney, Australien

BH 26 Gelaire, Sydney, Australien

Hera safe Heraeus, Hanau

**Thermocycler:**

Mx 3005P Stratagene, Amsterdam,  
Niederlande

**Vortex:**

V-1 plus Peqlab, Erlangen

**Waage:**

PC 4400 Mettler, Gießen

**Zählkammer:**

Fuchs-Rosenthal Brand GmbH, Wertheim

**Zentrifugen:**

Centrifuge 5415 D, Rotor FA-45-24-11 Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5810 R, Rotor A-4-81 Eppendorf, Hamburg

Cryofuge 5500i, Rotor 75006478 K Heraeus, Hanau

Megafuge 1.0 R, Rotor 75007570 Heraeus, Hanau

### 1.14. Computerprogramme

<b>Verwendungszweck</b>	<b>Programm</b>
Belegungsprogramm für Mikrotiterplatten	MikroBAS 2000 Routine
Diagramme	Microsoft Excel
Elispotreadersoftware	AID ViruSpot Application
Laborinternes Managementsystem (LIMS)	Sample Manager 2004
Literaturverwaltung	Endnote
Photometersoftware	MikroWin 2000
Statistikprogramm	SPSS
Textverarbeitungsprogramm	Microsoft Word
Thermocyclersoftware	Mx Pro Application

## 2. Methoden

### 2.1. Antikörper-ELISA

Der Nachweis von Antikörpern gegen BTV wurde zur Feststellung der Seroprävalenz mit dem Pourquier Bluetongue Competition ELISA (Institut Pourquier) laut Herstellerangaben durchgeführt. Im Falle eines positiven oder fraglichen Ergebnisses wurde dies mit dem Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) überprüft. Eine Probe galt als positiv, wenn sie im Pourquier Bluetongue Competition ELISA (Institut Pourquier) fraglich oder positiv und bei der Wiederholungsuntersuchung mit dem Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) positiv reagierte.

Beim Pourquier Bluetongue Competition ELISA (Institut Pourquier) basiert die Auswertung auf der prozentualen Inhibition der Probe in Bezug auf den Mittelwert der Negativkontrolle. Proben mit einer prozentualen Inhibition von größer oder gleich 45 % gelten als Proben von Tieren, die keine Träger von spezifischen Antikörpern gegen das VP7-Protein des BTV sind (negativ). Proben mit einer prozentualen Inhibition zwischen 35 und 45 % werden als fraglich betrachtet und

solche kleiner oder gleich 35 % gelten als Proben von Tieren, die Träger von spezifischen Antikörpern gegen das VP7-Protein des BTV sind.

Die Prozentuale Inhibition wird wie folgt berechnet:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{OD}^1 \text{ der untersuchten Probe}}{\text{Mittelwert der OD der Negativkontrolle}} \times 100 \quad (1)$$

<sup>1</sup> Optische Dichte

Da kein international anerkanntes Referenzserum verfügbar ist, wird dieser Test anhand eines französischen Standardserums evaluiert. Das Kit detektiert das Standardserum bis zu einer Verdünnung von 1:4 als positiv, bei 1:8 als fraglich oder negativ und ab 1:16 als negativ. In einem Versuch mit 161 nicht BT-infizierten und 121 BT-infizierten Rindern betrug Sensitivität und Spezifität 100 % (Pourquier).

Beim Test von VMRD gibt es keinen fraglichen Bereich. Proben sind als positiv zu bewerten, wenn ihre OD kleiner als 50 % des Mittelwertes der Negativkontrolle ist. Proben sind als negativ zu bewerten, wenn ihre OD größer oder gleich 50 % des Mittelwertes der Negativkontrolle ist. Der Hersteller gibt in der Gebrauchsanweisung die Sensitivität des Testes als 100 % und Spezifität als 99 % an.

Die endgültige Bestimmung der BTV-Antikörpertiter erfolgte mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD). Die Serumproben wurden mit Natriumphosphatpuffer in log<sub>2</sub> Stufen verdünnt und als Duplikate untersucht. Hierbei wurden alle Proben eines Tieres aus den verschiedenen Probeentnahmezeitpunkten auf derselben Platte untersucht, um die Variabilität der Ergebnisse zwischen den einzelnen Ansätzen zu minimieren.

Die höchste Verdünnung, bei der die Antikörper im Probandenserum die Bindung der enzymgekoppelten Konjugat-Antikörper um mehr als 50 % hemmen konnten, wurde als Titer angegeben.

## 2.2. Serumneutralisationstest

Der Serumneutralisationstest (SNT) beruht auf der Hemmung der Zellinfektion durch das BT-Virus. Ak-Titer im cELISA und SNT stimmen nicht unbedingt überein. Der SNT misst die Fähigkeit der gebildeten Antikörper zur Neutralisierung des Virus. Der ELISA hingegen detektiert lediglich die Bindung von Antikörpern, die gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen des BT-Virus gerichtet sind, nämlich das VP7 Protein.

Vero-Zellen dienen bei diesem Test als Indikator für die zytopathogene Wirkung des Virus. Diese zeigt sich als zytopathischer Effekt (cpE). Die Zellen wurden in Zellanzuchtmedium (ZAM) in eine 96-Loch Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel auf Zellerhaltungsmedium (ZEM).

### Virustitration

Die BTV-8-Virussuspension wurde in log<sub>10</sub> Schritten mit Zellerhaltungsmedium (ZEM) verdünnt. Es lagen Verdünnungsstufen von 1x10<sup>-1</sup> bis 1x10<sup>-8</sup> vor. Jede Reihe der 96-Loch Mikrotiterplatte wurde mit je 25 µl Virussuspension einer Verdünnungsstufe versehen. Die letzten beiden Reihen der Plattenvertiefungen erhielten keine Virussuspension sondern dienten als Zellkontrolle. Die Platte wurde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für vier Tage inkubiert.

Der Zellrasen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde mit Kristallviolett fixiert und gefärbt (50 µl pro Vertiefung). Mit Leitungswasser wurde die überschüssige Farbe entfernt, die Platte luftgetrocknet und anschließend mit Hilfe eines Inversmikroskops ausgewertet. Nur intakte Zellen am Boden der Vertiefungen der Platte binden Farbstoff, Areale mit virusbedingter Zytolyse bleiben ungefärbt.

Man berechnet den Virustiter als den Kehrwert derjenigen Verdünnung, bei der statistisch die Hälfte der Zellkulturansätze mit cpE reagiert und bezeichnet dies als Kulturinfektiöse Dosis 50 (KID<sub>50</sub>). Die Berechnung erfolgt nach Spearman und Kärber (Mayr 1974).



## **Quantitative Antikörperbestimmung**

In 96-Loch Mikrotiterplatten wurden Vero-Zellen in ZEM eingesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert.

Die zu testenden Seren wurden zur Inaktivierung des Komplements zunächst für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert und anschließend mit ZEM in log<sub>2</sub> Stufen verdünnt. 25 µl der Serumprobe bzw. ihrer Verdünnung wurden mit 25 µl einer BTV-Suspension, die 100 KID<sub>50</sub> enthielt, bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Die Verdünnungsreihen aller getesteten Seren wurden in Duplikaten angesetzt. Ein Referenzserum, das neutralisierende Antikörper gegen BTV-8 mit einem Titer von 1:64 enthält, wurde im Vierfachansatz als Positivkontrolle mitgeführt. Außerdem wurden eine Zellkontrolle (ZEM ohne Serum und Virus) je zu testendes Serum, eine virusfreie Serumkontrolle und eine Rücktitration des Testvirus zur Bestimmung der tatsächlich eingesetzten KID<sub>50</sub> im Vierfachansatz mitgeführt. Hierbei wurde die im Test eingesetzte Virusverdünnung in log<sub>2</sub> Schritten weiter verdünnt.

Bei den Zellkulturplatten wurde am darauf folgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Die mit der Virussuspension vorinkubierten Testseren wurden auf die permissiven Zellen pipettiert und für vier Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

## **Auswertung des Serumneutralisationstests**

Die Auswertung erfolgte durch Fixation und Färbung des Zellrasens in den Mikrotiterplatten mit Kristallviolett und anschließender Beurteilung mit Hilfe eines Inversmikroskops.

Ein SNT wurde als auswertbar beurteilt, wenn die Positivkontrolle vom vorausgesetzten Titer um nicht mehr als eine log-Stufe nach oben und unten schwankte und wenn die Virusrücktitration einen Wert zwischen 40 und 660 KID<sub>50</sub> erreichte.

Als Positivkontrolle diente das Serum eines Rindes aus dem Betrieb Nr. 22. Bei dem Tier wurde 2008 eine natürliche Infektion festgestellt. Es wurde im selben

Jahr geimpft und geboostet und erhielt im Jahr 2009 eine weitere Impfung. Drei Wochen nach dieser letzten Impfung wurde Serum als Positivkontrolle entnommen. Darin war im Ak-ELISA ein Titer von 1:256 und im BTV-8 SNT ein Titer von 1:54 nachweisbar.

Die höchste Verdünnung, bei der ein zu testendes Serum die eingesetzte Virusmenge von 100 KID<sub>50</sub> neutralisieren konnte, wurde als Titer angegeben. Die Berechnung erfolgt nach Spearman und Kärber (Mayr 1974).

### **2.3. IFN- $\gamma$ ELISPOT**

Der IFN- $\gamma$  ELISPOT dient dem Nachweis von erregerspezifischer zellulärer Reaktivität. Es wurden sowohl natürlich infizierte als auch einmal und mehrmals geimpfte Tiere getestet um festzustellen, wie stark BTV-8, bzw. der Impfstoff, die T-Zellen zur Bildung von IFN- $\gamma$  anregt.

### **Gewinnung von mononukleären Leukozyten aus Blut**

Zehn bis 20 ml EDTA-Vollblut wurden mit Erythrozytenlysispuffer (ELP) gemischt und nach zehnminütiger Inkubation 10 min bei 1800 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das so entstandene Leukozytenpellet wurde mit ELP resuspendiert, das Röhrchen mit ebendiesem aufgefüllt und wiederum auf die gleiche Art und Weise zentrifugiert.

Die Zellen wurden gewaschen, d.h. von Plasmabestandteilen befreit, indem das Pellet mit PBS ohne Kalzium und Magnesium (PBS<sub>0</sub>) resuspendiert wurde, das Röhrchen mit ebendiesem aufgefüllt und 10 min bei 1800 U/min zentrifugiert wurde. Der Vorgang wurde wiederholt.

Das Leukozytenpellet wurde in ca. 5 ml PBS<sub>0</sub> aufgenommen. In einem 15 ml Röhrchen wurde Separationsmedium zur Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) vorgelegt und vorsichtig mit der Leukozytensuspension überschichtet. Das Röhrchen wurde für 35 min bei 1600 U/min zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugationsvorgang befanden sich die zu isolierenden PBMC in einem deutlich sichtbaren grauen Ring zwischen Plasma und Ficoll. Dieser wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Röhrchen transferiert.

Die PBMC-Suspension wurde noch zweimal mit PBS<sub>o</sub> wie bereits beschrieben gewaschen und schließlich in Leukozytenmedium (LM) aufgenommen. Die PBMC wurden einer Lebend-/Totfärbung mit Trypanblau unterzogen und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt.

### **Beschichten und Blockieren der ELISPOT-Platte**

Am Tag vor dem Ansetzen des ELISPOT wurde die ELISPOT-Platte 1 min mit 35 % Ethanol (15 µl pro Vertiefung) inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit PBS (150 µl pro Vertiefung) gewaschen. Danach wurden in jede Vertiefung 100 µl einer bereits vorbereiteten Lösung des Fängerantikörpers (Mouse Anti Bovine Interferon Gamma) mit einer Konzentration von 5 µg/ml gegeben und die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Zum Entfernen überschüssiger Antikörperlösung wurde die Platte dreimal mit A. dest. (150 µl pro Vertiefung) gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Blockingpuffer in jede Vertiefung gegeben und die Platte für 2 h in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Folgende Modifikation wurde bei der Untersuchung von zwei Schafen vier Wochen nach der zweiten Impfung (siehe Kapitel III.2.9.2) zusätzlich angewandt: Statt wie bei Protokoll 1 nur mit 5 % FBS wurde auch mit 10 % FBS und 5 % und 10 % Magermilch geblockt.

Nach Protokoll 2 wurde die Platte mit dem in Kapitel III.1.9.3 aufgeführten Puffer geblockt.

### **Ansetzen des ELISPOT**

Nach Entfernen des Blockingpuffers wurden die PBMC-Suspensionen (Titer  $1 \times 10^6$ /ml in LM) zu je 100 µl pro Vertiefung auf die ELISPOT-Platte gegeben. Es erfolgte eine Restimulation der PBMC mit BTV-8 und BTV-1 in der Konzentration von MOI ~ 1 (Multiplicity Of Infection). Bei einer Untersuchung wurde die MOI variiert zur Überprüfung der Abhängigkeit der IFN-γ spezifischen Spitzahlen von der Konzentration der eingesetzten Stimuli. BTV-8 wurde mit MOI ~ 0,1, MOI ~ 1 und MOI ~ 10 eingesetzt, BTV-1 mit MOI ~ 1 und MOI ~ 10.

Als Positivkontrolle wurde die Fähigkeit der gewonnenen PBMC zur IFN- $\gamma$  Bildung und Sezernierung durch die Zugabe von Mitogenen überprüft. Es wurde hierfür 100  $\mu$ l ConA (Concanavalin A) in der Konzentration 5  $\mu$ g/ml verwendet. Er wurde überprüft, ob dieses Standardmitogen in der Standardkonzentration 5  $\mu$ g/ml eine optimale Wirkung auf die PBMC von Rindern und Schafen hat. Dazu wurde als Modifikation der Methode bei einigen Untersuchungen ConA auch in den Konzentrationen 1, 3, 8 und 10  $\mu$ g/ml angewendet sowie PHA (Phythämagglutinin) in den Konzentrationen 3 und 5  $\mu$ g/ml und PWM (Pokeweed Mitogen) in der Konzentration 5  $\mu$ g/ml.

Die jeweilige Suspension wurde mit LM hergestellt.

Um eine eventuelle unspezifische Stimulation der PBMC zu erfassen, wurden PBMC mit je 100  $\mu$ l zellfreiem Überstand aus Vero-Zellkulturen inkubiert (Negativkontrolle). Die zur Restimulation verwendeten Virusstämme wurden in Vero-Zellkulturen vermehrt.

Die Restimulation, Positiv- und Negativkontrolle erfolgte in jeweils vier Vertiefungen (Vierfach Ansatz).

Dieselbe Menge Zellen wurde mit denselben Stimuli in einer Mikrowellplatte angesetzt, um die Blastenbildung der PBMC dokumentieren zu können. Dieser Ansatz wurde nach 24 Stunden im Inversmikroskop beurteilt.

Die Platten wurde in Alufolie gewickelt für etwa 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Alufolie reduziert die unspezifische Färbung des Hintergrundes und vermindert Artefakte (Kalyuzhny und Stark 2001).

### **Nachweis der IFN- $\gamma$ Sekretion**

Zur Optimierung des Testes wurde die Methode des Nachweises von IFN- $\gamma$  nach der Untersuchung einiger Proben abgeändert.

#### Protokoll 1

Die PBMC wurden entfernt und die Platte sechsmal mit PBS mit 0,05 % Tween (tPBS), einmal mit A. dest., nochmals sechsmal mit tPBS und abschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Zum Nachweis des gebundenen IFN- $\gamma$  wurde ein biotinylierter Detektor-Ak (Mouse Anti Bovine Interferon Gamma:Biotin) mit 100  $\mu$ l pro Vertiefung in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml in PBS mit 1 % FBS eingesetzt und die Platte für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Platte sechsmal mit tPBS und zweimal mit PBS gewaschen, bevor jede Vertiefung mit 100  $\mu$ l einer 1:1000 in PBS<sub>0</sub> verdünnten Streptavidin-Horseradishperoxidase-Lösung (S-HRP) befüllt wurde. Nach einstündiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Platte zunächst viermal mit 150  $\mu$ l tPBS und anschließend viermal mit 150  $\mu$ l PBS pro Vertiefung gewaschen.

Die Platte wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Flüssigsubstrat pro Vertiefung für 20 bis 40 Minuten im Dunkeln entwickelt. Die Entwicklung wurde durch gründliches Spülen der Platte mit Wasser gestoppt. Nachdem die Platte über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet war, wurden die Spots mit Hilfe des ViruSpot Reader (AID) quantifiziert.

Die Spotzahlen wurden dargestellt, indem zunächst der Mittelwert der Spots in allen Vertiefungen mit demselben Stimulus errechnet und von diesem der Mittelwert der Negativkontrollen subtrahiert wurde. Die Spotzahlen der PBMC eines Tieres galten nur dann als auswertbar, wenn der Mittelwert der Spotzahlen der Positivkontrolle ConA 5  $\mu$ g/ml nach Abzug der Negativkontrolle über 100 lag. Anschließend wurden die Spotzahlen ins Verhältnis zu denen der Positivkontrolle (ConA 5  $\mu$ g/ml) gesetzt und in Prozent angegeben.

### Protokoll 2

Die PBMC wurden entfernt und die Platte acht Mal mit PBS mit 0,01 % Tween (tPBS) gewaschen.

Zum Nachweis des gebundenen IFN- $\gamma$  wurde ein biotinylierter Detektor-Ak (Mouse Anti Bovine Interferon Gamma:Biotin) mit 100  $\mu$ l pro Vertiefung in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml in PBS mit 0,5 % FBS eingesetzt und die Platte für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Platte achtmal mit tPBS gewaschen, bevor jede Vertiefung mit 100 µl einer 1:1000 in PBS<sub>0</sub> verdünnten Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung (S-HRP) beschickt wurde. Nach 45 minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Platte zunächst viermal mit 150 µl tPBS und anschließend viermal mit 150 µl PBS pro Vertiefung gewaschen.

Entwicklung und Auswertung siehe Protokoll 1.

## **2.4. Reverse Transkriptions real time Polymerasekettenreaktion**

Die Reverse Transkriptions real time Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR, Nomenklatur nach (Bustin et al. 2009) fand Anwendung zur Prüfung evtl. vorhandener BTV-8 Feldinfektionen und wurde zu denselben Zeitpunkten durchgeführt wie die Untersuchung auf BTV Antikörper (Tab. III.13). Die hierfür ausgewählten Rinder wurden vor der Impfung gegen BTV-8, sowie zum Zeitpunkt des Boostes und zwei und vier Wochen später mittels RT-qPCR untersucht. Schafe wurden ebenfalls vor der Impfung und zwei und vier Wochen später auf das Vorkommen von BTV Genom untersucht. Somit wurde sichergestellt, dass nachgewiesene Antikörper ausschließlich von der Impfung gegen BTV-8 und nicht von einer BTV-8 Feldinfektion herrührten.

Die Proben wurden bis 4.12.2008 mit einer BTV-8 RT-qPCR (RT-PCR 1) (Conraths et al. 2009) und danach mit einer PanBTV RT-qPCR (RT-PCR 2) (Toussaint et al. 2007a) untersucht. Die beiden Methoden unterschieden sich in den verwendeten RT-PCR Kits, Primern und Sonden und im Thermalprofil.

Alle Proben von Rindern und Schafen zum Zeitpunkt der ersten Impfung wurden mit der RT-qPCR 1 untersucht. In zwei Betrieben wurden an jeweils einem Zeitpunkt die beprobten Rinder mit der RT-qPCR 2 untersucht. Der Rest der Proben wurde ebenfalls mit der RT-qPCR 1 untersucht (Tab. III.13).

**Tab. III.13:** Betriebe und Zeitpunkte der Probennahme

		Betriebs Nr.																
t		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	21	22	
4	Rind								nu							nv	nu	nu
6			nu						nu							nv	nu	nu
8			nu							nu							nv	nu
2	Schaf											nv					nu	nv
4												nv					nu	nv

t: Zeitpunkt nach der Impfung in Wochen

grau hinterlegt: RT-qPCR 1, weiß hinterlegt: RT-qPCR 2

nu: nicht untersucht, nv: Tierart im Betrieb nicht vorhanden

Zum Zeitpunkt der Probennahme 20 Wochen nach der Erstimpfung wurde keine RT-qPCR durchgeführt. Die Probennahme fand nach der vektorfreien Zeit statt. Daher wurde angenommen, dass in der Zwischenzeit keine Feldinfektion mit BTV stattgefunden hat und eventuell zu diesem Zeitpunkt nachgewiesene Antikörper ausschließlich auf die Impfung zurückzuführen waren.

### RNA-Extraktion

Die RNA wurde mit Hilfe des QIAmp Viral RNA Kit aus EDTA-Vollblut extrahiert. Obwohl das Kit nur für zellfreie Körperflüssigkeiten vorgesehen ist, können 140 µl EDTA-Vollblut in dem im QIAmp Viral RNA Mini Handbook vorgegebenen Spin Protocol aufgearbeitet werden.

Um Kreuzkontamination bei der RNA-Isolierung festzustellen, wurde bei jeder Extraktion mindestens eine RNA-Extraktionskontrolle (EK) mitgeführt. Hierbei wurde negatives Probenmaterial (DEPC-Wasser) mit den untersuchten Proben aufgearbeitet.

### Denaturierung und Reverse Transkriptions real time PCR

Die doppelsträngige BTV-RNA wurde zunächst durch Hitze denaturiert. Hierzu wurden je 5 µl der extrahierten RNA-Suspension in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß (PCR-Platten) überführt. Die Platten wurden mit einer adhäsiven

Folie verschlossen und für 2 Minuten bei 95 °C im Thermocycler inkubiert. Die Platten wurden sofort danach für 20 Sekunden in flüssigem Stickstoff gekühlt bevor sie für die folgenden Arbeitsschritte in einen gekühlten Ständer überführt wurden.

Die Folie wurde entfernt und jedes PCR-Reaktionsgefäß mit 20 µl Mastermix versehen, bevor die Platte wiederum mit einer Folie verschlossen wurde. Die Platte wurde kurz zentrifugiert.

Die Reagenten durchliefen im Thermocycler die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA), die Inaktivierung der Reversen Transkriptase (RT), die Aktivierung der Taq-Polymerase und anschließend 42 Zyklen mit Denaturierung, Annealing und Elongation. Die entsprechenden Thermalprofile sind in Tab. III.14 dargestellt.

**Tab. III.14:** Thermalprofile der BTV-8 RT-qPCR(1) und der PanBTV RT-qPCR(2)

	Temp <sup>1</sup>	Dauer <sup>1</sup>	Temp <sup>2</sup>	Dauer <sup>2</sup>
Reverse Transkription	50°C	30 min	50°C	20 min
Inaktivierung RT/ Aktivierung Taq	95°C	15 min	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	30 sec	95°C	15 sec
Annealing	56°C	30 sec	60°C	45 sec
Elongation	72°C	30 sec		

Zur Kontrolle der RNA Extraktion und zum Ausschluss einer Inhibition der PCR wurden neben dem heterologen internen Kontrollsystem (IC) (INTYPE IC-RNA (Labor Diagnostik Leipzig), entspricht EGFP) und entsprechenden Primern und Sonden (siehe Tab. III.4 und Tab. III.6), RNA-Extraktions-Kontrollen (EK), No Template Kontrollen (NTC) und mindestens eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt.

Alle RT-qPCR-Ergebnisse wurden nach Angaben des Nationalen Referenzlabors anhand der  $c_q$  Werte beurteilt, wobei nur Proben mit einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz über das Basislevel bis Zyklus 35 als positiv, solche zwischen 36 und 39 als fraglich und alle anderen  $c_q$ -Werte (größer gleich 40) negativ bewertet wurden. Um von einer erfolgreichen Extraktion und PCR sprechen zu können,



sollte die INTYPE IC-RNA (Labor Diagnostik Leipzig) jeweils mit  $c_q$ -Werten zwischen 26 und 34 nachweisbar sein.

## **2.5. Statistik**

Die Prävalenz bezeichnet den Anteil vorkommender Krankheitsfälle in einer bestimmten Risikopopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Da über die Prävalenz von BTV-8 in Betrieben in Bayern keine Daten vorlagen, wurde für die Stichprobenplanung sowohl für Rinder als auch Schafe eine BTV-8-Prävalenz von 50 % innerhalb der Betriebe angenommen. Dies erhöht die Sicherheit der Studie, denn die Anzahl der für statistisch signifikante Aussagen benötigten Proben verhält sich zur Prävalenz wie eine Gauss'sche Normalverteilungskurve. Die Präzision wurde auf 10 % und das Konfidenzintervall auf 95 % festgelegt. Für die vorhandene Herdengröße wurde mit diesen Parametern die Stichprobengröße ermittelt. Somit konnte bei der errechneten Probenzahl mit einer Sicherheit von 95 % eine Prävalenz von 40 % bis 60 % im Betrieb bestimmt werden.

Die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für Gruppenunterschiede erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, auch Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, U-Test oder Wilcoxon-Rangsummentest genannt. Es handelt sich um einen verteilungsunabhängigen, nichtparametrischen Test. Er überprüft, ob zwei unabhängige Stichproben derselben Grundgesamtheit angehören. In dieser Arbeit wird von einem signifikanten Unterschied zwischen zwei Stichproben ausgegangen, wenn  $p < 0,05$ . Von einem hochsignifikanten Unterschied wird ab  $p < 0,001$  gesprochen.

## **2.6. Ermittlung der Herdenprävalenz von BTV-8**

Bei einer in der Stichprobenplanung festgelegten Anzahl an Schafen und Rindern der Betriebe aus Tab. III.1 wurde kurz vor der Impfung gegen BTV-8 Nativ- und EDTA-Vollblut entnommen. Die Seren wurden mit Hilfe des Pourquier Bluetongue Kompetition ELISA (Institut Pourquier) auf das Vorkommen von Antikörpern gegen BTV untersucht. Im Falle eines Nachweises wurden alle beprobten Tiere mittels BTV-8 RT-qPCR auf BTV Genom untersucht. Falls keine BTV-Ak nachweisbar

waren, wurden nur die Tiere, die für die Impfwirksamkeitskontrolle (siehe nächstes Kapitel) ausgesucht worden waren, mit der RT-qPCR untersucht.

Bei der Auswahl der Tiere innerhalb der Betriebe wurden Geschlecht, Alter und Rasse nicht berücksichtigt und die zu beprobenden Tiere wurden willkürlich aus dem Gesamtbestand an Rindern bzw. Schafen ausgewählt.

## **2.7. Maßnahmen zur Impfwirksamkeitskontrolle**

### **2.7.1. Untersuchungen zur Antikörperentwicklung (ELISA)**

#### **Impfungen und Probenentnahmen in ausgewählten Betrieben 2008**

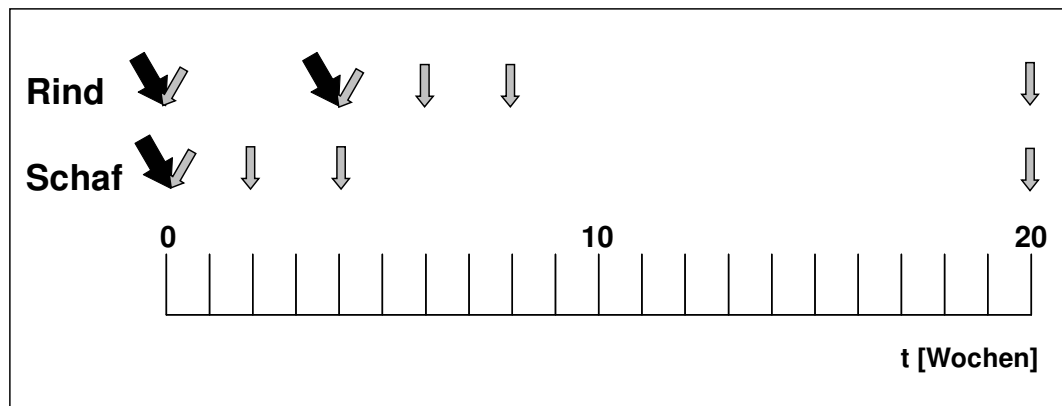
In den Betrieben Nr. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 und 16 (Tab. III.1) wurden je 10 Rinder und Schafe aus den vor der Impfung gegen BTV-8 bereits untersuchten Tieren ausgewählt. Bei diesen Tieren waren vor der Impfung keine Ak und Genom nachweisbar. Sie wurden mit den in Bayern verwendeten Impfstoffen BLUEVAC-8 (CZ Veterinaria), BTVPUR AISap 8 (MERIAL) und 2009 zum Teil auch mit Bovilis BTV-8 (Intervet) immunisiert (siehe Tab. III.15). Weitere Informationen zu den Bestandteilen, Dosierung und Art der Anwendung der Impfstoffe sind in Kapitel III.1.4 aufgeführt.

Den Tieren wurde zum Zweck einer Impfwirksamkeitskontrolle zu bestimmten Zeitpunkten nach der Impfung Nativ- und EDTA-Vollblut entnommen (Abb. III.2). Mit Hilfe des Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) wurden die Antikörpertiter bestimmt. Mittels BTV-8 RT-qPCR wurde sichergestellt, dass zu den Zeitpunkten der Impfwirksamkeitskontrolle kein BTV-8 Genom nachweisbar war und somit die Bildung von Antikörpern ausschließlich auf der Impfung gegen BTV-8 beruhte.

**Tab. III.15:** In Betrieben verwendete Impfstoffe bei Schafen und Rindern in den Jahren 2008 und 2009

Betriebs-Nr.	Schafe 2008	Rinder 2008	Rinder 2009
3	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	BTVPUR AISap 8
4	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	-
5	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	BTVPUR AISap 8
6	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	-
7	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	BTVPUR AISap 8
8	BLUEVAC-8	BTVPUR AISap 8	Bovilis BTV-8
9	BLUEVAC-8	BTVPUR AISap 8	-
10	BLUEVAC-8	-	-
11	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	Bovilis BTV-8
12	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	-
13	-	BLUEVAC-8	-
14	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	-
15	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8	-
16	BLUEVAC-8	-	-
21	BLUEVAC-8	BTVPUR AISap 8	Bovilis BTV-8
22	-	BLUEVAC-8	BLUEVAC-8

- Tierart im Betrieb nicht vorhanden oder Untersuchung nicht durchgeführt

**Abb. III.2:** Zeitpunkte der Impfungen ( **➡** ) und Probenentnahmen ( **➡** ) zur Impfwirksamkeitskontrolle bei Rind und Schaf in ausgewählten Betrieben 2008.

Die Zahl der tatsächlich untersuchten Tiere und die tatsächlichen Abstände der Probennahmen für die Untersuchungen sind in Tab. III.16 und Tab. III.17 angegeben. Rinder wurden 14 bis 16 Tage nach dem Boost untersucht und nochmals 13 bis 15 Tage später. Der Abstand zwischen der ersten Impfung und der vierten Untersuchung betrug 136 bis 141 Tage.

**Tab. III.16: Untersuchungen zur Impfwirksamkeitskontrolle beim Rind:** Abstände zwischen den Probennahmen in den Betrieben und Anzahl der zu den Zeitpunkten der Probennahmen im Betrieb noch vorhandenen Tiere.

Betriebs Nr.	Abstand zwischen Impfung und Boost in Tagen	Anzahl der Tiere beim Boost (n)	Abstand zwischen Boost und dem angestrebten Probenentnahmetermi- n sechs Wochen nach der Impfung	Anzahl der Tiere bei der Probennahme sechs Wochen nach der Impfung (n)	Abstand zwischen den angestrebten Probenentnahmetermi- nen sechs und acht Wochen nach der Impfung	Anzahl der Tiere bei der Probennahme acht Wochen nach der Impfung (n)	Abstand zwischen der Impfung und dem angestrebten Probenentnahmetermi- n 20 Wochen nach der Impfung	Anzahl der Tiere bei der Probennahme 20 Wochen nach der Impfung (n)
3	31	11	14	11	14	10	140	9
4	28	10	keine weitere Probennahme					
5	28	11	14	11	14	11	139	11
6	28	11	14	11	14	11	141	10
7	28	10	14	10	14	10	139	9
8	28	10	15	10	15	10	140	7
9	29	11	16	10	13	10	140	10
11	31	11	14	10	15	9	178	10
12	28	10	14	10	13	10	136	9
13	31	9	15	9	14	9	141	9
14	28	11	14	11	14	11	139	10
15	28	10	14	10	14	10	138	10

Schafe wurden 13 bis 17 Tage nach der Impfung das erste Mal und 14 bis 16 Tage später ein weiteres Mal untersucht. Die letzte Untersuchung erfolgte 139 bis 141 Tage nach der Erstimpfung.

**Tab. III.17: Untersuchungen zur Impfwirksamkeitskontrolle beim Schaf:** Abstände zwischen den Probenahmen in den Betrieben und Anzahl der zu den Zeitpunkten der Probenahmen im Betrieb noch vorhandenen Tiere.

Betriebs-Nr.	Abstand zwischen Impfung und dem angestrebten Probenahmetermin zwei Wochen nach der Impfung	Anzahl der Tiere zwei Wochen nach der Impfung(n)	Abstand zwischen den angestrebten Probenahmeterminen zwei und vier Wochen nach der Impfung	Anzahl der Tiere vier Wochen nach der Impfung(n)	Abstand zwischen den angestrebten Probenahmeterminen vier und 20 Wochen nach der Impfung	Anzahl der Tiere 20 Wochen nach der Impfung(n)
3	14	10	14	10	139	10
4	14	10	14	10	139	9
5	14	10	14	10	141	5
6	14	11	14	11	141	8
7	13	10	14	10	140	6
8	14	10	14	10	140	10
9	14	9	15	9	140	6
10	13	11	15	11	139	8
11	14	11	16	11	141	10
12	17	9	14	9	141	9
14	14	11	14	11	139	9
15	14	9	14	9	138	4
16	14	10	14	10	137	7

Die Abstände der Probenahmen wichen von den angestrebten Abständen um  $\pm$  drei Tage ab. Die Zahl der untersuchten Tiere verminderte sich während der Gesamtdauer der Untersuchung. Die im Abschnitt IV. (Ergebnisse) dargestellten Diagramme zeigen jedoch die angestrebten Abstände der Untersuchung und berücksichtigen die Abnahme der Tierzahl nicht. Die untersuchten Proben der

Tiere aus je einem Betrieb wurden zum Zweck einer übersichtlicheren Darstellung als Einheit betrachtet und ihre Antikörpertiter als Median dargestellt. Dabei wurde der Median oder Mittelwert jeweils mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen der vorhandenen Tiere gebildet.

### **Impfungen und Probenentnahmen bei Rindern im zweiten Jahr der Impfung (2009)**

In einigen Betrieben wurden die Tiere bald nach der Lieferung des Impfstoffes im Juni (Tab. III.18) und in anderen erst spät im Jahr 2008 zwischen September und November geimpft (Tab. III.19). Die Impfung im Jahr 2009 fand bei allen Betrieben innerhalb von wenigen Wochen, zwischen dem 19.3. und dem 6.4.2009, statt. Somit gab es eine Gruppe von Betrieben mit geringerem zeitlichem Abstand zwischen den Impfungen und eine Gruppe mit größerem Abstand. Es wurde ein Vergleich zwischen früh und spät im Jahr 2008 geimpften Rindern hinsichtlich deren Antikörperentwicklung nach der Impfung 2009 durchgeführt. Hierzu wurden Tiere aus drei Betrieben mit großem zeitlichem Abstand und Tiere aus zwei Betrieben mit geringem zeitlichem Abstand zwischen den Impfungen ausgewählt. Den zehn Rindern im jeweiligen Betrieb aus dem oben beschriebenen Versuch wurde, sofern sie sich noch im Betrieb befanden, kurz vor der Impfung 2009 und vier Wochen danach Nativblut entnommen. Bereits im Vorjahr geimpfte Rinder müssen im Folgejahr laut Angaben der Impfstoffhersteller nur einmal geimpft werden. Die Antikörpertiter der Tiere wurde zum Zeitpunkt des Boostes, zwei, vier und 20 Wochen danach, vor der Impfung 2009 und vier Wochen danach bestimmt. Hierzu wurden das Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) verwendet.

**Tab. III.18:** Betriebe, deren Tiere früh im Jahr 2008 geimpft wurden und Anzahl der untersuchten Rinder.

<b>Betrieb Nr.</b>	<b>Impfung '08<sup>1</sup></b>	<b>Impfung' 09</b>	<b>Abstand</b>	<b>Zahl Tiere</b>
5	25.6.	19.3.	38 Wochen	8
7	12.6.	19.3.	40 Wochen	9
8	23.6.	9.3.	37 Wochen	6

<sup>1</sup> Datum der ersten Impfung 2008

**Tab. III.19:** Betriebe, deren Tiere spät im Jahr 2008 geimpft wurden und Anzahl der untersuchten Rinder.

Betrieb Nr.	Impfung '08 <sup>1</sup>	Impfung '09	Abstand	Zahl Tiere
3	8.9.	25.3.	28 Wochen	9
11	10.10.	6.4.	26 Wochen	8

<sup>1</sup> Datum der ersten Impfung 2008

### **Impfungen und Probenentnahmen bei Schafen im zweiten Jahr der Impfung (2009)**

Die Entwicklung der Antikörpertiter bei Schafen im zweiten Jahr der Impfung wurde anhand der Gruppe 2 der Herde aus dem Betrieb Nr. 21 untersucht (siehe Abb. III.2). Die Tiere wurden 2008 (BLUEVAC-8) und 2009 (Bovilis BTV-8) mit einem Abstand von 37 Wochen geimpft. Serumantikörpertiter von allen 20 Schafen wurden zwei und vier Wochen nach der ersten Impfung, kurz vor der zweiten Impfung und zwei, vier und acht Wochen danach mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) bestimmt.

#### **2.7.2. Proben zur Bestimmung neutralisierender Antikörper**

Einige der für die oben genannten Untersuchungen entnommenen Serumproben wurden mittels SNT auf neutralisierende Ak untersucht. Es handelt sich um Seren von Rindern und Schafen nach der Grundimmunisierung und im zweiten Jahr der Impfung (Tab. III.20).

**Tab. III.20:** Proben, die zur Impfwirksamkeitskontrolle auf neutralisierende Antikörper untersucht wurden

---

#### **Schafe nach der Grundimmunisierung**

---

<b>Tiere</b>	Zehn Schafe, bei denen eine Impfkontrolle durchgeführt wurde, je fünf Tiere mit hohem und fünf mit niedrigem <sup>1</sup> Ak-Titer im ELISA
<b>BTV-Status</b>	Vor Impfung keine Ak und Genom nachweisbar
<b>Impfstatus</b>	Impfung mit BLUEVAC-8
<b>Zeitpunkt</b>	Zwei, vier und 20 Wochen nach der Impfung

---

---

### Rinder nach der Grundimmunisierung

---

<b>Tiere</b>	Zehn Rinder, bei denen eine Impfkontrolle durchgeführt wurde, je fünf Tiere mit hohem und fünf mit niedrigem <sup>1</sup> Ak-Titer im ELISA
<b>BTV-Status</b>	Vor Impfung keine Ak und Genom nachweisbar
<b>Impfstatus</b>	Impfung mit BLUEVAC-8 und BTVPUR AISap
<b>Zeitpunkt</b>	Zum Zeitpunkt des Boostes, zwei, vier und 20 Wochen danach

---

### Schafe im ersten und zweiten Jahr der Impfung

---

<b>Tiere</b>	Zehn Schafe aus dem Betrieb Nr. 21
<b>BTV-Status</b>	Vor Impfung keine Ak und Genom nachweisbar
<b>Impfstatus</b>	Impfung 2008 mit BLUEVAC-8, Impfung 2009 mit Bovilis BTV8
<b>Zeitpunkt</b>	Zwei und vier Wochen nach der ersten Impfung, kurz vor der zweiten Impfung und zwei, vier und acht Wochen danach

---

### Rinder im ersten und zweiten Jahr der Impfung

---

<b>Tiere</b>	Alle Rinder, bei denen eine Impfkontrolle durchgeführt wurde und die nach der Impfung 2009 nochmals untersucht wurden
<b>BTV-Status</b>	Vor Impfung keine Ak und Genom nachweisbar
<b>Impfstatus</b>	Impfung mit BLUEVAC-8 und BTVPUR AISap
<b>Zeitpunkt</b>	Zum Zeitpunkt des Boostes, zwei, vier und 20 Wochen danach, vor der Impfung 2009 und vier Wochen danach

---

<sup>1</sup> Hoher bzw. niedriger Titer bedeutet hier, dass die Tiere ausgewählt wurden, die die höchsten, bzw. niedrigsten Werte am gemessenen Höchstwert der ELISA-Serum-Ak-Titer im Blut aufwiesen. Dieser Höchstwert war beim Rind zwei Wochen nach dem Boost und beim Schaf zwei Wochen nach der Impfung messbar.

### 2.7.3. Untersuchungen zur BTV Serotyp Kreuzneutralisation

Weiterhin sollte überprüft werden, ob Serumproben, die nach der Impfung gegen BTV-8 in der Lage sind, diesen Serotyp zu neutralisieren, auch andere BTV-Serotypen neutralisieren können. Hierfür standen die in Kapitel III.1.5 genannten BTV-Serotypen BTV-1, BTV-2, BTV-4 und BTV-16 zur Verfügung.



Untersucht wurden Seren von sechs Rindern aus dem Betrieb Nr. 8 vier Wochen nach der Impfung 2009 und von fünf Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 vier Wochen nach der vierten Impfung.

Die Durchführung des SNT für diesen Zweck unterschied sich nicht von der Durchführung des BTV-8 SNT wie sie im Kapitel III.2.2 beschrieben ist.

#### **2.7.4. Bestimmung der IFN- $\gamma$ Sekretion**

EDTA-Blutproben einiger Tiere wurden zur Messung der zellulären Immunreaktionen gegen BTV-8 und BTV-1 mittels IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht.

PBMC von vier Rindern aus dem Betrieb Nr. 3 wurden zwei und vier Wochen sowie fünfeinhalb Monate nach dem Boost untersucht. Diese Zeitpunkte entsprechen, mit Ausnahme des letzten, denen der Impferfolgskontrolle. Der IFN- $\gamma$  Test wurde nach Protokoll 2 durchgeführt und fünfeinhalb Monate nach dem Boost als Positivkontrollen sowohl ConA als auch PWM in der Konzentration 5  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

Vier Schafe aus dem Betrieb Nr. 21 wurden zwei und vier Wochen sowie fünf Monate nach einmaliger Impfung auf zelluläre Immunreaktionen gegen BTV-8 und BTV-1 mittels IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht. Diese Zeitpunkte entsprechen ebenfalls, mit Ausnahme des letzten, denen der Impferfolgskontrolle. Der Test wurde wiederum gemäß Protokoll 2 durchgeführt und als Positivkontrollen wurden ConA in den Konzentrationen 5 und 10  $\mu\text{g/ml}$  und PHA 5  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

Weitere zehn Schafe aus dem Betrieb Nr. 21 wurden fünf Wochen nach der Impfung mittels ELISPOT gemäß Protokoll 1 untersucht.

### **2.8. Untersuchungen zur Wirkung fehlerhafter Impfstoffapplikation**

#### **Intramuskuläre und intravenöse Applikation bei Schafen**

Vor der Applikation des Impfstoffes BLUEVAC-8 beim Schaf wurde untersucht, ob im Impfstoff BTV-Genom nachweisbar ist. Dazu wurde der Impfstoff unverdünnt

sowie in einer Verdünnung von 1:10 und 1:100 mit dem QIAmp Viral RNA Kit extrahiert. Anschließend wurde eine PanBTV RT-qPCR durchgeführt.

Sechs Schafe aus dem Betrieb Nr. 21 wurden klinisch sowie auf das Vorkommen von BTV Genom und von Antikörpern gegen BTV untersucht. Die Tiere wurden in zwei gleich große Gruppen aufgeteilt. Tiere der Gruppe 1 wurden im Bereich der Schulter (M. triceps) und solche der Gruppe 2 im Bereich der V. jugularis geschoren. Anschließend wurde den Tieren der Gruppe 1 je 2 ml BLUEVAC-8 i.m. und den Tieren der Gruppe 2 i.v. injiziert. Dieser Versuch war im Vorfeld bei der zuständigen Behörde, der Regierung von Oberbayern, angezeigt worden.

Das EDTA-Blut aller Tiere wurde eine, vier und 24 Stunden nach der Impfstoffapplikation mittels PanBTV RT-qPCR untersucht. Ebenfalls 24 Stunden nach Impfung wurden die Tiere nochmals klinisch untersucht.

### **Subkutane und intramuskuläre Applikation bei Schafen**

Alle in diesem Versuch untersuchten Proben von Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 hatten zum Zeitpunkt der Applikation des Impfstoffes keine nachweisbaren Antikörper gegen BTV oder BTV-Genom. Zwanzig Schafen wurde je 2 ml BLUEVAC-8 i.m. und 55 Schafen s.c. verabreicht (siehe Abb. III.3). Die Schafe, die den Impfstoff i.m. erhielten, wurden vorher im Bereich der Injektionsstelle an der Schulter geschoren und klinisch vor und 24 Stunden nach Applikation des Impfstoffes untersucht.

Es erfolgte eine Untersuchung aller Serumproben aus beiden Gruppen auf BTV-Antikörper mittels BTV-ELISA zwei, vier und acht Wochen nach der Impfung.

### **Applikation einer erhöhten Impfstoffdosis bei Rindern**

Die Rinder aus dem Betrieb Nr. 21 erhielten 2008 als Impfung und Boost eine vierfache Dosis des Impfstoffes BTVPUR AISap. 2009 wurden sie wie vorgeschrieben mit einer Dosis Bovilis BTV8 immunisiert. Die Serumantikörpertiter der Tiere wurden zum Zeitpunkt des Boostes, zwei und vier Wochen danach, sowie vor der Impfung 2009 und zwei, vier und acht Wochen danach mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) bestimmt.

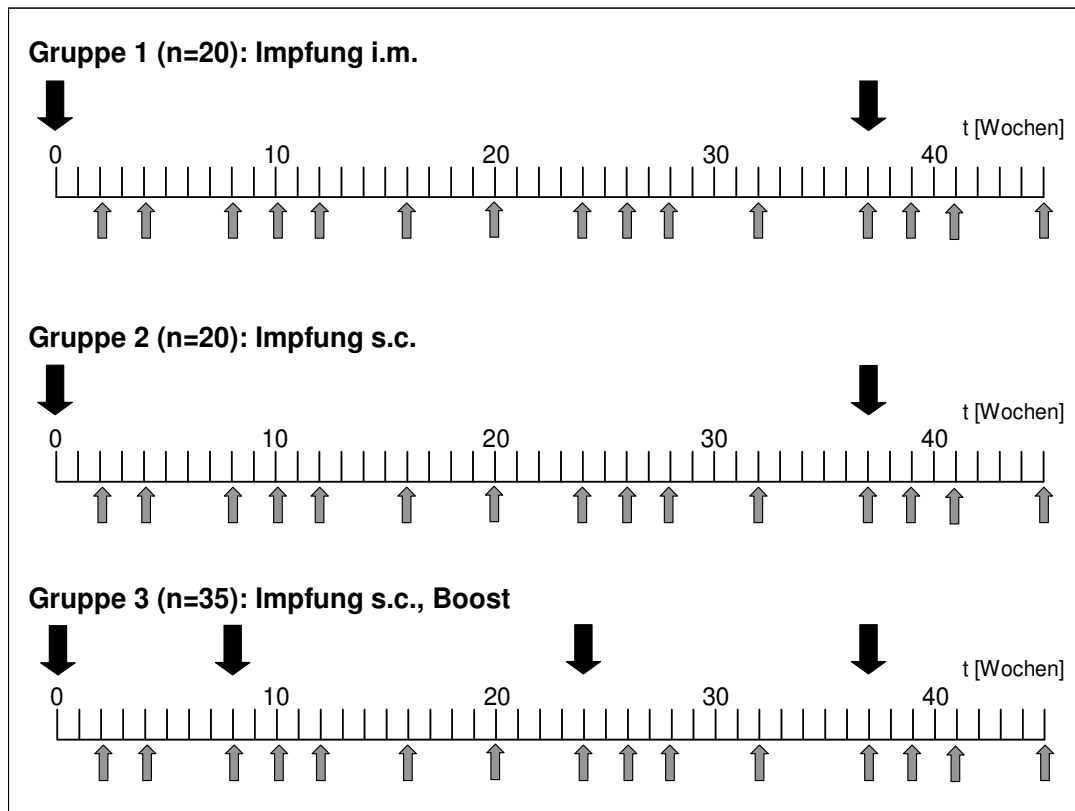
Zu den eben genannten Zeitpunkten wurden die Seren von sechs Rindern auch mittels SNT auf neutralisierende Antikörper untersucht.

PBMC von acht der Rinder wurden drei und fünf Wochen nach der Impfung 2009 auf eine zelluläre Immunreaktion gegen BTV-8 und BTV-1 im IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht. Der Test wurde gemäß Protokoll 2 durchgeführt. Als Positivkontrolle bei der Untersuchung fünf Wochen nach der Impfung 2009 diente zusätzlich zu ConA noch PWM in der Konzentration 5  $\mu\text{g/ml}$ .

## **2.9. Wiederholte Applikation des Impfstoffes bei Schafen**

Alle in diesem Versuch geimpften Schafe aus dem Betrieb Nr. 21 ( $n=35$ ) wiesen zum Zeitpunkt der ersten Impfung keine nachweisbaren Antikörper gegen BTV oder BTV-Genom auf. Die Tiere wurden zum Zeitpunkt null, acht und 24 Wochen mit je 2 ml BLUEVAC-8 s.c. geimpft. Siebenunddreißig Wochen nach der ersten Impfung wurde den Tieren im Rahmen der Pflichtimpfung 2009 je 1 ml des Impfstoffes Bovilis BTV-8 verabreicht.

Die Entnahme von Blutproben zum Nachweis von BTV-Antikörpern erfolgte je zwei und vier Wochen nach der jeweiligen Impfung, dann im Abstand von vier Wochen bis zum Zeitpunkt der nächsten Impfung (Abb. III.3). Es wurde jeweils die gesamte Herde beprobt, also auch die Tiere, die nur einmalig s.c. und i.m. geimpft worden waren.



**Abb. III.3:** Zeitpunkte der Impfung (■→) und der Entnahme von Blut (⇨) zur Bestimmung der Ak-Titer bei insgesamt 75 Schafen aus dem Betrieb Nr. 21

### 2.9.1. Antikörperbestimmung

#### ELISA

Bei allen Blutproben der wiederholt immunisierten Schafe wurde mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) der Antikörpertiter bestimmt.

#### Bestimmung neutralisierender Antikörper

Serumproben von zehn Schafen zu den Zeitpunkten zwei und vier Wochen nach der ersten, zweiten und dritten Impfung, kurz vor der vierten Impfung und zwei, vier und acht Wochen danach wurden auf neutralisierende Antikörper gegen BTV-8 im SNT untersucht.

Es wurde außerdem überprüft, ob Serumproben, die nach der Impfung gegen BTV-8 in der Lage sind, diesen Serotyp zu neutralisieren, auch andere Serotypen neutralisieren können. Hierfür standen die in Kapitel III.1.5 genannten BTV-

Serotypen BTV-1, BTV-2, BTV-4 und BTV-16 zur Verfügung. Untersucht wurden neben fünf Schafseren aus dem Betrieb Nr. 21 zwei Wochen nach der vierten Impfung auch Seren von sechs Rindern aus dem Betrieb Nr. 8 vier Wochen nach der Impfung 2009. Die Durchführung des SNT für diesen Zweck unterschied sich nicht von der Durchführung des BTV-8 SNT und wird im Kapitel III.2.2 beschrieben.

### **2.9.2. Bestimmung der zellulären Immunreaktion**

Zur Messung der zellulären Immunreaktion gegen BTV-8 und BTV-1 wurden PBMC von zwei Schafen vier Wochen nach der zweiten Impfung mit Protokoll 1 untersucht. Dabei wurden die Blockingpuffer modifiziert. Statt nur mit 5 % FBS wurde auch mit 10 % FBS und 5 % und 10 % Magermilch geblockt. Als Positivkontrollen wurden ConA, PHA und PWM jeweils in der Konzentration 5 µg/ml eingesetzt.

Weiterhin wurden Blutproben von drei Schafen eine Woche nach der dritten Impfung im IFN-γ ELISPOT anhand des Protokolls 2 untersucht. Als Positivkontrollen dienten ConA in den Konzentrationen 5, 8 und 10 µg/ml, und PHA in den Konzentrationen 3 und 5 µg/ml.

### **2.10. Untersuchung der Immunreaktionen bei natürlich infizierten Rindern**

Aus der Routinediagnostik des LGL standen einige Proben von Tieren zur Verfügung, bei denen BTV-8 Genom nachweisbar war (siehe Tab. III.21). Über diese Tiere lagen, mit Ausnahme von denen aus dem Betrieb Nr. 22, keine weiterreichenden Informationen oder weitere Proben vor.

Proben von Tieren aus dem Betrieb Nr. 22 wurden zum Teil an mehreren Zeitpunkten mit den im Folgenden genannten Tests untersucht.

Bei der Bestimmung der Herdenprävalenz wurden bei Seren einiger Tiere schon vor der Impfung Antikörper gegen BTV im ELISA nachgewiesen. Diese zählen ebenfalls zu den natürlich infizierten Tieren.

**Tab. III.21:** Betriebe mit Tieren aus der Routinediagnostik des LGL, bei denen mittels BTV-PCR BTV-8 Genom nachweisbar war

Betrieb	Beschreibung
Betrieb Nr. 22	Mutterkuhherde (n=18), wurde untersucht wegen BT-Symptomen einer Kuh, gleichzeitige Impfung
Lkr. Dachau	Rinder sind geimpft und geboostet, Nachweis von BTV-8 Genom zwei Monate nach dem Boost.
Lkr. Miltenberg	Mutterkuhherde, Rinder sind geimpft und geboostet, ein Tier fällt zwei Monate nach dem Boost klinisch auf

Bei allen oben genannten Proben wurden mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) der Antikörpertiter bestimmt und sie wurden auf neutralisierende Antikörper untersucht.

### Zelluläre Immunreaktion

Vier Rinder aus dem Betrieb Nr. 22, in deren Blut bei der ersten Probennahme BTV-8-Genom nachweisbar war, wurden ausgewählt. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Probennahme gegen BTV-8 geimpft worden. Die Blutproben der vier Tiere wurden vier Wochen nach der Impfung im IFN- $\gamma$  ELISPOT auf eine zelluläre Immunreaktion untersucht. Es wurde das Protokoll 1 angewendet und ConA in den Konzentrationen 5, 3 und 1  $\mu\text{g/ml}$  als Positivkontrolle eingesetzt.

Alle Tiere in dem Betrieb wurden 2008 grundimmunisiert und 2009 nochmals geimpft. Drei Wochen nach der Impfung 2009 wurden EDTA-Blutproben von drei Rindern auf ihre zelluläre Immunreaktion im IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht. Bei einem der Rinder war im Vorjahr BTV-8 Genom nachgewiesen worden. Es kam Protokoll 2 zum Einsatz. Als Positivkontrollen dienten ConA und PHA in der Konzentration von je 5  $\mu\text{g/ml}$ . Außerdem wurde die Multiplicity of Infection (MOI) der Viren zur Restimulation variiert. BTV-8 wurde als MOI  $\sim 0,1$ ,  $\sim 1$  und  $\sim 10$  eingesetzt; BTV-1 als MOI  $\sim 1$  und  $\sim 10$ .

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Fragebogen

Informationen zu den Standorten der Betriebe und der Anzahl der gehaltenen Tiere sind im Kapitel III.1.1 aufgeführt. Weitere Informationen zu Rassen, Nutzung und Haltung sind im Anhang Kapitel IX.2.1 zu finden.

Die Art der Aufstallung und der Weidegang von Tieren, bei denen vor der Impfung gegen BTV-8 Antikörper gegen ebendieses nachgewiesen werden konnten, sind in Tab. IV.1 aufgeführt.

**Tab. IV.1:** Im Fragebogen erhobene Daten von Betrieben mit Ak-positiven Tieren vor der Impfung

	Betrieb Nr	6	11	13	22
Rind	Weidegang	ganzjährig	kein	saisonal	ganztags saisonal
	Stall	Laufstall	Laufstall	Anbindestall	Anbindestall
Schaf	Weidegang	saisonal	saisonal	/	/

#### 1.1. Zukäufe und Abgänge

Detaillierte Angaben über Zukäufe und Tierverluste in den letzten zwei Jahren vor der Befragung (2006-2008) sind im Anhang in Kapitel IX.2.1 zu finden.

#### 1.2. Symptome

Bei zwei der untersuchten Betriebe (Nr. 14 und Nr. 22) wurde bereits vor Beginn der Studie bei je einem Tier klinisch BT festgestellt und labordiagnostisch bestätigt. Beide Tiere hatten die Krankheit überlebt. Über klinische Befunde wie sie bei BT auftreten können berichteten nur die zwei Leiter der oben genannten Betriebe. Diese Symptome waren geschwollene Lippen, Zunge, und Augenlider, Bläschen im Maul, Speicheln, Nasenausfluss, Augenausfluss, Klauenläsionen, Zitzenläsionen und Fieber.

Angaben über Reproduktionsstörungen und sonstige Symptome sind im Anhang in Kapitel IX.2.1 aufgeführt.

## **2. Herdenprävalenz von BTV-8**

In den 22 ausgewählten Betrieben wurden insgesamt 714 Rinder und 478 Schafe untersucht (siehe dazu Tab. III.1). In Serumproben von neun Rindern und einem Schaf wurden Antikörper gegen BTV bereits vor der Impfung gegen BTV-8 nachgewiesen. Diese Rinder sowie diejenigen aus der Routinediagnostik des LGL werden eingehender im Kapitel IV.6: „Untersuchung der Immunreaktionen bei natürlich infizierten Rindern“ besprochen.

BTV Genom konnte nur in einigen Diagnostikproben des LGL nachgewiesen werden. Dazu gehören auch Proben aus dem Betrieb Nr. 22. Diese Ergebnisse werden ebenfalls im Kapitel IV.6: „Immunreaktionen bei natürlich infizierten Rindern“ besprochen.

## **3. Impfwirksamkeitskontrolle**

Für die Impfwirksamkeitskontrolle wurden Proben von je zehn Tieren pro Tierart im jeweiligen Betrieb zu mehreren Zeitpunkten nach der Impfung untersucht.

### **3.1. Antikörperentwicklung (ELISA)**

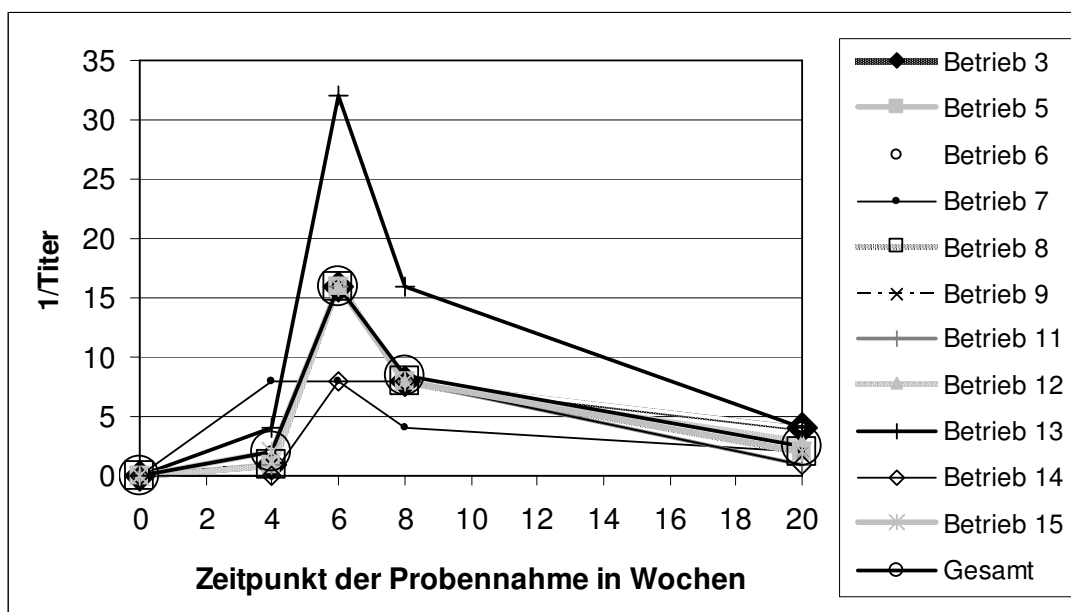
In keiner der EDTA-Blutproben der Tiere war vor der Impfung gegen BTV-8 BTV Genom nachweisbar. Dasselbe gilt für die darauf folgenden Zeitpunkte der Untersuchung mittels RT-qPCR. Das heißt, dass die Antikörper, die nachgewiesen wurden, ausschließlich auf der Wirkung der Impfung beruhten. Die Untersuchungszeitpunkte von Rindern und Schafen sind im Abschnitt Material und Methoden in Tab. III.13 dargestellt.

In keiner Serumprobe der dargestellten Tiere wurden zum Zeitpunkt der Impfung BTV-8 Antikörper nachgewiesen.



### 3.1.1. Antikörpertiter von Schafen und Rindern nach der Grundimmunisierung

Die Mediane der Ak-Titer der Rinderseren in den jeweiligen Betrieben lagen zum Zeitpunkt des Boostes zwischen 1:1 (d.h. Ak sind nur im unverdünnten Serum nachweisbar) und 1:8. Der Mittelwert der Mediane, also der Median aller untersuchten Rinderseren unabhängig von der Aufteilung in Betriebe ( $Med_{ges}$ ), lag bei 1:2. Zwei Wochen nach dem Boost stieg der  $Med_{ges}$  auf 1:16. Dies stellt auch das Maximum der gemessenen Werte dar. Vier Wochen nach dem Boost fiel der  $Med_{ges}$  auf 1:8 und lag 20 Wochen nach der ersten Impfung bei 1:2.

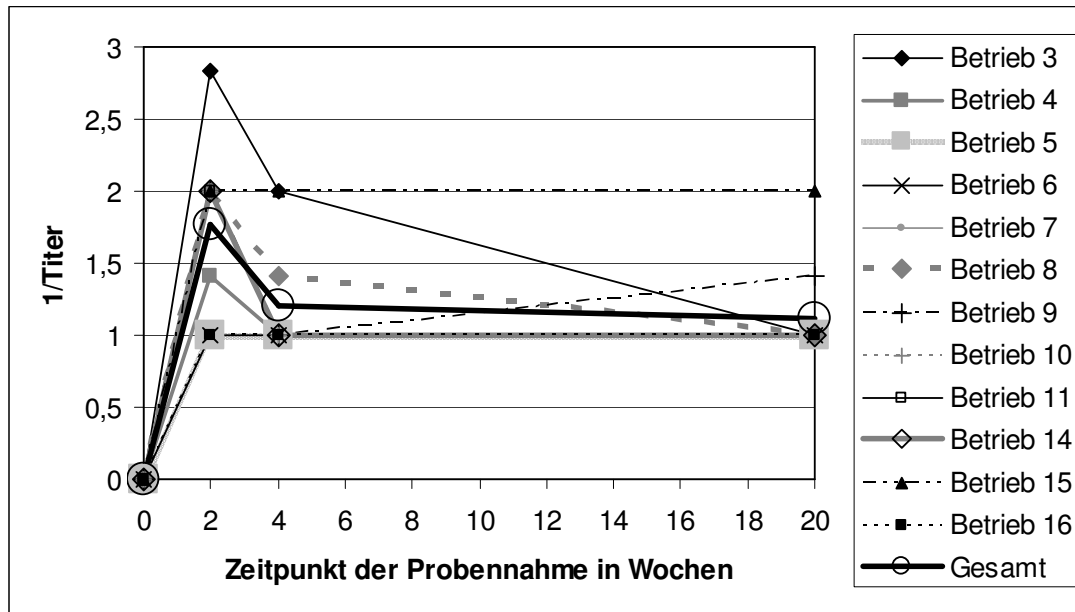


**Abb. IV.1:** Mediane der ELISA-Serum-Ak-Titer von Rindern nach der Impfung gegen BTv-8; Applikation des Impfstoffes bei Zeitpunkt 0 und 4 (Boost); Gesamt (großer Kreis): Mittelwert der Mediane

Die Mediane der Rinderseren der einzelnen Betriebe folgten diesem Trend mit Ausnahme von denen aus Betrieb Nr. 7. Hier lag der Median der Ak-Titer zum Zeitpunkt des Boostes und auch zwei Wochen danach bei 1:8 und fiel dann auf 1:4 und schließlich auf 1:2.

Bei den untersuchten Schafseren waren zwei Wochen nach der Impfung Antikörpertiter im Median von 1:1 bis 1:3, im Mittel ( $Med_{ges}$ ) 1:2 nachweisbar. Der  $Med_{ges}$  lag vier und auch 20 Wochen nach der Impfung bei 1:1. Die Proben von Schafen aus den Betrieben Nr. 5, 6 und 18 folgten diesem Trend nicht. Hier waren

zwei Wochen nach der Impfung lediglich im unverdünnten Serum Antikörper nachweisbar.

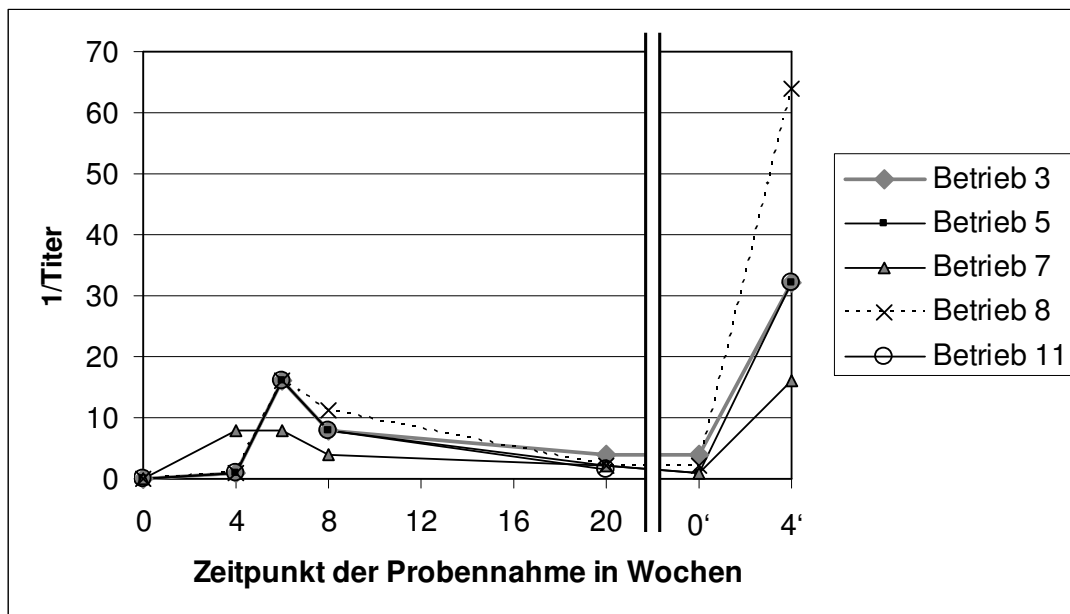


**Abb. IV.2:** Mediane der ELISA-Serum-Ak-Titer von Schafen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Impfung gegen BTV-8;

Gesamt (großer Kreis): Mittelwert der Mediane

### 3.1.2. Antikörperentwicklung bei Rindern im zweiten Jahr der Impfung

Proben von Rindern aus fünf Betrieben, die zum Zeitpunkt der Impfung 2009 und vier Wochen danach untersucht wurden wiesen vier Wochen nach der Impfung 2009 Ak-Titer von 1:16 bis 1:64 im Median bezogen auf den jeweiligen Betrieb auf. Diese waren deutlich höher als vier Wochen und auch als zwei Wochen nach dem Boost 2008. Hier lagen die Mediane der Titer bei 1:8 bis 1:16 (zwei Wochen), bzw. 1:4 bis 1:11 (vier Wochen nach dem Boost).



**Abb. IV.3:** Mediane der ELISA-Ak-Titer von Rinderseren nach der Impfung 2008 und 2009; Applikation des Impfstoffes bei 0, 4 (Boost) und 0' (entspricht der Impfung 2009); 4': Probennahme vier Wochen nach der Impfung bei 0'

Die untersuchten Tiere wurden in zwei Gruppen zusammengefasst: In eine mit einem kleineren zeitlichen Abstand (26 bis 28 Wochen) zwischen den Impfungen 2008 und 2009 und eine mit größerem Abstand (37 bis 40 Wochen). Zum Zeitpunkt der Impfung 2009 betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit des Unterschiedes der beiden Gruppen  $p = 0,077$ . Dieser Unterschied war also nicht signifikant. Vier Wochen nach der Impfung 2009 lag  $p$  bei 0,8230.

Rinder aus dem Betrieb Nr. 21 wurden 2008 mit der jeweils vierfachen Dosis BTVPUR AISap geimpft und geboostet (siehe Kapitel IV.4.3). Die Ergebnisse der Untersuchung der Seren dieser Rinder werden in die folgenden Vergleiche mit einbezogen.

Die Rinder aus den Betrieben 3, 5 und 7 wurden in einer Gruppe zusammengefasst, da sie mit denselben Impfstoffen immunisiert wurden. Die Betriebe Nr. 8, 11 und 21 konnten nicht zusammengefasst werden, da die Tiere mit jeweils anderen Impfstoffen in Kombination geimpft wurden. Die eingesetzten Impfstoffkombinationen in den Betrieben sind in Tab. IV.2 angegeben.

**Tab. IV.2:** Betriebe und Impfstoffkombinationen in den Jahren 2008 und 2009

Betr.Nr.	3	5	7	8	11	21
2008	BLUEVAC-8			BTVPUR	BLUEVAC-8	BTVPUR <sup>1</sup>
2009	BTVPUR AISap			Bovilis BTV-8	Bovilis BTV-8	Bovilis BTV-8

<sup>1</sup> Vierfache Dosis

In Tab. IV.3 sind die Signifikanzwerte der Unterschiede im Vergleich der Antikörpertiter der Rinderseren aus den Betrieben Nr. 3, 5, 7, sowie 8 und 11 mit Betrieb Nr. 21 dargestellt. Nur die ELISA-Serum-Ak-Titer der hyperimmunisierten Rinder aus dem Betrieb Nr. 21 hatten beim Vergleich mit den Titern der Rinder aus den anderen Betrieben bei einem bis drei Zeitpunkten der Probennahme p-Werte unter 0,05, d.h. diese Unterschiede der Antikörpertiter waren signifikant. Die Unterschiede zwischen den Serumantikörpertitern der Tiere aus den Betrieben Nr. 3, 5, 7 und den Betrieben Nr. 8 und 11 ergaben zu allen untersuchten Zeitpunkten nicht signifikante p-Werte über 0,05. Diese sind daher nicht dargestellt.

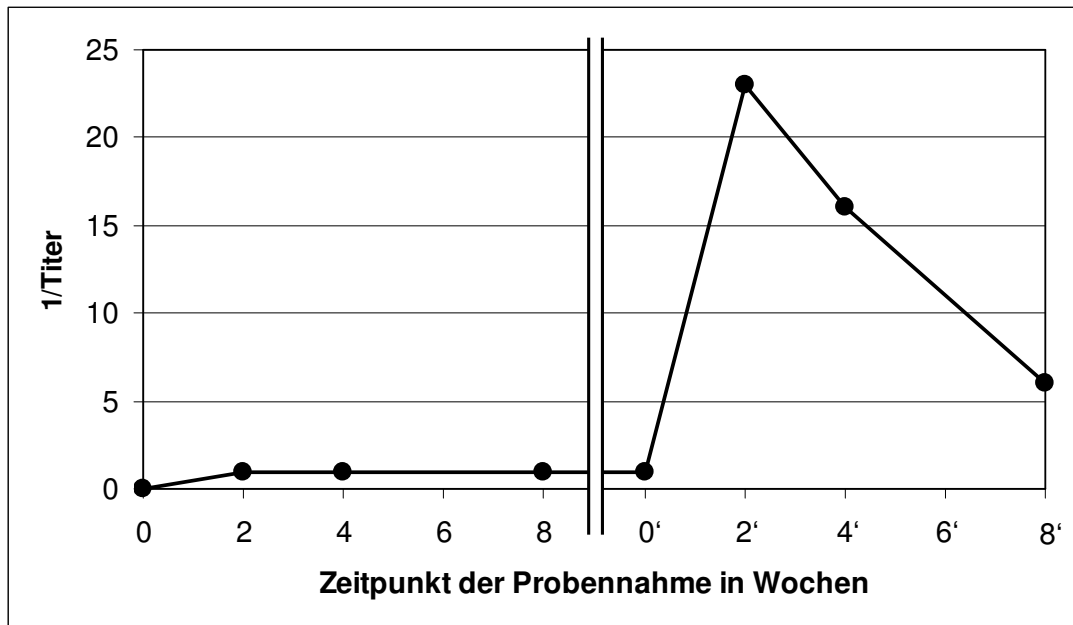
**Tab. IV.3:** p-Werte der Vergleiche von ELISA-Ak-Titern von Rinderseren aus den genannten Betrieben nach Impfungen verschiedenen Impfstoffkombinationen

Bezugsbetrieb 21	Vergleichsbetriebe		
	3, 5, 7	8	11
<b>Boost</b>	0,166	0,049	< 0,001
<b>2 Wochen nach dem Boost</b>	0,007	0,001	0,036
<b>4 Wochen nach dem Boost</b>	< 0,001	0,030	0,007
<b>Impfung 2009</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<b>4 Wochen nach der Impfung 09</b>	< 0,001	0,270	< 0,001

### 3.1.3. Antikörperentwicklung bei Schafen im zweiten Jahr der Impfung

Die Bildung der ELISA-Antikörpertiter bei Schafen der Gruppe 2 der Herde aus dem Betrieb Nr. 21 verlief nach der ersten Impfung mit BLUEVAC-8 mit einem Titer von 1:2 im Median zwei Wochen nach der Impfung deutlich schwächer als nach

der Impfung 2009 mit Bovilis BTV-8. Hier lag der mediane Antikörpertiter zwei Wochen nach der Impfung bei 1:23 (Abb. IV.4).



**Abb. IV.4:** Medianer Antikörpertiter von 20 Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 nach der Grundimmunisierung 2008 (0) und der Impfung 2009 (0'); 2', usw.: Wochen nach der Impfung 0'

### 3.2. Entwicklung der neutralisierenden Antikörper

#### 3.2.1. Neutralisierende Antikörper bei Rindern und Schafen nach der Grundimmunisierung

Es wurden fünf Schafe ausgewählt, die zwei Wochen nach der Impfung (höchster Ak-Titer aus den untersuchten Zeitpunkten) im ELISA die niedrigsten Antikörpertiter aus allen untersuchten Schafen aufwiesen. Diese lagen zwischen 1:1 und 1:2. Kein Serum der Schafe konnte zu den untersuchten Zeitpunkten das BT-Virus im SNT neutralisieren.

Auch die Seren der fünf Schafe mit den höchsten ELISA-Serum-Ak-Titern zwischen 1:4 und 1:16 konnten das BT-Virus im SNT zu keiner Zeit neutralisieren.

Es wurden fünf Rinder mit den niedrigsten ELISA-Serum-Ak-Titern zwei Wochen nach dem Boost (Zeitpunkt höchster gemessener ELISA-Serum-Ak-Titer)

ausgewählt. Die Serumproben hatten zu dem Zeitpunkt Titer zwischen 1:4 und 1:8. Proben von vier dieser Rinder konnten das BT-Virus im SNT zu keinem untersuchten Zeitpunkt neutralisieren. Bei Serumproben von Rind Nr. 6 aus dem Betrieb Nr. 9 konnten als einziges neutralisierende Antikörper festgestellt werden (Tab. IV.4). Die Antikörpertiter der Seren dieses Rindes lagen im ELISA unter dem Mittelwert der Mediane aller untersuchten Rinder und auch unter dem Median der Rinderseren des eigenen Betriebes Nr. 9 (siehe dazu Abb. IV.1). Die Antikörpertiter im SNT lagen zum Zeitpunkt des Boostes und zwei Wochen danach leicht über den Titern im ELISA. Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten waren die Titer gleich.

**Tab. IV.4:** Antikörpertiter des Rindes Nr. 6 aus dem Betrieb Nr. 9 im ELISA und SNT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung gegen BTV-8

	<b>Impfung</b>	<b>Boost</b>	<b>6 Wochen</b>	<b>8 Wochen</b>	<b>20 Wochen</b>
<b>ELISA</b>	nn	1:1	1:4	1:4	1:2
<b>SNT</b>	nn	1:3	1:6	1:4	1:2

Boost = 4 Wochen nach der Erstimpfung; nn: nicht nachweisbar

Dieses Rind wurde nicht wie die anderen vier in diesem und weitere fünf im nächsten Versuch untersuchten Tiere mit dem Impfstoff BLUEVAC-8, sondern mit BTVPUR geimpft und geboostet (siehe dazu im Abschnitt Material und Methoden Tab. III.15).

Die Werte der fünf Rinderseren mit den höchsten ELISA-Serum-Ak-Titern zwei Wochen nach dem Boost (Zeitpunkt höchster gemessener ELISA-Serum-Ak-Titer) lagen zwischen 1:64 und 1:128. Keine dieser Serumproben zeigte eine Neutralisierung von BTV-8.

### **3.2.2. Neutralisierende Antikörper bei Rindern im zweiten Jahr der Impfung**

Es wurden Rinderseren aus vier Betrieben nach den Impfungen 2008 und 2009 auf neutralisierende Antikörper untersucht. Die Tiere wurden mit unterschiedlichen Impfstoffkombinationen immunisiert. Tiere aus den Betrieben Nr. 3 und 5 wurden 2008 mit BLUEVAC-8 grundimmunisiert und 2009 einmalig mit BTVPUR AISap8

geimpft. Tiere aus dem Betrieb Nr. 8 erhielten 2008 zur Grundimmunisierung BTVPUR AISap 8 und 2009 einmalig Bovilis BTV-8. Im Betrieb Nr. 11 fand der Impfstoff BLUEVAC-8 2008 Anwendung und im darauf folgenden Jahr wurde einmalig Bovilis BTV-8 eingesetzt (siehe auch Tab. IV.2).

Es wurden nicht alle Rinderseren, die im Ak-ELISA untersucht wurden, auch im SNT untersucht. Daher unterscheiden sich die hier angegebenen Ak-ELISA-Titer zum Teil von denen aus dem Kapitel IV.3.1.2.

Bei den untersuchten Rinderseren aus dem Betrieb Nr. 3 lag der Median der ELISA-Serum-Ak-Titer beim Boost bei 1:1, zwei Wochen später bei 1:16 und vier Wochen später bei 1:12. Nach der Impfung 2009 stieg er von 1:4 auf 1:64 an (siehe Abb. IV.6).

Im SNT waren erst vier Wochen nach der letzten Impfung 2009 neutralisierende Ak nachweisbar. Die Höhe der Titer ist mit 1:1 bis 1:11 deutlich niedriger als im Ak-ELISA (Tab. IV.5).

**Tab. IV.5:** Antikörpertiter im ELISA und SNT von sieben Rindern aus dem Betrieb Nr. 3 vier Wochen nach der Impfung 2009

Rinder	3-1	3-2	3-3	3-5	3-6	3-8	3-11	Median
<b>ELISA</b>	1:64	1:16	1:16	1:64	1:128	1:128	1:8	1:64
<b>SNT</b>	1:8	1:6	1:8	1:8	1:11	1:6	1:1	1:8

Bei Rinderseren aus dem Betrieb Nr. 5 lag der Median der ELISA-Ak-Titer beim Boost bei 1:1, zwei Wochen später bei 1:11 und vier Wochen später bei 1:6. Nach der Impfung 2009 stieg er von 1:2 auf 1:32 an (siehe Abb. IV.6).

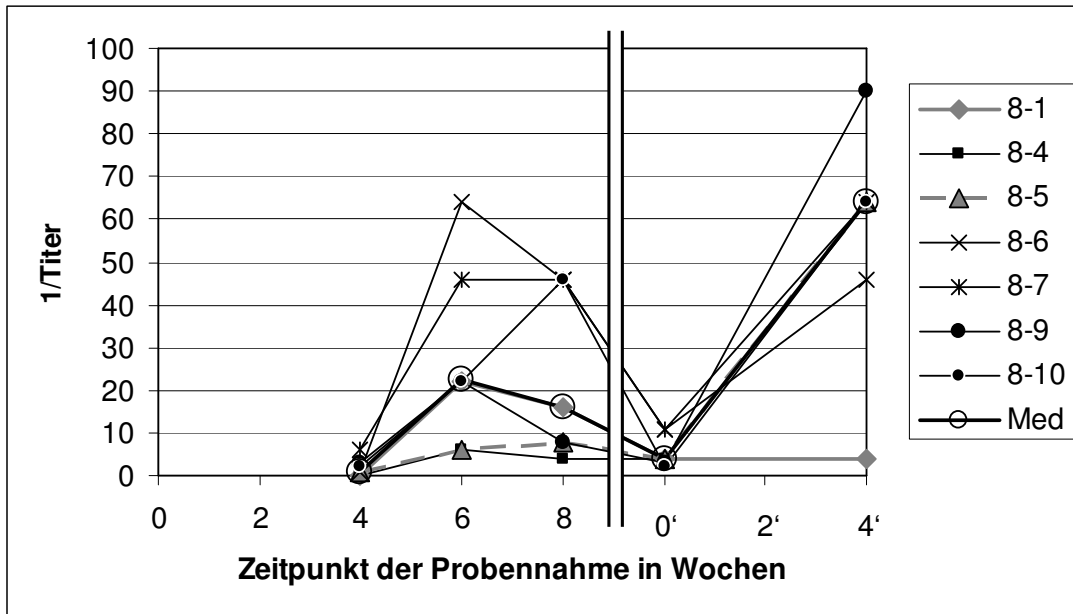
Im SNT waren wiederum erst vier Wochen nach der letzten Impfung 2009 neutralisierende Ak nachweisbar. Die Höhe der Titer ist Tab. IV.6 zu entnehmen.

**Tab. IV.6:** Antikörpertiter im ELISA und SNT von sieben Rindern aus dem Betrieb Nr. 5 vier Wochen nach der Impfung 2009

Rinder	5-2	5-3	5-4	5-5	5-6	5-10	Median
ELISA	1:16	1:64	1:32	1:32	1:8	1:64	1:32
SNT	1:1	1:6	1:2	1:3	nn	1:11	1:3

nn: nicht nachweisbar

Bei den Seren von Rindern im Betrieb Nr. 8 lag der Median der ELISA-Serum-Ak-Titer beim Boost (BTVPUR AISap 8) bei 1:1, zwei und vier Wochen später bei 1:8. Nach der Impfung 2009 mit Bovilis BTV 8 stieg er von 1:2 auf 1:64 an (siehe Abb. IV.6).

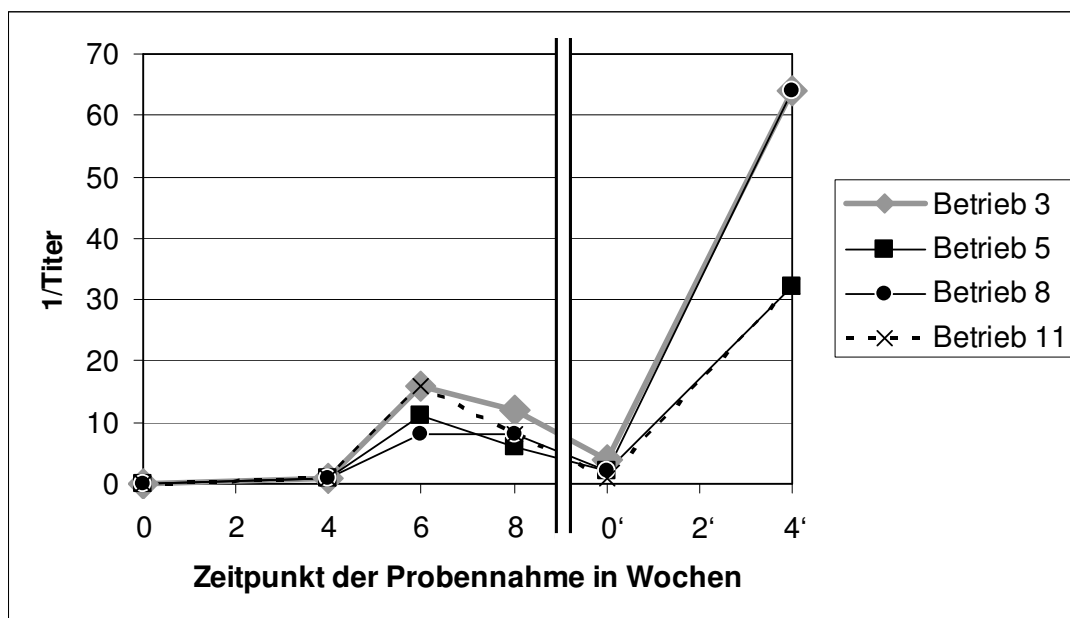


**Abb. IV.5:** SNT Titer von Seren von sieben Rindern aus dem Betrieb Nr. 8 und deren Median (Med); Impfungen bei 0, 4 und 0'; 2', 4': Wochen nach der Impfung 0'.

Im SNT waren bereits zwei Wochen nach dem Boost neutralisierende Ak mit einem Titer von 1:23 im Median nachweisbar. Dieser Wert und auch derjenige von 1:16 vier Wochen nach dem Boost lagen höher als die Titer im Ak-ELISA. Vier Wochen nach der Impfung 2009 stieg der SNT-Ak-Titer von 1:4 auf 1:64 im Median an. Dies entspricht dem Median im Ak-ELISA.



Bei Tieren aus dem Betrieb Nr. 11 lag der Median der ELISA-Serum-Ak Titer beim Boost bei 1:1, zwei und vier Wochen später bei 1:16 und 1:8. Nach der Impfung 2009 stieg er von 1:1 auf 1:32 an (siehe Abb. IV.6).



**Abb. IV.6:** ELISA-Serum-Ak-Titer der Rinderseren nach den Impfungen 2008 und 2009, die auch im SNT untersucht wurden; Impfung bei 0, 4 (Boost) und 0' (Impfung 2009); 2', usw.: Wochen nach der Impfung 0'.

Im SNT konnten zwei Wochen nach dem Boost die unverdünnten Seren der Rinder Nr. 2 und 3 BTV-8 neutralisieren. Bei sieben von acht Rindern waren vier Wochen nach der Impfung 2009 neutralisierende Ak nachweisbar. Die Höhe der Titer ist Tab. IV.7 zu entnehmen. Sie sind mit 1:2 bis 1:32 mindestens eine log-Stufe niedriger als die ELISA-Serum-AK-Titer.

**Tab. IV.7:** Antikörpertiter im ELISA und SNT von acht Rindern aus dem Betrieb Nr. 11 vier Wochen nach der Impfung 2009

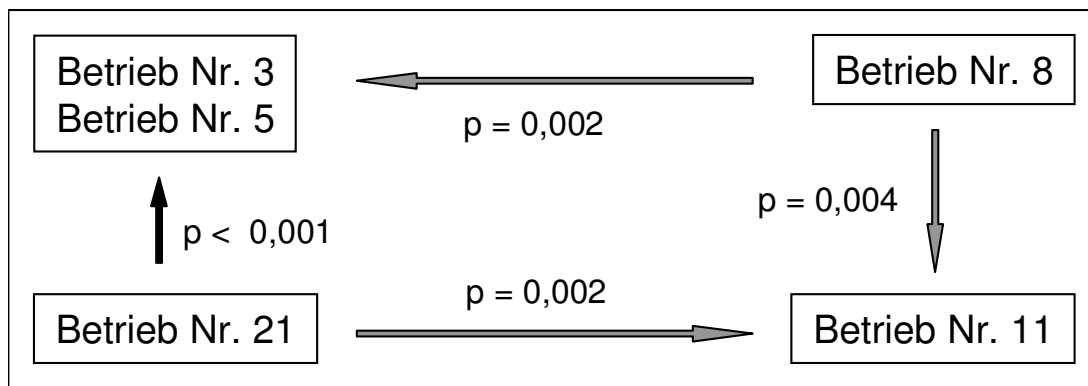
Rinder	11-1	11-2	11-3	11-4	11-5	11-7	11-8	11-10	Median
ELISA	1:4	1:16	1:32	1:32	1:32	1:64	1:32	nu	1:32
SNT	nn	1:3	1:8	1:3	1:11	1:32	1:11	1:2	1:7

nn: nicht nachweisbar; nu: nicht untersucht

Die Unterschiede in den Ergebnissen der unterschiedlich geimpften Tiere im SNT wurden auf ihre Signifikanz überprüft (Abb. IV.7). Tiere aus den Betrieben Nr. 3

und 5 wurden einer Gruppe zugeordnet, da dieselben Impfstoffe verwendet wurden. Die Betriebe Nr. 8, 11 und 21 (Kapitel IV.4.3) konnten nicht zusammengefasst werden, da die Tiere mit jeweils anderen Impfstoffen in Kombination geimpft wurden. Es wurden in Abb. IV.7 nur Beziehungen als Pfeile dargestellt, wenn  $p \leq 0,05$  war.

Die SNT-Ak-Titer sind bei Seren von Rindern aus dem Betrieb Nr. 3 und Nr. 5 vier Wochen nach der Impfung 2009 niedriger als bei Seren von Rindern aus dem Betrieb Nr. 21 und Nr. 8. Die Ak-Titer der Rinderseren aus dem Betrieb Nr. 11 sind ebenfalls niedriger als die Titer der Rinderseren aus Betrieb Nr. 21 und Nr. 8.



**Abb. IV.7:** Signifikanz der Unterschiede zwischen den SNT-Ak-Titern vier Wochen nach der Impfung 2009 bei fünf Betrieben;

Impfstoffe: Betrieb Nr. 3 und Nr. 5: 2008 BLUEVAC-8, 2009 BTVPUR AISap 8

Betrieb Nr. 8: 2008 BTVPUR AISap 8, 2009 Bovilis BTV-8

Betrieb Nr. 11: 2008 BLUEVAC-8, 2009 Bovilis BTV-8

Betrieb Nr. 21: 2008 BTVPUR AISap 8 (4-fache Dosis), 2009 Bovilis BTV-8

Pfeile weisen von höheren zu niedrigeren SNT-Ak-Titern

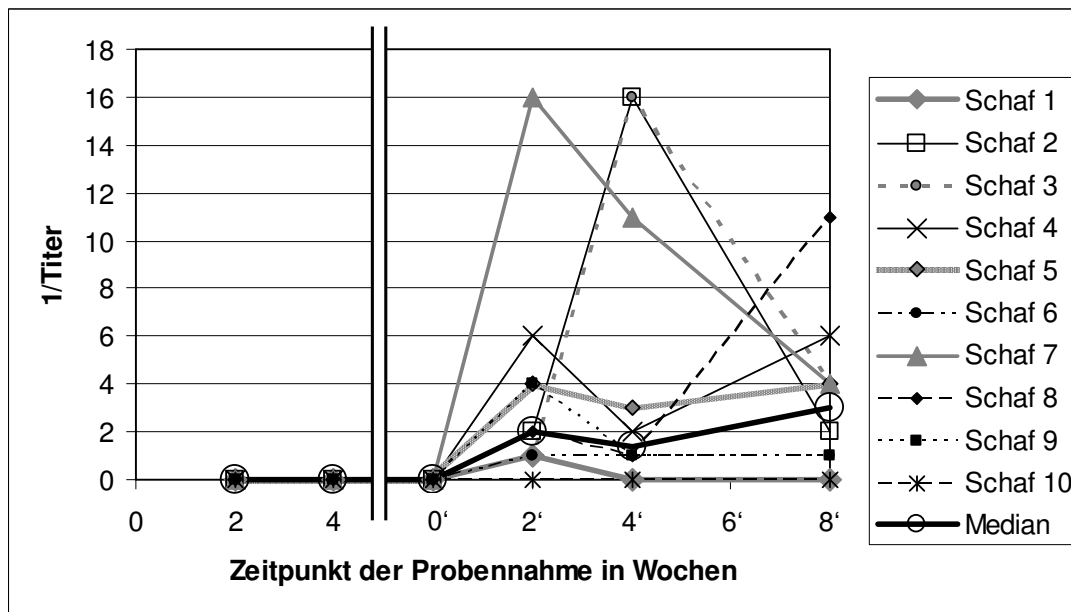
Grauer Pfeil:  $p < 0,05$ ; Schwarzer Pfeil:  $p < 0,001$

### 3.2.3. Neutralisierende Antikörper bei Schafen im zweiten Jahr der Impfung

Die Mediane der ELISA-Serum-Ak-Titer der Schafseren lagen zwei Wochen nach der ersten Impfung bei 1:2 und zwei Wochen nach der zweiten Impfung bei 1:64.

Im SNT waren erstmals zwei Wochen nach der zweiten Impfung neutralisierende Antikörper messbar. Serumproben von neun von zehn Tieren konnten das Virus zu diesem Zeitpunkt mit einem Titer zwischen 1:1 und 1:16 neutralisieren (Abb.

IV.8). Der Median der Ak-Titer betrug hier 1:2, sank vier Wochen nach der Impfung auf 1:1 ab um dann nochmals vier Wochen später auf 1:3 anzusteigen.

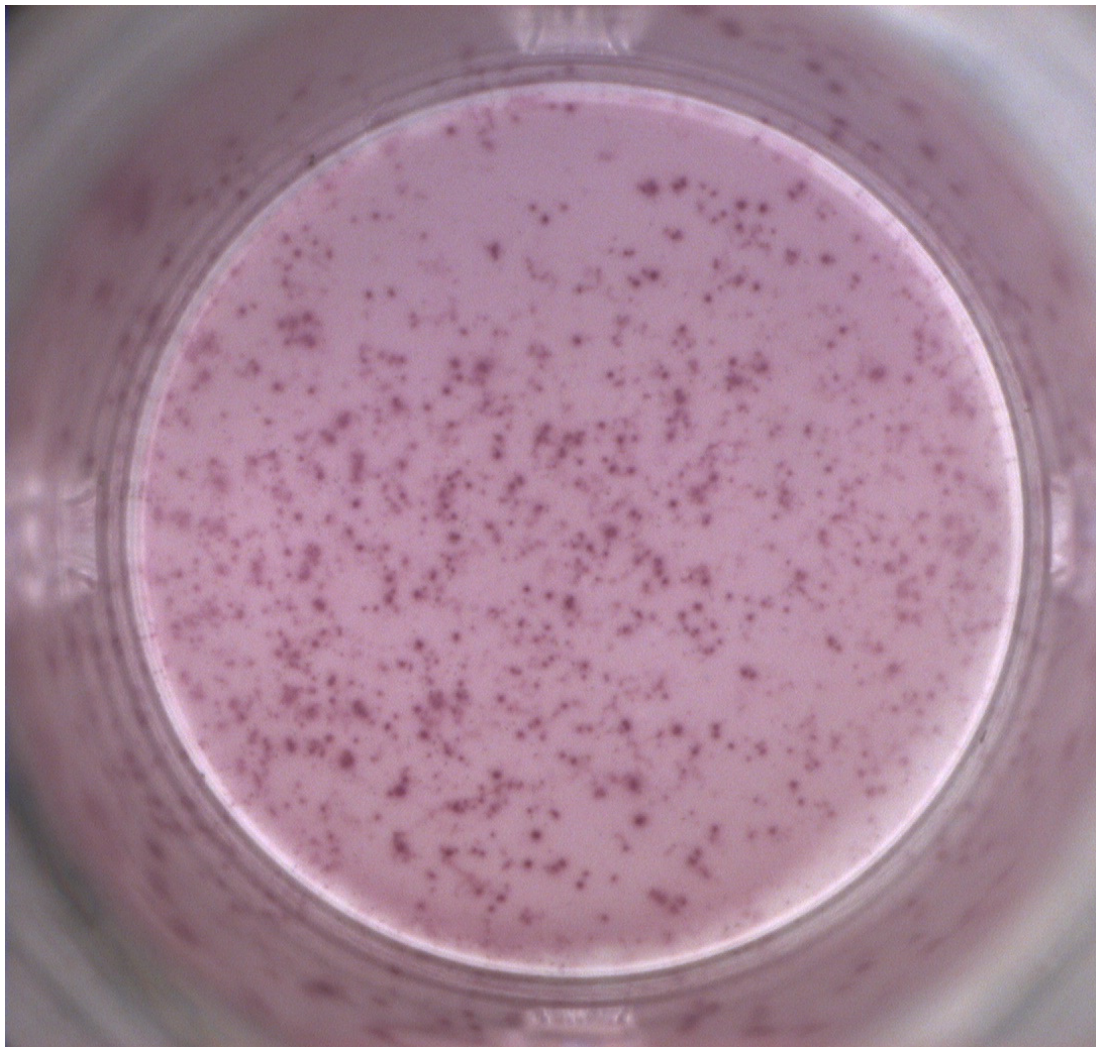


**Abb. IV.8:** SNT-Ak-Titer von zehn Schafen nach zwei Impfungen gegen BTV-8; Impfung bei 0 und 0'; 2', usw.: Wochen nach der Impfung 0'

Das Ergebnis der Untersuchung der Seren von sechs Rindern aus dem Betrieb Nr. 8 auf Kreuzneutralisation wird in Kapitel 0, „Wiederholte Applikation des Impfstoffes“ dargestellt.

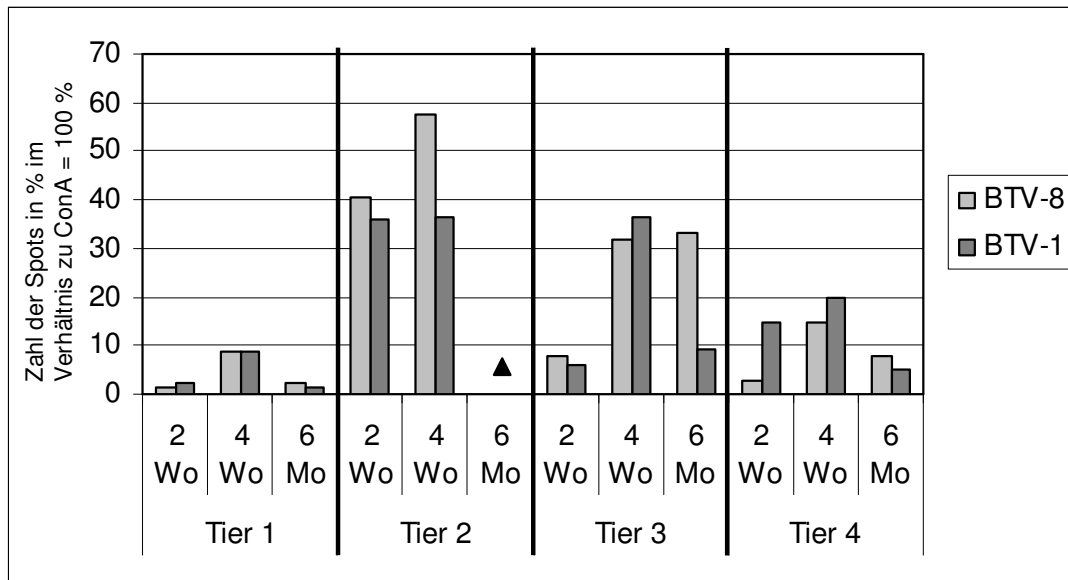
### 3.3. Zelluläre Immunreaktion

Die PBMC bei allen IFN- $\gamma$  ELISPOTs wurden auch auf eine Blastenbildung im Inversmikroskop beurteilt. Von den Mitogenen rief PHA die stärksten Reaktionen hervor, gefolgt von ConA. Mit PWM stimulierte Zellen bildeten kaum Blasten. Nach der Restimulation mit BTV-8 und BTV-1 war keine, oder allenfalls eine schwache Blastenbildung zu sehen.



**Abb. IV.9:** Positivkontrolle: IFN- $\gamma$  spezifische Spots nach der ConA Stimulation der PBMC eines Rindes

Es wurden PBMC aus EDTA-Blutproben von vier geimpften Rindern zwei und vier Wochen sowie fünfeinhalb Monate nach dem Boost im IFN- $\gamma$  ELISPOT auf Spotbildung untersucht. Es ließ sich bei allen vier Rindern ein prozentualer Anstieg der IFN- $\gamma$  spezifischen Spotzahlen im Verhältnis zur ConA Stimulation (100 %) zwischen zwei und vier Wochen nach dem Boost nachweisen. Im sechsten Monat nach dem Boost waren die Werte wieder abgefallen (siehe Abb. IV.10).



**Abb. IV.10:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation von PBMC von vier Rindern aus dem Betrieb Nr. 3 zwei und vier Wochen sowie fünfenehalb Monate nach dem Boost gegen BTV-8;

▲ = nicht auswertbar, da ConA 5 $\mu$ g/ml < 100 Spots

Die Stimulation mit ConA war fünfenehalb Monate nach dem Boost bei den PBMC von Rind Nr. 2 nicht erfolgreich. Es konnten weniger als 100 IFN- $\gamma$  spezifische Spots gezählt werden. Dieses Rind reagierte jedoch als einziges auf die Stimulation mit PWM mit der Bildung von mehr als 100 IFN- $\gamma$  spezifischen Spots. Im Verhältnis zu PWM (100 %) erzielte die BTV-8 Restimulation 29 % und die BTV-1 Restimulation 34 % mehr Spots als die Negativkontrolle.

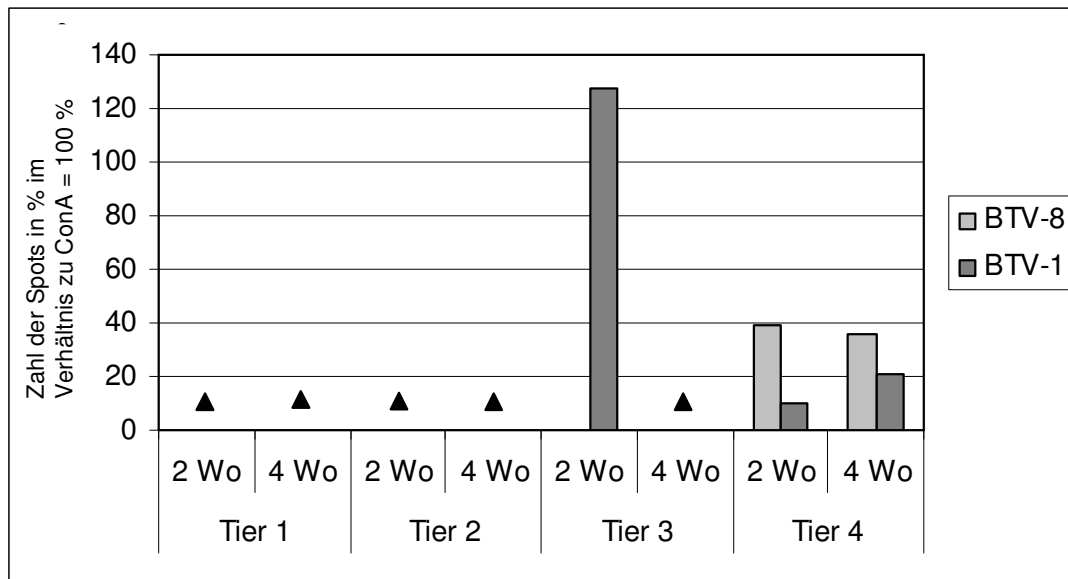
Die in Seren der vier Rinder gemessenen ELISA-Ak-Titer folgen demselben Trend. Sie waren zwei und vier Wochen nach dem Boost am höchsten und lagen beim letzten Beprobungszeitpunkt deutlich niedriger.

**Tab. IV.8:** ELISA-Serum-Ak-Titer von vier Rindern zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Boost gegen BTV-8

	Rind 1	Rind 2	Rind 3	Rind 4
<b>2 Wochen</b>	1:32	1:64	1:64	1:64
<b>4 Wochen</b>	1:32	1:32	1:32	1:32
<b>5,5 Monate</b>	1:4	1:8	1:8	1:8

Zwei der vier im IFN- $\gamma$  ELISPOT untersuchten PBMC Proben von Schafen konnten weder zwei noch vier Wochen nach der Impfung gegen BTV-8 auf die Stimulation mit ConA hin mehr als 100 IFN- $\gamma$  spezifische Spots pro Vertiefung bilden. Somit wurden die Ergebnisse als nicht auswertbar beurteilt. Auch die Stimulation mit ConA 10  $\mu\text{g/ml}$  und PHA 5  $\mu\text{g/ml}$  führte nicht zu den erwarteten und für die Auswertbarkeit entscheidenden Spotzahlen ( $\geq 100$  Spots).

Somit ließ sich nur mit PBMC von Schaf Nr. 4 die Restimulation mit BTV-8 und -1 auswerten. Mit BTV-8 als Restimulus konnte zwei Wochen nach der Impfung im Verhältnis zu ConA die meisten IFN- $\gamma$  spezifischen Spots gezählt werden. Bei der Restimulation mit BTV-1 war dies vier Wochen nach der Impfung der Fall.



**Abb. IV.11:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation von PBMC von vier Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 zwei und vier Wochen nach der Impfung gegen BTV-8; ▲ = nicht auswertbar, da ConA 5 $\mu\text{g/ml}$  < 100 Spots

Auf die Stimulation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  ConA und 5  $\mu\text{g/ml}$  PHA als Positivkontrollen reagierte zu beiden untersuchten Zeitpunkten nur die PBMC von Schaf Nr. 4 mit der Bildung von mehr als 100 IFN- $\gamma$  spezifischen Spots. Die Erhöhung der ConA Konzentration führte nicht zu einer erhöhten IFN- $\gamma$  Ausschüttung der PBMC.

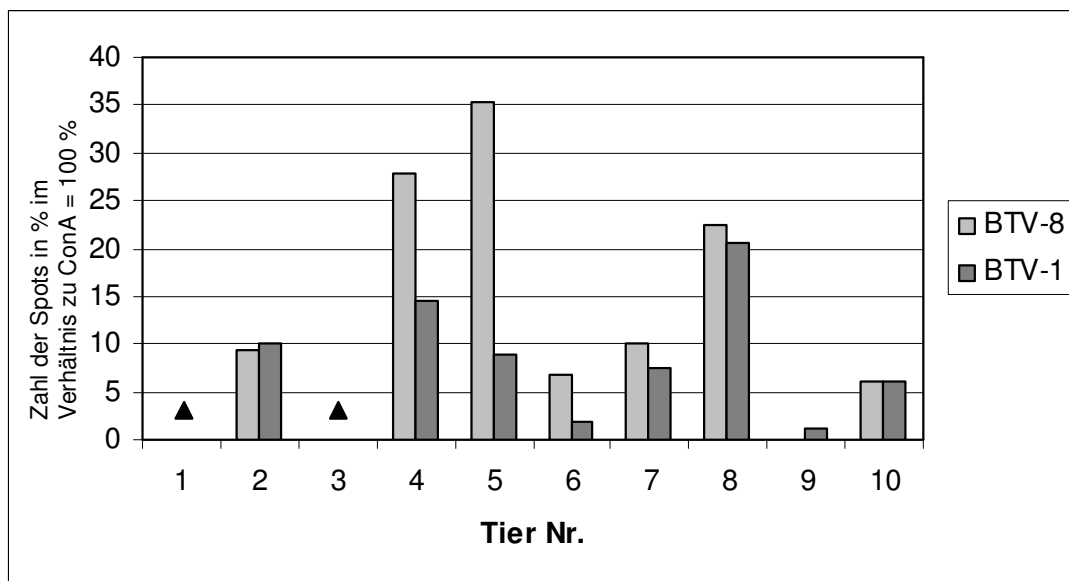
Nur bei Serumproben von Schaf Nr. 1 und 4 waren nach der Impfung im Antikörper-ELISA nachweisbare Antikörpertiter vorhanden.

**Tab. IV.9:** ELISA-Serum-Ak-Titer von vier Schafen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Impfung gegen BTV-8

	Schaf 1	Schaf 2	Schaf 3	Schaf 4
<b>2 Wochen</b>	1:4	nn	nn	1:4
<b>4 Wochen</b>	1:2	nn	nn	1:2

nn: nicht nachweisbar

Von den PBMC Proben von zehn Schafen fünf Wochen nach der Impfung gegen BTV-8 reagierten nur acht auf die Positivkontrolle und bildeten mehr als 100 IFN- $\gamma$  spezifische Spots pro Vertiefung auf die Stimulation mit ConA. PBMC Proben von fünf Schafen reagierten stärker auf die Restimulation mit BTV-8, zwei stärker auf BTV-1 und bei Schaf Nr. 10 war die Reaktion auf beide BTV Serotyp Restimuli gleich stark.



**Abb. IV.12:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation von PBMC von zehn Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 fünf Wochen nach der Impfung gegen BTV-8; ▲ = nicht auswertbar, da ConA 5 $\mu$ g/ml < 100 Spots

Die Antikörpertiter der Schafseren lagen zum Zeitpunkt der Untersuchung der PBMC im IFN- $\gamma$  ELISPOT zwischen dem nicht nachweisbaren Bereich und 1:4 (siehe Tab. IV.10).

**Tab. IV.10:** ELISA-Serum-Ak-Titer von zehn Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 fünf Wochen nach der Impfung gegen BTV-8.

Schaf Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Titer	1:1	nn	1:1	1:2	nn	1:2	1:2	1:4	1:1	1:1

## 4. Unschädlichkeit und Wirkung fehlerhafter Impfstoffapplikation

### 4.1. Intramuskuläre und intravenöse Impfstoffapplikation bei Schafen

Die Untersuchung des Impfstoffes mit der PanBTV RT-qPCR in unverdünntem Zustand sowie 1:10 und 1:100 verdünnt ergab für alle Verdünnungsstufen einen  $c_q$ -Wert von über 40 und wurde somit als negativ gewertet. Im inaktivierten Impfstoff selbst war also kein BTV-Genom nachweisbar.

Auch im Blut der Schafe war weder eine, vier noch 24 Stunden nach der Applikation des Impfstoffes i.v. BTV-Genom nachweisbar.

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung der sechs Schafe wichen nur in wenigen Punkten von den Normalbefunden ab. Dabei handelte es sich 24 h nach der Applikation des Impfstoffes um Befunde, die auch schon vor der Applikation abweichend waren. Somit kam es nach der fehlerhaften Applikation zu keinen klinischen Nebenwirkungen. Die Befunde sind ausführlich im Anhang in Kapitel IX.2.2 dargestellt.

### 4.2. Subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation bei Schafen

Die Antikörpertiter bewegten sich nach einmaliger Impfung gegen BTV-8 bei allen Seren von Schafen im Betrieb Nr. 21 im Bereich von nicht nachweisbar bis 1:16. Der Median der Antikörpertiter von Serumproben der s.c. geimpften Schafe lag zwei, vier und acht Wochen nach der Impfung bei 1:1. Der Median der Proben i.m.

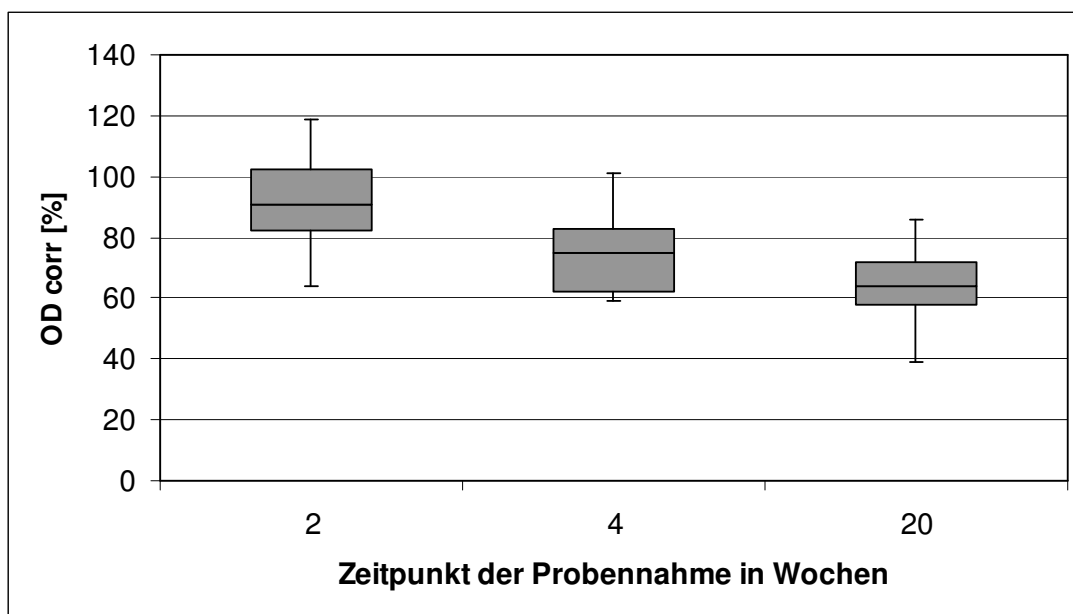


geimpfter Schafe lag zwei Wochen nach der Impfung bei 1:2, ansonsten ebenfalls bei 1:1.

Aufgrund der niedrigen Titer wurden die folgenden Diagramme nicht mit dem Antikörpertiter selbst erstellt und entsprechende Berechnungen durchgeführt, sondern mit der gemessenen optischen Dichte, die bereits in Bezug auf die Negativkontrolle korrigiert war (OD corr). Dies ergab ein genaueres Bild der feinen Unterschiede zwischen den Proben als der ELISA-Serum-Ak-Titer.

Der „cut-off“ liegt beim hier verwendeten Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) bei 50 % OD corr. Werte darüber sind als positiv und darunter als negativ zu werten.

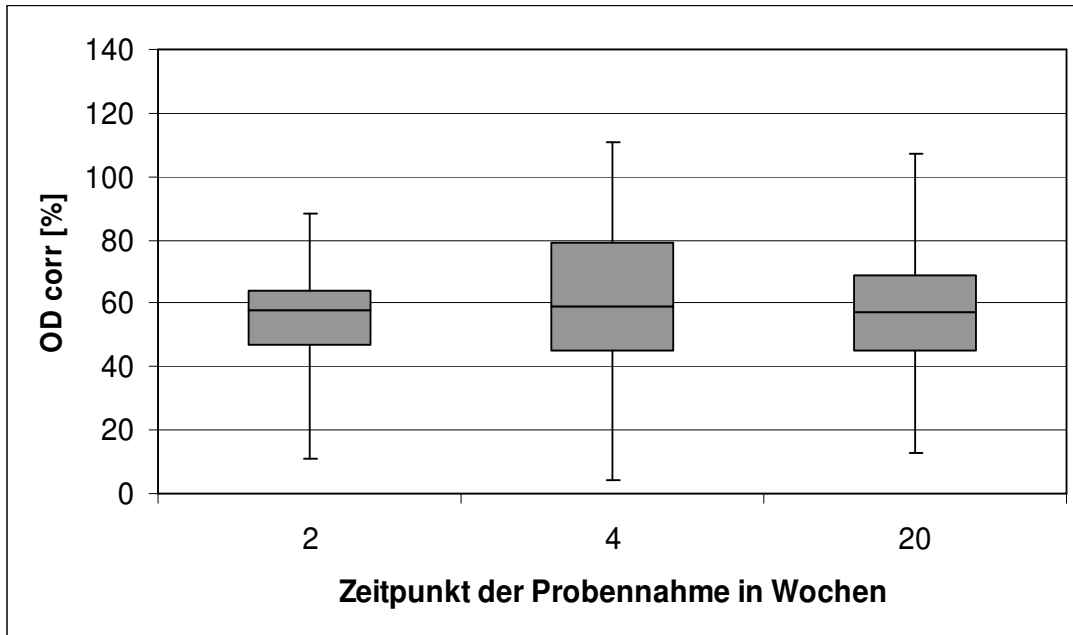
Der Median der OD corr. lag bei den Serumproben der i.m. geimpften Schafe zwei Wochen nach der Impfung bei 90 und damit deutlich im positiven Bereich. Weitere zwei Wochen später lag der OD corr. bei 74 und acht Wochen nach der Impfung bei 63. Somit ist ein Abfall der ELISA-Serum-Ak deutlich nachzuvollziehen.



**Abb. IV.13:** Korrigierte Optische Dichte (OD corr) von Seren von 20 i.m. geimpften Schafen nach der Impfung; Whiskers reichen vom Maximum zum Minimum.

Der Median der korrigierten optischen Dichte lag bei den Seren der s.c. geimpften Schafe zwei Wochen nach der Impfung bei 58, weitere zwei Wochen später bei 60

und acht Wochen nach der Impfung bei 57. Alle drei Werte sind nur schwach positiv.



**Abb. IV.14:** Korrigierte Optische Dichte von Seren von 58 s.c. geimpften Schafen nach der Impfung; Whiskers reichen vom Maximum zum Minimum.

Zwei Wochen nach der Impfung lagen die Werte der Seren von s.c. geimpften Schafen hochsignifikant unter denen der i.m. geimpften Schafe. Auch zwei Wochen später war der Unterschied noch signifikant. Acht Wochen nach der Impfung gab es keinen signifikanten Unterschied mehr.

**Tab. IV.11:** Irrtumswahrscheinlichkeiten der Unterschiede der ELISA-Serum-Ak-Titer von i.m. und s.c. geimpften Schafen nach der Impfung

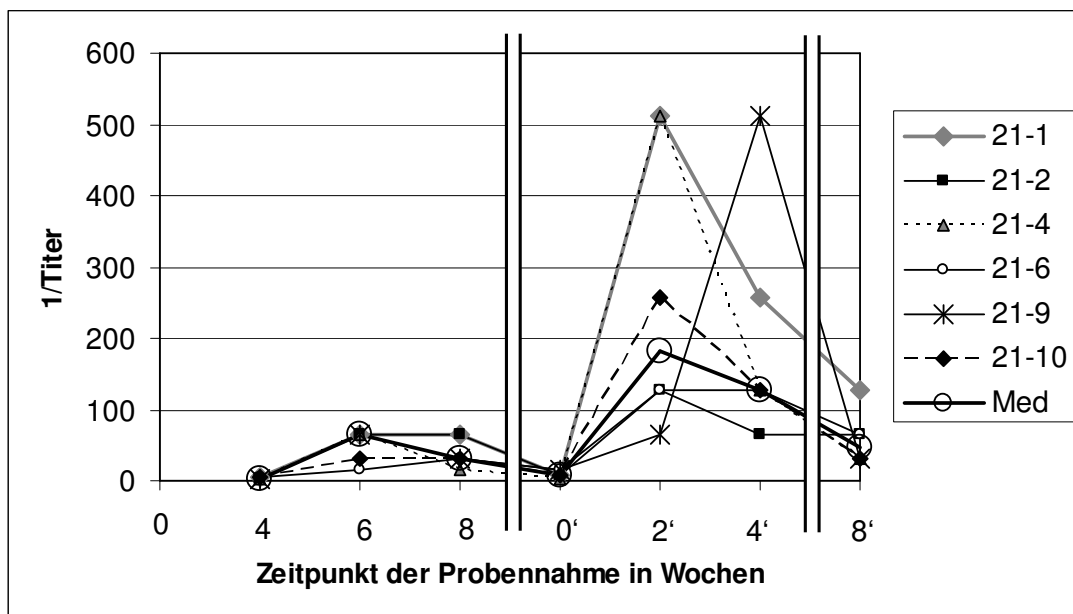
Zeitpunkt	2 Wochen	4 Wochen	20 Wochen
<b>p</b>	< 0,001	0,024	0,083

### 4.3. Applikation einer erhöhten Impfstoffdosis bei Rindern

Rinder aus dem Betrieb Nr. 21 wurden 2008 mit der jeweils vierfachen Dosis BTVPUR AISap geimpft und geboostet. Sie entwickelten danach und auch nach der Impfung 2009 deutlich höhere Antikörpertiter als Rinder aus anderen Betrieben, die mit anderen Impfstoffkombinationen in der vorgesehenen Dosis

geimpft wurden. Vergleiche zwischen den Ak-Titern der Tiere aus den Betrieben werden in den Kapiteln IV.3.1.2 und IV.3.2.2 dargestellt.

Die ELISA-Antikörpertiter der sechs Rinderseren aus Betrieb Nr. 21, die auch auf neutralisierende Antikörper untersucht wurden, lag beim Boost bei 1:3, zwei und vier Wochen später bei 1:64 und 1:32. Nach der Impfung 2009 stieg er von 1:8 auf 1:181 zwei und auf 1:128 vier Wochen nach der Impfung an. Acht Wochen nach der Impfung lag der Median der ELISA-Serum-Ak-Titer bei 1:48. Die Seren von drei Tieren hatten als höchsten gemessenen Wert einen Titer von 1:512 (siehe dazu Abb. IV.15).

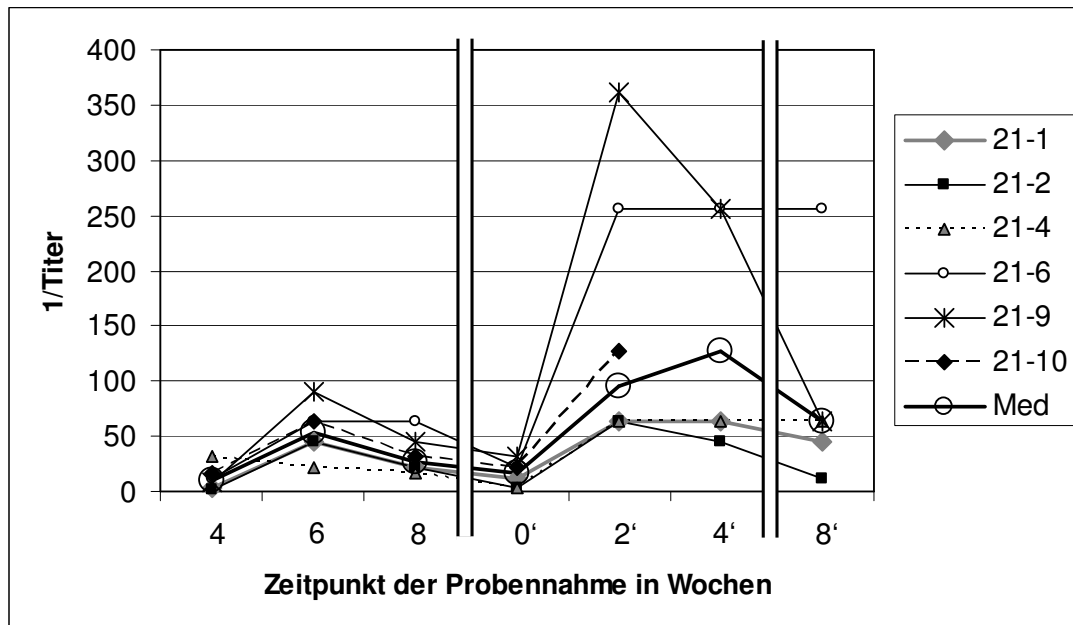


**Abb. IV.15:** ELISA-Antikörpertiter von sechs Rindern aus dem Betrieb Nr. 21 nach zwei Impfungen gegen BTV-8, Impfungen bei 0, 4 (Boost) und 0' 2', etc.: Wochen nach der Impfung 0'

Alle dargestellten Rinder folgen diesem Trend und zeigen die höchsten gemessenen ELISA-Serum-Ak-Titer zwei bis vier Wochen nach dem Boost und zwei bis vier Wochen nach der Impfung 2009.

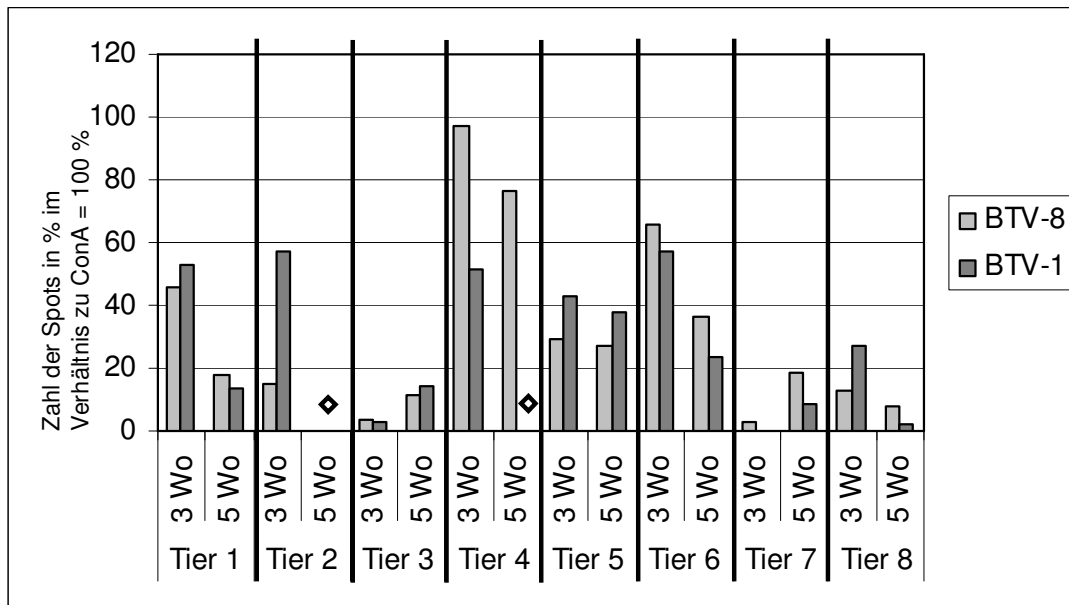
Der Median der SNT-Ak-Titer der sechs untersuchten Rinderseren (Abb. IV.16) lag beim Boost bei 1:10 und somit über dem ELISA-Serum-Ak-Titer. Zwei und vier Wochen nach dem Boost lag der Median der SNT-Ak-Titer mit 1:54 und 1:27 geringfügig unter dem medianen ELISA-Serum-Ak-Titer. Nach der Impfung 2009 stieg er innerhalb von zwei Wochen von 1:16 auf 1:96 und lag vier Wochen nach

der Impfung bei 1:128. Der höchste gemessene Wert war 1:356 im Serum des Rindes Nr. 21-9 zwei Wochen nach der Impfung 2009. Acht Wochen nach der Impfung lag der Median aller SNT-Ak-Titer bei 1:64. Auch im SNT folgten die Ak-Titer aller dargestellten Rinder diesem Trend und zeigen die gemessenen Höchstwerte zwei Wochen nach dem Boost und zwei bis vier Wochen nach der Impfung 2009.



**Abb. IV.16:** SNT-Antikörpertiter von sechs Rindern aus dem Betrieb Nr. 21 nach zwei Impfungen gegen BTV-8, Impfung bei 0, 4 (Boost) und 0' (Impfung 2009)  
2', usw.: Wochen nach der Impfung 2009

PBMC von acht der hyperimmunisierten Rinder aus dem Betrieb Nr. 21 wurden drei und fünf Wochen nach der Impfung 2009 im IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht. Die PBMC von vier Rindern zeigten einen Abfall der relativen Zahl messbarer IFN- $\gamma$  spezifischer Spots zwischen den zwei untersuchten Zeitpunkten. Bei den PBMC Proben von Tier Nr. 3 und 7 gab es einen Anstieg der Bildung IFN- $\gamma$  spezifischer Spots.



**Abb. IV.17:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation von PBMC von acht Rindern drei und fünf Wochen nach der dritten Impfung gegen BTV-8  
 ◆ = Vertiefungen nicht auswertbar

Im Vergleich dazu sind die ELISA-Serum-Ak-Titer (Tab. IV.12) in diesem Zeitabstand abfallend oder bei Rind Nr. 2 gleich.

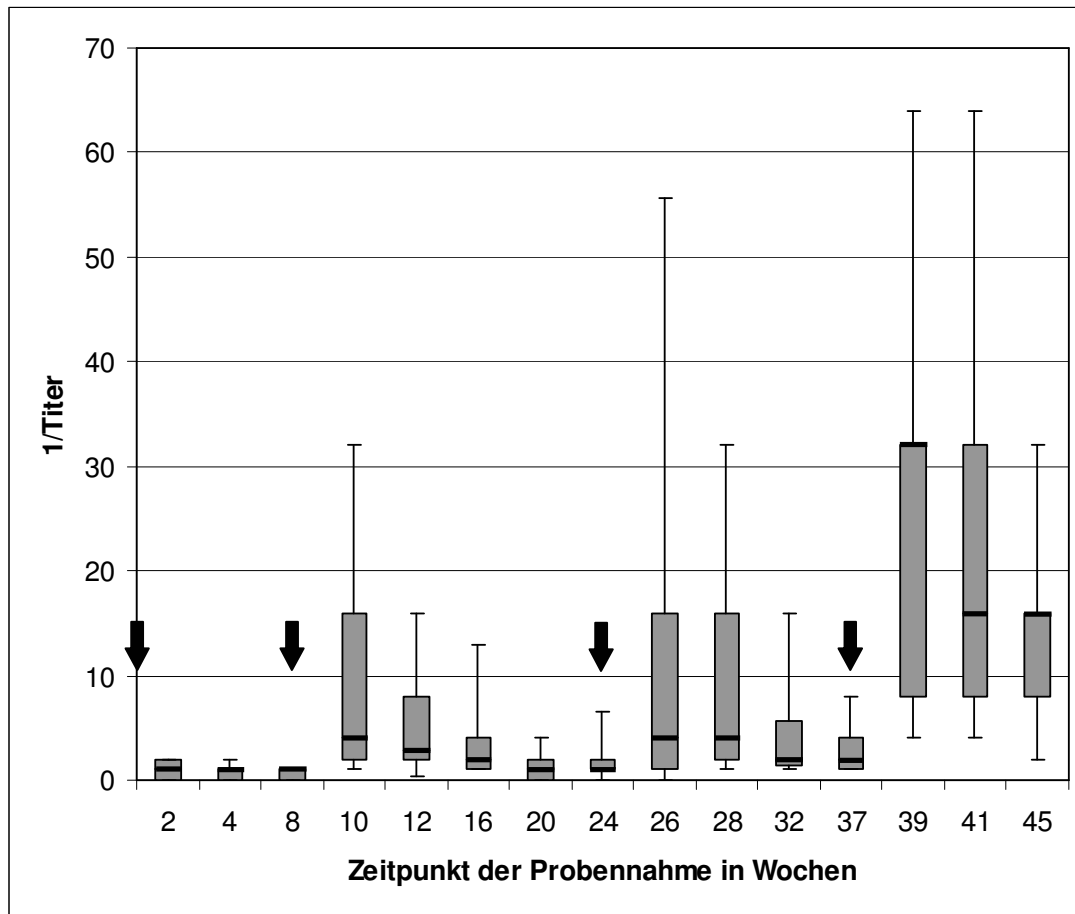
**Tab. IV.12:** ELISA-Serum-Ak-Titer von acht Rindern drei und fünf Wochen nach der dritten Impfung gegen BTV-8

Rind	1	2	3	4	5	6	7	8
3 Wochen	1:256	1:64	1:512	1:256	1:32	1:512	1:256	1:128
5 Wochen	1:128	1:64	1:64	1:64	1:16	1:64	1:32	1:32

## 5. Auswirkung einer Wiederholung der Impfstoffapplikation bei Schafen

### 5.1. Antikörperentwicklung (ELISA)

Bei 38 Schafen im Betrieb Nr. 21 wurde der Impfstoff BLUEVAC-8 drei Mal eingesetzt. Ein viertes Mal wurde mit Bovilis BTV-8 geimpft.



**Abb. IV.18:** ELISA-Serum-Ak-Titer von 28 Schafen nach vier Impfungen ( ➡ )

Whiskers reichen vom 10. bis zum 90. Perzentil

Der Median der gemessenen Ak-Titer lag im ELISA zwei Wochen nach der ersten Impfung bei 1:1. Zwei Wochen nach der zweiten und dritten Impfung lag der Ak-Titer bei 1:4. 50 % der gemessenen Titer befanden sich zwischen 1:2 und 1:16, bzw. 1:1 und 1:16. Zwei Wochen nach der vierten Impfung (Woche 39) befanden sich 50 % der gemessenen Werte zwischen 1:8 und 1:32. Der Median lag bei 1:32. Das Maximum (nicht dargestellt) lag zu diesem Zeitpunkt bei 1:256.

## 5.2. Neutralisierende Antikörper

Zum direkten Vergleich zu den SNT Ak-Titern (Abb. IV.20) sind die Titer der Seren der zehn Schafe im Ak-ELISA nochmals dargestellt (Abb. IV.19).

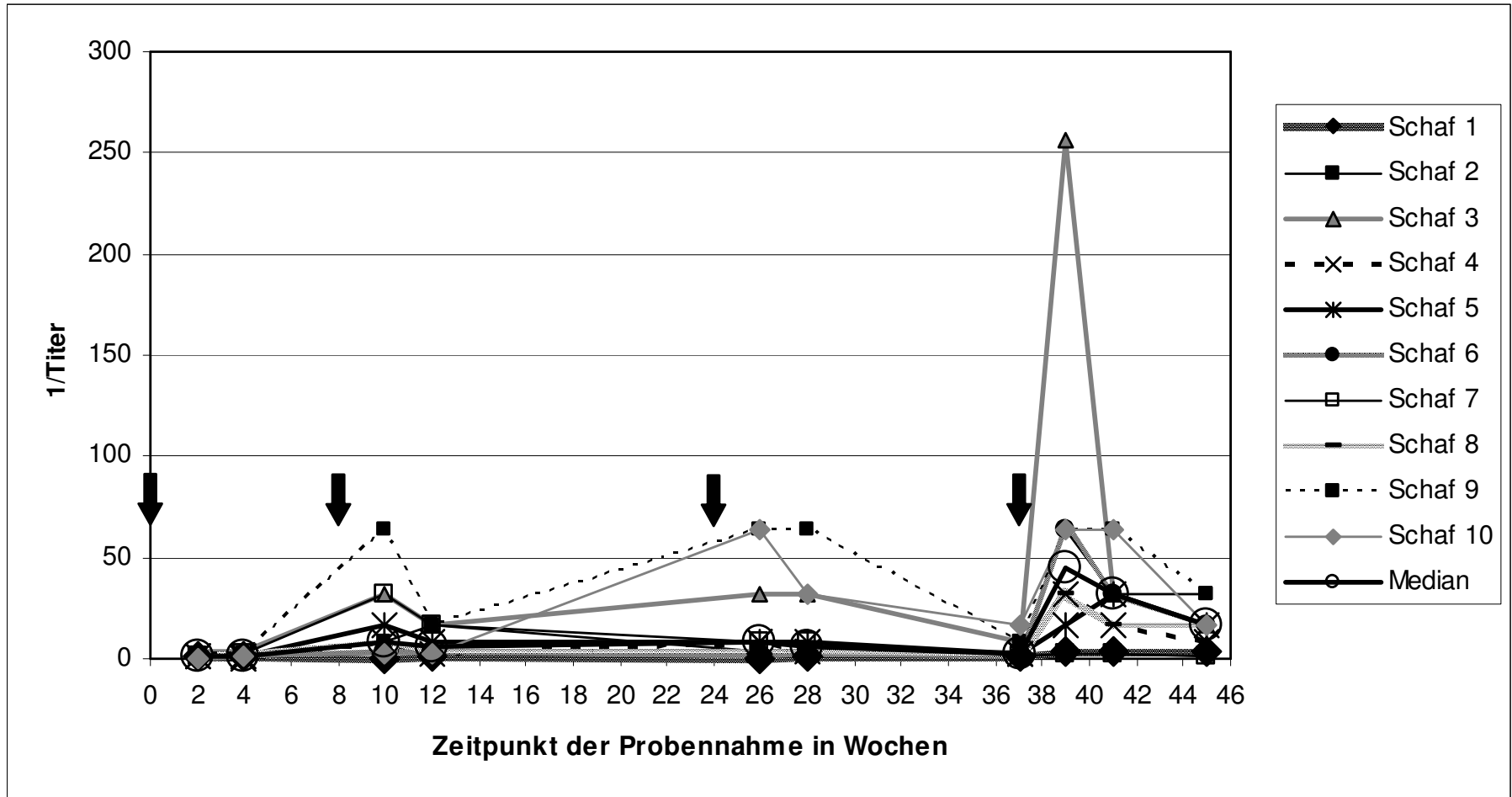


Abb. IV.19: ELISA-Serum-Ak-Titer von zehn Schafen nach vier Impfungen gegen BTV-8. Zeitpunkte der Impfung: 

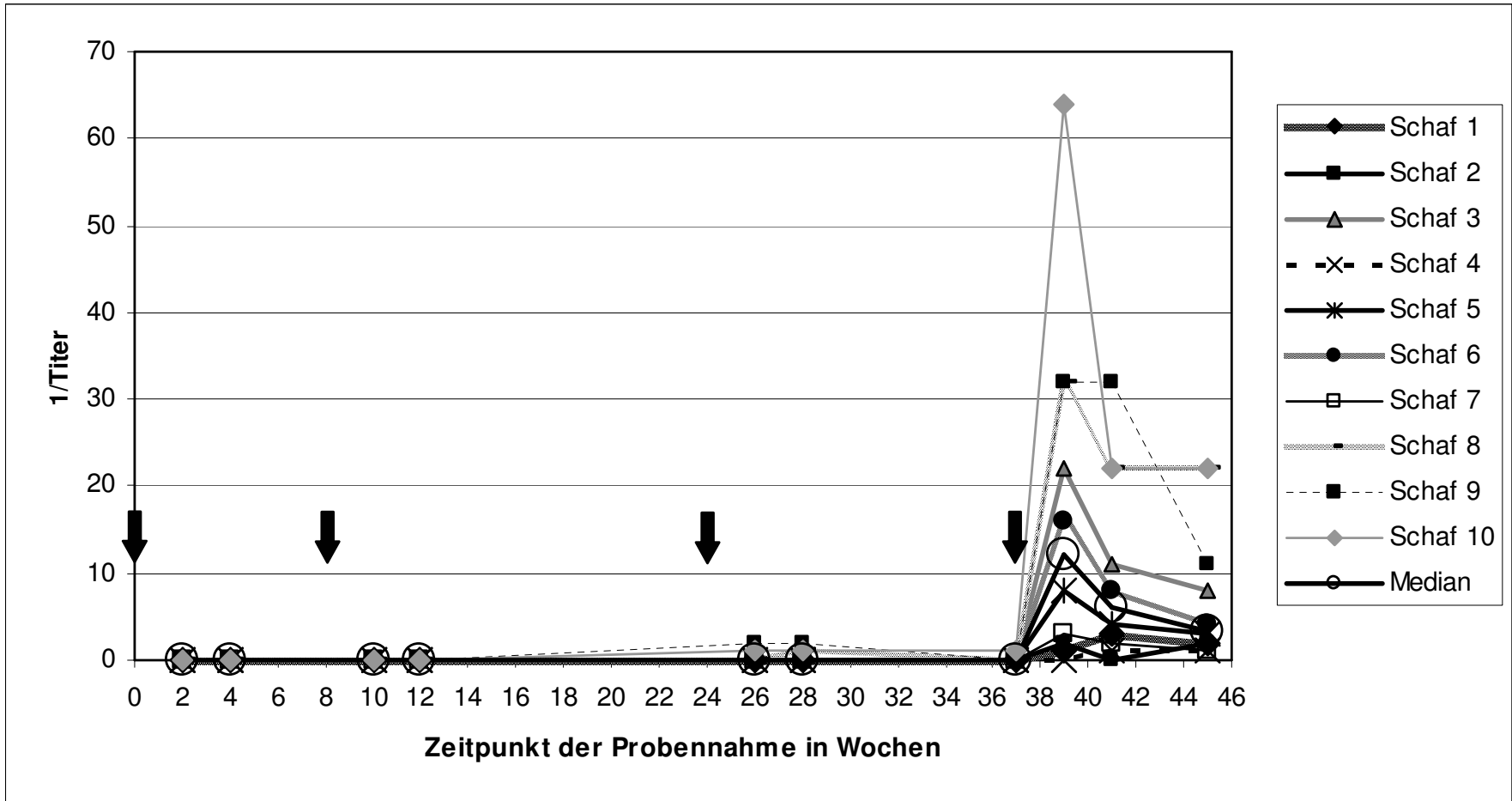


Abb. IV.20: SNT-Ak-Titer von zehn Schafen nach vier Impfungen gegen BTV-8. Zeitpunkte der Impfung:



Der Median der ELISA-Serum-Ak Titer lag zwei Wochen nach der ersten Impfung bei 1:1 und zwei Wochen nach der zweiten und dritten Impfung bei 1:8. Nach der vierten Impfung stieg er von 1:2 auf 1:45 zwei Wochen nach der Impfung an.

Im SNT waren erst vier Wochen nach der dritten Impfung in der 26. Woche der Untersuchung bei Seren von Schaf Nr. 8, 9 und 10 Ak-Titer von 1:1 und 1:2 nachweisbar. Zwei Wochen nach der vierten Impfung in Woche 39 konnten die Seren von neun von zehn Tieren das Virus mit Titern zwischen 1:1 und 1:64 neutralisieren. Der mediane Ak-Titer lag hier bei 1:12.

### 5.2.1. Kreuzneutralisation

Für die Überprüfung auf Kreuzreaktivität mit anderen BTV-Serotypen wurden Serumproben ausgewählt, die im BTV-8 SNT hohe Titer aufwiesen. Das waren Seren von Rindern aus dem Betrieb Nr. 8 vier Wochen nach der Impfung 2009 und von Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 zwei Wochen nach der vierten Impfung.

**Tab. IV.13:** Antikörpertiter im ELISA und Reaktivität gegen BTV-1, -2, -4, -8, und BTV-16 im SNT von fünf Schafen und sechs Rindern.

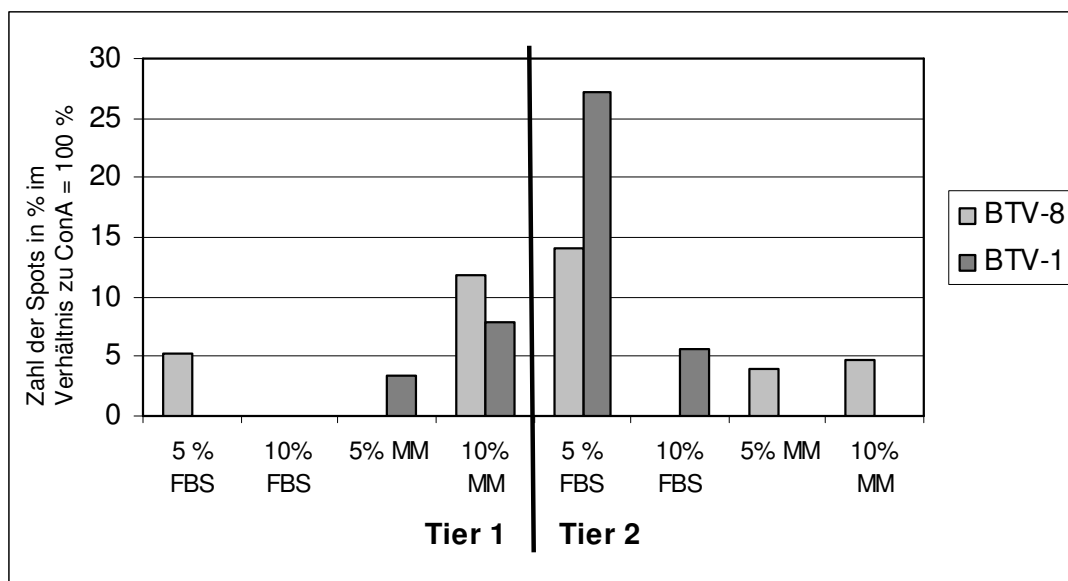
Tier	ELISA	BTV-1	BTV-2	BTV-4	BTV-8	BTV-16
<b>Pos-K</b>	1:256	1:11	nn	nn	1:54	nn
<b>Schaf 21-48</b>	1:256	1:3	nn	nn	1:22	nn
<b>Schaf 21-55</b>	1:64	1:3	1:1	nn	1:16	nn
<b>Schaf 21-68</b>	1:32	1:2	nn	nn	1:32	nn
<b>Schaf 21-72</b>	1:64	1:4	nn	nn	1:32	nn
<b>Schaf 21-78</b>	1:64	1:4	nn	nn	1:64	nn
<b>Rind 8-1</b>	1:64	1:16	nn	1:3	1:64	nn
<b>Rind 8-4</b>	1:64	1:8	nn	1:1	1:64	nn
<b>Rind 8-5</b>	1:32	1:16	1:1	1:1	1:64	nn
<b>Rind 8-7</b>	1:128	1:11	1:2	nn	1:64	nn
<b>Rind 8-9</b>	1:256	1:22	1:1	1:1	1:90	1:1
<b>Rind 8-10</b>	1:64	1:16	1:1	nn	1:64	nn

nn: nicht nachweisbar

Wie in Tab. IV.13 zu sehen ist, fand nur gegen BTV-1 eine nennenswerte Neutralisation des Virus statt. Gegen BTV-2, -4 und -16 zeigen hauptsächlich Rinderseren eine schwache Kreuzneutralisation mit Titern von 1:1 bis 1:3. Die BTV-8 Immunserum-Positivkontrolle blieb bei diesen Serotypen ebenfalls ohne neutralisierenden Effekt auf das Virus.

### 5.3. Zelluläre Immunreaktion

Es gab Unterschiede beim Nachweis von IFN- $\gamma$  spezifischen Spots in Abhängigkeit von der gewählten Lösung zum Blockieren der Platte nach dem Beschichten mit IFN- $\gamma$  Fänger-Ak. Dies wurde bei der Untersuchung der PBMC von zwei Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 vier Wochen nach der zweiten Impfung gegen BTV-8 festgestellt. Mit den PBMC von Schaf Nr. 1 waren beim Blockieren mit 10 % Magermilch im Blockingpuffer am meisten IFN- $\gamma$  spezifische Spots im Verhältnis zur Positivkontrolle vorhanden. Beim Tier Nr. 2 war dies bei 5 % FBS im Blockingpuffer der Fall.



**Abb. IV.21:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation der PBMC von zwei Schafen nach Einsatz unterschiedlicher Blockingpuffer.  
MM: Magermilch, FBS: Fetales Bovine Serum

Wie in Tab IV.14 zu sehen ist, schwankt die gemessene IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahl in Abhängigkeit vom eingesetzten Mitogen und vom Blockingpuffer zwischen den PBMC der Tiere beträchtlich.

**Tab. IV.14:** IFN- $\gamma$  spezifische absolute Spotzahlen bei Mitogenstimulation der PBMC von zwei Schafen nach Einsatz verschiedener Blockingpuffer und Mitogene als Positivkontrolle

Tier	Blocking	ConA <sup>1</sup>	PWM <sup>1</sup>	PHA <sup>1</sup>	BTV-1 <sup>2</sup>	BTV-8 <sup>2</sup>
1	5 % FBS	169	229	135	0	9
	10% FBS	281	195	108	0	0
	5% MM	179	168	97	6	0
	10% MM	127	106	105	10	15
	Mittelwert	189	175	111	4	4
2	5 % FBS	100	134	161	27	14
	10% FBS	123	147	102	7	0
	5% MM	179	186	220	0	7
	10% MM	190	187	170	0	9
	Mittelwert	148	164	163	6	8

<sup>1</sup> Konzentration 5  $\mu\text{g/ml}$

<sup>2</sup> Restimulation für 24 h mit MOI ~ 1

Die PBMC des Schafes Nr. 2 bilden bei Einsatz von 5 % FBS oder MM im Blockingpuffer mit PWM und PHA mehr IFN- $\gamma$  spezifische Spots als mit ConA.

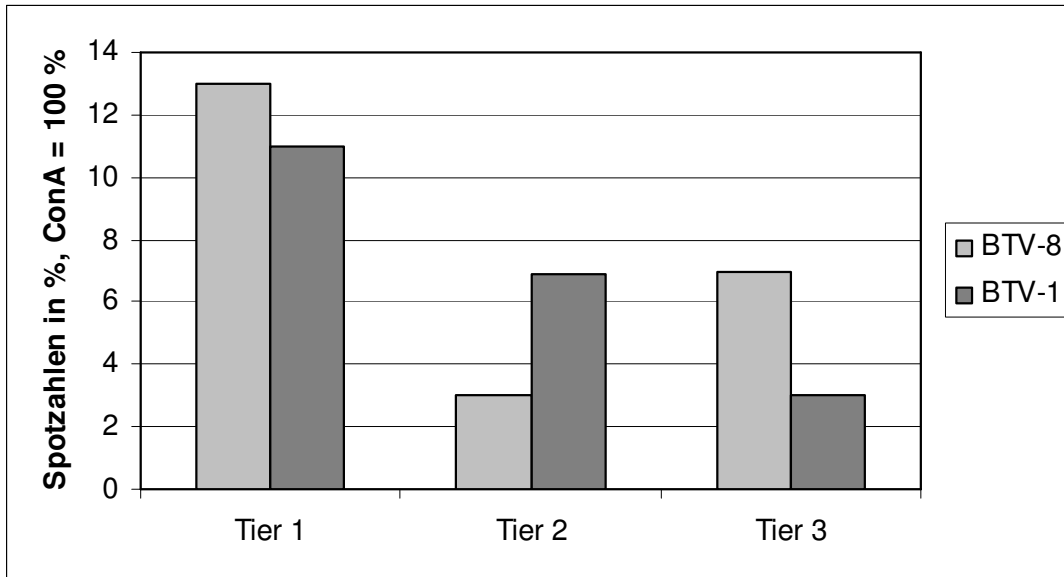
In Tab. IV.15 sind die Spotzahlen nach Inkubation der PBMC mit zwei verschiedenen Mitogenen und Anwendung verschiedener Blockingpuffer im prozentualen Verhältnis zum 100 % ConA-Wert dargestellt.

**Tab. IV.15:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen in % nach Stimulation mit PHA und PWM und Einsatz verschiedener Blockingpuffer im Verhältnis zu ConA = 100 %

	Stimulus	5 % FBS	10 % FBS	5 % MM	10 % MM
Tier 1	PWM 5 $\mu\text{g/ml}$	136 %	69 %	94 %	83 %
	PHA 5 $\mu\text{g/ml}$	80 %	38 %	54 %	83 %
Tier 2	PWM 5 $\mu\text{g/ml}$	135 %	120 %	104 %	98 %
	PHA 5 $\mu\text{g/ml}$	163 %	83 %	123 %	89 %

Die ELISA-Serum-Ak-Titer der beiden Schafe waren zu diesem Zeitpunkt mit 1:1 und 1:2 sehr niedrig.

Die PBMC von drei Schafen wurden eine Woche nach der dritten Impfung auf IFN- $\gamma$  Sekretion im IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht. Die PBMC von zwei der drei Schafe bildeten mehr Spots nach der Stimulation mit BTV-8 als mit BTV-1. Interessanterweise sezernieren die Zellen von Tier Nr. 2 auf die Stimulation mit BTV-1 4 % mehr Spots als auf die Stimulation mit BTV-8.



**Abb. IV.22:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach Restimulation der PBMC von drei Schafen mit BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) eine Woche nach der dritten Impfung.

Nur die PBMC von Tier Nr. 2 reagiert mit einer erhöhten Anzahl an IFN- $\gamma$  spezifischen Spots auf die Erhöhung der ConA Konzentration (Tab IV.16).

**Tab. IV.16:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen der PBMC von drei Schafen nach Inkubation mit erhöhter Mitogenkonzentration in % im Verhältnis zur Standardkonzentration ConA 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (= 100 %)

Stimulus	Tier 1	Tier 2	Tier 3
ConA 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	84 %	103 %	83 %
ConA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	77 %	123 %	98 %
PHA 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 %	46 %	11 %
PHA 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20 %	45 %	16 %

PHA konnte die PBMC bei keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einer erhöhten Sekretion von IFN- $\gamma$  anregen.

Die ELISA-Ak-Titer der drei Schafseren lagen bei 1:16 bei Schaf 1, 1:4 bei Schaf 2 und 1:64 bei Schaf 3.

## 6. Immunreaktionen bei natürlich infizierten Rindern

### 6.1. Antikörper-ELISA

Bei Seren von neun Rindern und einem Schaf aus den ausgewählten Betrieben waren vor der Impfung Antikörper gegen BTV-8 im ELISA nachweisbar. Ergebnisse aus dem Betrieb Nr. 22 stammen zwar aus der Routinediagnostik des LGL, werden aber zu den ausgewählten Betrieben gezählt, da hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

**Tab. IV.17:** Tiere mit im Serum nachweisbaren BTV-8-ELISA-Antikörpern vor der Impfung

Betriebs-Nr.	Tier	Ak-Titer
6	Rind Nr. 22, 27 Monate alt	1:64
6	Rind Nr. 24, 7 Jahre alt	1:64
13	Rind Nr. 1, war klinisch krank	1:16
13	Rind Nr. 9	1:32
22	Rind Nr. 4, Mutterkuh, war klinisch krank	1:256
22	Rind Nr. 5, ca. 6 Monate alt	1:64
22	Rind Nr. 7, Mutterkuh	1:8
22	Rind Nr. 9, Mutterkuh	1:64
22	Rind Nr. 12, ca. 6 Monate alt	1:8
11	Schaf Nr. 9	1:1

BTV-8 Genom war ausschließlich im Blut von Tieren aus Einsendungen für die Routinediagnostik des LGL nachweisbar.

**Tab. IV.18:** Betriebe mit Tieren, bei denen in der Routinediagnostik des LGL mittels BTV-RT-qPCR BTV-8 Genom nachweisbar war

Betrieb	Beschreibung
Betrieb Nr. 22	Ein klinisch krankes Tier, Nachweis von BTV-Genom bei diesem und sechs weiteren Tieren.
Lkr. Dachau	Nachweis von BTV-8 Genom zwei Monate nach Abschluss der Grundimmunisierung bei sechs Rindern.
Lkr. Miltenberg	Ein Tier fällt zwei Monate nach Abschluss der Grundimmunisierung klinisch als krank auf, Nachweis von BTV-Genom.

Die Tiere aus den ausgewählten Betrieben wurden zum Teil mehrmals beprobt und die zu diesen Zeitpunkten entnommenen Serumproben auch mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) untersucht. Ebenso wurden auch die Proben aus der Routinediagnostik mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) untersucht. Diese Ergebnisse sind im nächsten Kapitel zusammen mit den Ergebnissen der Untersuchung auf neutralisierende Antikörper dargestellt.

## 6.2. Neutralisierende Antikörper

Die Ak-Titer in ELISA und SNT von Proben von Rindern, die eine BTV-8 Infektion durchlaufen hatten oder durchliefen, sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Bei den Rindern wurden entweder vor der Impfung gegen BTV-8 Antikörper gegen BTV oder mit der RT-qPCR BTV-8 Genom nachgewiesen oder es war nach der Impfung BTV-8 Genom nachweisbar.

Bei den Rindern aus dem Landkreis Dachau und Miltenberg (Tab. IV.19 und Tab. IV.20) handelt es sich um Tiere, deren Grundimmunisierung zwei Monate vor dem Nachweis von BTV-8 Genom abgeschlossen war. Das Rind aus dem Landkreis Miltenberg wurde wegen BT-typischer klinischer Symptome untersucht (keine näheren Angaben zur Art der Symptome); die Tiere aus dem Landkreis Dachau waren klinisch unauffällig.

Von den Rindern aus dem Landkreis Dachau stand für die Untersuchungen nur Blutplasma zur Verfügung. Dies erwies sich bei niedrigerer Verdünnung im SNT als toxisch für die Testzellen, konnte in höherer Verdünnung das Virus jedoch neutralisieren. Daher war es möglich, für diese Proben einen SNT-Ak-Titer anzugeben.

**Tab. IV.19:** Reziproke Ak-Titer von sechs Rindern aus dem Lkr. Dachau

Tier	ELISA	SNT
1	128	64
2	128	64
3	16	22
4	128	181
5	32	64
6	256	90

**Tab. IV.20:** Reziproke Ak-Titer von einem Rind aus dem Lkr. Miltenberg

Tier	ELISA	SNT
1	128	46

Bei den Rindern aus den Betrieben Nr. 6 und 14 wurden vor der Impfung gegen BTV-8 Antikörper gegen BTV, jedoch kein Genom, nachgewiesen. Das Rind Nr. 24 aus dem Betrieb Nr. 6 verließ diesen nach der ersten Untersuchung. Tier Nr. 1 aus dem Betrieb Nr. 14 war klinisch krank.

**Tab. IV.21:** Reziproke Ak-Titer von Seren zweier Rinder aus dem Betrieb Nr. 6 mit Nachweis von BTV-Ak vor der Impfung und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Impfung.

Tier	Impfung		Boost		6 Wo nach Impfung		8 Wo nach Impfung		20 Wo nach Impfung	
	ELISA	SNT	ELISA	SNT	ELISA	SNT	ELISA	SNT	ELISA	SNT
6-22	64	32	128	46	256	64	128	32	64	32
6-24	64	22	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu	nu

grau hinterlegt: ELISA-Serum-Ak-Titer; weiß hinterlegt: SNT-Ak-Titer; nu: nicht untersucht

**Tab. IV.22:** Reziproke Ak-Titer von Seren von zwei Rindern aus dem Betrieb Nr. 6 mit Nachweis von BTV-Ak vor der Impfung zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Impfung.

Tier	Impfung		Boost		6 Wo nach Impfung		8 Wo nach Impfung		20 Wo nach Impfung	
	ELISA	SNT	ELISA	SNT	ELISA	SNT	ELISA	SNT	ELISA	SNT
14-1	16	22	128	8	128	32	128	22	32	22
14-9	32	16	64	32	128	22	64	11	32	11

grau hinterlegt: ELISA-Serum-Ak-Titer; weiß hinterlegt: SNT-Ak-Titer

Bei EDTA-Blutproben von sieben Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 wurde vor der Impfung gegen BTV-8 virales Genom nachgewiesen. Bei einem weiteren Tier war dies vier Wochen nach der Impfung zum Zeitpunkt des Boostes der Fall.

Zu den mit # markierten Zeitpunkten der Untersuchung stand nur Blutplasma zur Verfügung. In drei Fällen konnte nach ausreichender Verdünnung des Plasmas und somit der zelltoxischen Bestandteile keine Neutralisierung des BT-Virus im SNT festgestellt werden. Bei Tier Nr. 4, 5 und 9 gelang dies jedoch (siehe Tab. IV.23).

Bei den Tieren, die zum Zeitpunkt des Boostes nachuntersucht wurden, kam es seit dem Zeitpunkt der ersten Impfung sowohl im ELISA als auch im SNT zu einem Anstieg der Ak-Titer. Bei Tier Nr. 7 und 9 ist ein Titeranstieg zwischen der ersten Impfung und vier Wochen nach dem Boost (8 Wochen) deutlich feststellbar. Tier Nr. 4 hat zu diesem Zeitpunkt denselben ELISA-Serum-Ak-Titer wie bei der ersten Impfung und einen niedrigeren SNT-Titer von 1:64. Der ELISA-Serum-Ak-Titer lag auch zum Zeitpunkt der Impfung 2009 (0') und drei Wochen später bei 1:256. Der SNT-Ak-Titer stieg von 1:16 zum Zeitpunkt der Impfung 2009 auf 1:54 drei Wochen später an.

**Tab. IV.23:** Reziproke Ak-Titer von acht Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 zu den angegebenen Zeiten nach der Impfung.

Tier	Impfung		Boost		8 Wochen nach Impfung		Impfung		3 Wochen nach Impfung	
22-4	256 <sup>#</sup>	90 <sup>#</sup>	nu	nu	256	64	256	16	256	54
22-5	64 <sup>#</sup>	32 <sup>#</sup>	256	64	nu	nu	nu	nu	nu	nu
22-7	8 <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	nu	nu	128	46	nu	nu	nu	nu
22-9	64 <sup>#</sup>	8 <sup>#</sup>	nu	nu	512	32	nu	nu	nu	nu
22-12	8 <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	32	64	nu	nu	nu	nu	nu	nu
22-14	nn	nu	32	32	nu	nu	nu	nu	nu	nu
22-15	nu	nu	64 <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	nu	nu	nu	nu	nu	nu
22-18	nn	nu	8	1	nu	nu	nu	nu	nu	nu

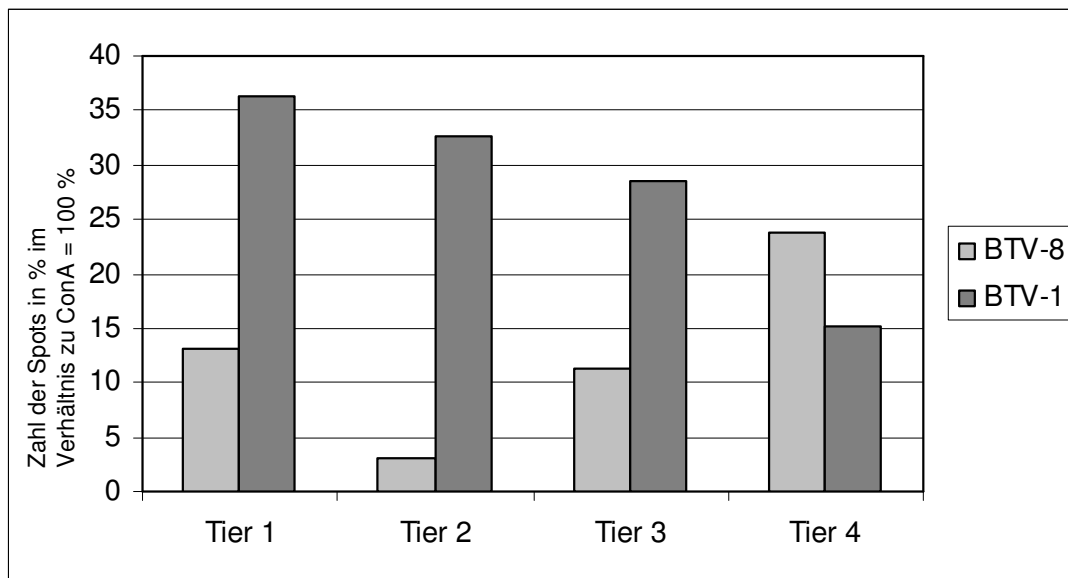
nu: nicht untersucht; grau hinterlegt: ELISA-Serum-Ak-Titer, weiß hinterlegt: SNT-Ak-Titer

#: Untersuchungsmaterial Blutplasma; x: Plasma toxisch



### 6.3. Zelluläre Immunreaktion

Vier Rinder aus dem Betrieb Nr. 22 wurden vier Wochen nach dem Nachweis von BTV-8 Genom und gleichzeitig erfolgter Impfung mittels IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht. Es handelt sich um die Rinder 22-14 (Tier 1 im IFN- $\gamma$  ELISPOT), 22-12 (Tier 2 im IFN- $\gamma$  ELISPOT), 22-18 (Tier 3 im IFN- $\gamma$  ELISPOT) und 22-5 (Tier 4 im IFN- $\gamma$  ELISPOT) (siehe Tab. IV.23). Die PBMC der Rinder Nr. 1 bis 3 bildeten mehr als die doppelte Anzahl IFN- $\gamma$  spezifischer Spots auf die Stimulation mit BTV-1 im Vergleich zu BTV-8. Nur die PBMC von Tier Nr. 4 reagierten auf die Restimulation mit BTV-8 mit einer stärkeren IFN- $\gamma$  Sekretion.



**Abb. IV.23:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach Restimulation der PBMC mit BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) von vier Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 vier Wochen nach dem Nachweis von BTV-Genom und der Impfung gegen BTV-8

Tab. IV.24 zeigt die IFN- $\gamma$  spezifischen Spotzahlen der PBMC bei niedriger gewählten ConA-Konzentrationen im Verhältnis zur Standardkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$ . Sie lagen mit einer Ausnahme alle deutlich unter den Spotzahlen nach Standard ConA Stimulation.

**Tab. IV.24:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach der Stimulation von PBMC von vier Rindern mit ConA 1 und 3  $\mu\text{g/ml}$  im Verhältnis zu ConA 5  $\mu\text{g/ml}$  = 100 %

	<b>Tier 1</b>	<b>Tier 2</b>	<b>Tier 3</b>	<b>Tier 4</b>
<b>ConA 3 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	78 %	99 %	114 %	78 %
<b>ConA 1 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	40 %	63 %	67 %	30 %

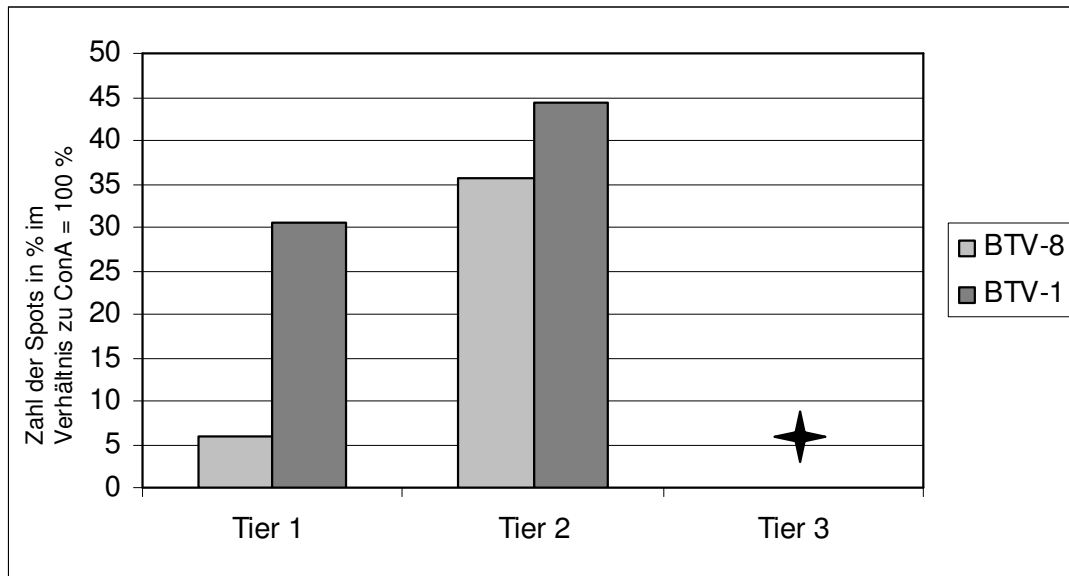
Tab. IV.25 zeigt die ELISA-Serum-Ak-Titer der Rinderseren zum Zeitpunkt der Untersuchung mittels IFN- $\gamma$  ELISPOT.

**Tab. IV.25:** ELISA-Ak-Titer von Seren von vier Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 vier Wochen nach dem Nachweis von BTV-Genom und der Impfung gegen BTV-8.

	<b>Rind 1</b>	<b>Rind 2</b>	<b>Rind 3</b>	<b>Rind 4</b>
<b>Titer</b>	1:32	1:32	1:8	1:256

Die EDTA-Blutprobe eines weiteren Rindes, bei dem BTV-8 Genom nachgewiesen worden war, wurde zusammen mit den Proben von zwei Tieren, bei denen dies nicht der Fall war, drei Wochen nach der Impfung 2009 im IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht. PBMC von Rind Nr. 1, welches eine natürliche Infektion mit BTV-8 durchlaufen hatte, reagierten verhältnismäßig stärker auf die Stimulation mit BTV-1 als mit BTV-8. Die PBMC von Rind Nr. 2 reagierten stärker auf beide Stimuli als PBMC von Rind Nr. 1. Das Tier Nr. 3 bildete in der Negativkontrolle mehr Spots als in den Vertiefungen mit den Stimuli BTV-8 und BTV-1.

Durch eine Verminderung und Erhöhung der MOI der beiden Stimuli BTV-1 und BTV-8 wurde untersucht, inwieweit sich dies auf die Bildung IFN- $\gamma$  spezifischer Spots auswirkt. Es konnte keine konsistente Erhöhung der IFN- $\gamma$  spezifischen Spots durch eine Erhöhung der MOI von BTV-1 und BTV-8 erreicht werden (Tab. IV.26). Bei Tier Nr. 1 und 2 führte eine Verminderung der MOI von BTV-1 und -8 auf 0,1 zu einer geringeren Anzahl auswertbarer Spots (Tab. IV.26).



**Abb. IV.24:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI=1) Restimulation der PBMC von drei Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 drei Wochen nach der dritten Impfung gegen BTV-8. ✦ = die Spotzahl der Negativkontrolle war größer als die Spotzahl nach Restimulation mit BTV-8 und BTV-1

**Tab. IV.26:** IFN- $\gamma$  spezifische Spotzahlen nach der Stimulation der PBMC von drei Rindern mit PHA 5  $\mu$ g/ml im Verhältnis zu ConA = 100 % und verschiedenen MOI bei BTV-1 und -8 Restimulation.

Stimulus	Tier 1	Tier 2	Tier 3
PHA 5 $\mu$ g/ml	41 %	23 %	21 %
BTV-8 MOI 0,1	2 %	23 %	0 %
BTV-8 MOI 1	6 %	36 %	0 %
BTV-8 MOI 10	7 %	26 %	0 %
BTV-1 MOI 1	31 %	44 %	0 %
BTV-1 MOI 10	26 %	43 %	17 %

Der ELISA-Serum-Ak-Titer war zu diesem Zeitpunkt bei Serum von Rind Nr. 1 deutlich höher als bei Seren von den beiden anderen Rindern.

**Tab. IV.27:** ELISA-Serum-Ak-Titer der Rinder drei Wochen nach der Impfung 2009

	Rind 1	Rind 2	Rind 3
Titer	1:256	1:16	1:1

## **V. DISKUSSION**

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Rinder und Schafe aus 22 ausgewählten Betrieben, sowie Proben von Rindern aus zwei Betrieben, die zur Diagnostik ans LGL geschickt wurden, untersucht. Gegenstand der Untersuchung war der Nachweis von BTV-Genom, BTV-Antikörpern im ELISA und neutralisierenden Ak im SNT sowie von IFN- $\gamma$  Bildung im IFN- $\gamma$  ELISPOT.

### **1. Fragebogen**

Es konnten nicht mehr als 22 Betriebe in die Untersuchung integriert werden, da das Projekt erst kurz vor Beginn der BTV-8 Impfkampagne begann und bald die meisten Tiere geimpft waren. Für die Frage nach der Herdenprävalenz war aber eine Untersuchung der Blutproben vor der BTV-Impfung erforderlich.

Im Fragebogen wurden verschiedene Daten erhoben (siehe Anhang IX.1.1), wobei sich nach der Untersuchung der Tiere herausstellte, dass keine der Daten in signifikantem Zusammenhang mit dem Auftreten von BTV-Infektionen standen: Es waren zu wenige BTV-infizierte Tiere gefunden worden, um eine statistisch signifikante Aussage über die Einflüsse von Haltung, Rasse, etc. auf die Herdenprävalenz machen zu können.

Ein wichtiger Punkt war allerdings, dass alle infizierten Tiere aus den untersuchten Betrieben, incl. Betrieb Nr. 22, Weidegang hatten (Tab. IV.1). Somit haben sich die Tiere vermutlich nicht im Stall infiziert. Es gibt zwar Hinweise, dass *Culicoides* Mücken über die Wintermonate in Gebäuden überleben können, in der Regel meiden sie diese aber (Wilson et al. 2008).

### **2. Herdenprävalenz**

Bei den wenigen Tieren, die eine BTV-Infektion durchlaufen hatten, wurden keine BTV-RNA sondern lediglich BTV-Antikörper gefunden. Davon ausgenommen sind Tiere des Betriebes Nr. 22 und Tiere aus der Routinediagnostik des LGL. Diese Tiere wurden größtenteils zu Beginn der Vektorsaison im Juni und Juli untersucht.

Das heißt, dass in Anbetracht der langen Nachweisbarkeit von BTV-Genom in Erythrozyten infizierter Wiederkäuer (Whetter et al. 1989; Brewer und MacLachlan 1992; Brewer und MacLachlan 1994), sich die Infektionen vermutlich im Vorjahr, also 2007, ereigneten. Nur je ein Rind aus Betrieb Nr. 14 und 22 waren klinisch auffällig. Bei den anderen verlief die Infektion subklinisch (Tab. IV.18). Diese hohe Quote an subklinisch infizierten Rindern legt die Vermutung nahe, dass in Bayern mehr Tiere mit BTV-8 infiziert waren als diagnostiziert wurden. Der Nachweis von BTV-Genom erfolgte in den Jahren 2007 bis 2009 lediglich bei Tieren in 301 Betrieben (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2007; 2008; 2009).

### **3. Impfwirksamkeitskontrolle**

#### **3.1. Antikörperentwicklung**

Die Bildung von ELISA-Antikörpertitern bei geimpften Rindern von im Median höchstens 1:32 und bei Schafen von nur knapp 1:3 am höchsten gemessenen Punkt (Abb. IV.1 und Abb. IV.2) waren in Anbetracht der Tatsache, dass ein Impfstoff aus inaktiviertem BTV verwendet wurde, nicht weiter verwunderlich. Die verhältnismäßig schwache immunogene Wirkung inaktivierter Impfstoffe ist aus der Literatur bekannt (Savini et al. 2008). Auch eine andere Untersuchung von Tieren, die mit inaktivierten Impfstoffen gegen BTV-8 in Deutschland geimpft worden waren, bestätigte die schwache Wirkung der verwendeten Impfstoffe gemessen an der Bildung von Ak. Hier war drei Wochen nach der Impfung sogar nur bei einem Teil der untersuchten Rinder (49 %) und Schafe (81 und 96 %) eine Serokonversion in Abhängigkeit vom Alter der Tiere und dem eingesetzten Impfstoff nachweisbar (Gethmann et al. 2009). Eine andere Erklärung für den Nachweis von niedrigen Ak-Titern im ELISA ist die geringere Sensitivität des verwendeten cELISA im Vergleich zu neu entwickelten sELISAs (Oura et al. 2009; Wäckerlin et al. 2009).

In der hier vorliegenden Arbeit war der  $Med_{ges}$  vier Wochen nach der Erstimpfung beim Rind mit 1:2 nicht wesentlich höher als die Ak-Titer bei den Schafen zu diesem Zeitpunkt. Mit Sicherheit führte beim Rind der Boost zu einem weiteren Anstieg des Ak-Titers. Dies wurde durch die Untersuchungen nach wiederholter

Applikation des Impfstoffes (Kapitel IV.4.3) auch für das Schaf bestätigt. Auch in der schon erwähnten Untersuchung (Gethmann et al. 2009) erhöhte ein Boost bei Rind und Schaf den Anteil serokonvertierter Tiere.

### **Antikörperentwicklung bei Rindern im zweiten Jahr der Impfung**

Im zweiten Jahr lagen vier Wochen nach der letzten Impfung die Mediane der ELISA-Serum-Ak-Titer der Rinder in den fünf untersuchten Betrieben mit 1:32 im Median allesamt über den gemessenen Höchstwerten nach der Grundimmunisierung im Jahr zuvor (Abb. IV.3). Vorhandene B-Gedächtniszellen haben hierbei sicher eine Rolle bei der Verstärkung der humoralen Immunantwort gespielt. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass bei der Impfung 2009 andere Impfstoffe als zur Grundimmunisierung verwendet wurden (Tab. IV.2). Im Durchschnitt bildeten Rinder aus dem Betrieb Nr. 8 mit der Kombination BTVPUR AISap 8 und Bovilis BTV-8 die höchsten ELISA-Serum-Ak-Titer vier Wochen nach der Impfung 2009, nämlich 1:64. Dass der Unterschied zwischen den zwei Gruppen (großer und kleiner zeitlicher Abstand zwischen Grundimmunisierung und Impfung 2009, siehe Tab III.18 und Tab. III.19) nicht signifikant war, ist im Nachhinein nicht verwunderlich, wenn man sich die Faktoren, die den Ak-Titer beeinflussen, vor Augen führt. Es spielten die interindividuellen Unterschiede bei der Immunreaktion auf ein Antigen genauso eine Rolle wie die Sensitivität des verwendeten Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD). Außerdem ist es möglich, dass die eingesetzten Impfstoffe unterschiedlich starke humorale Immunreaktionen hervorrufen. Auch in anderen Untersuchungen werden unterschiedliche Anteile serokonvertierter Tiere in Anhängigkeit vom verwendeten Impfstoff beschrieben (Gethmann et al. 2009).

Allerdings waren in der hier vorliegenden Untersuchung die ELISA-Serum-Ak-Titer bei Tieren der Gruppen, wenn sie nach den verwendeten Impfstoffen aufgeteilt wurden, nicht signifikant unterschiedlich, außer im Vergleich mit Seren der hyperimmunisierten Rinder aus dem Betrieb Nr. 21 (Tab. IV.3).

Seren von Rindern aus dem Betrieb Nr. 21, die im ersten Jahr der Impfung mit je der vierfachen Dosis Impfstoff grundimmunisiert wurden, wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten die höchsten ELISA-Ak-Titer auf. Vier Wochen nach der Impfung 2009 lagen diese im Median bei 1:112 (Abb. IV.15), also doppelt so

hoch wie der mediane ELISA-Ak-Titer der Rinder aus Betrieb Nr. 8. Seren der Rinder aus dem Betrieb Nr. 8 hatten wie bereits erwähnt vier Wochen nach der Impfung 2009 im Median die höchsten ELISA-Serum-Ak-Titer im Vergleich zu den Seren der Tiere aus den anderen vier Betrieben (Abb. IV.3).

Seren von drei Rindern aus dem Betrieb Nr. 21 hatten als gemessenen höchsten Wert einen ELISA-Serum-Ak-Titer von 1:512 nach der Impfung 2009 (Abb. IV.15). Es muss darauf hingewiesen werden, dass diese Rinder nie mittels RT-qPCR untersucht wurden, und somit eine Feldvirusinfektion nicht ausgeschlossen werden kann. Gegen eine natürliche Infektion spricht hingegen die geringe Zahl der BT-Fälle in Bayern in den Jahren 2007 und 2008 (2007; 2008) sowie die Kontinuität der ELISA-Serum-Ak-Titer: Die Rinder wurden zu denselben Zeitpunkten im ELISA untersucht wie die Schafe aus dem Betrieb Nr. 21 (Abb. 3.2), also mindestens alle vier Wochen. Zu keinem Zeitpunkt kam es zu einem Anstieg der ELISA-Serum-Ak-Titer außer nach einer Impfung.

Im Vergleich mit den ELISA-Serum-Ak-Titern von Rinderproben aus den Betrieben 3, 5 und 7 sowie Nr. 12 sind die Titer der Rinderseren aus dem Betrieb Nr. 21 an drei Zeitpunkten der Probennahme hochsignifikant höher, im Vergleich mit Betrieb Nr. 8 an einem Zeitpunkt der Probennahme, nämlich zum Zeitpunkt der Impfung 2009 (Tab. IV.3).

Diese Verstärkung der immunogenen Wirkung durch Dosiserhöhung könnte sowohl auf die Erhöhung der Antigenabgabe als auch auf die Erhöhung der Adjuvansmenge zurückzuführen sein. Adjuvantien erwiesen sich auch schon in früheren Untersuchungen als Inhaltsstoffe, die für das Hervorrufen einer guten humoralen Immunreaktion durch Impfstoffe aus inaktivierten Erregern entscheidend sind (Stott et al. 1985).

### **Antikörperentwicklung bei Schafen im zweiten Jahr der Impfung**

Auch bei der Untersuchung der Schafseren im zweiten Jahr der Impfung war ein deutlicherer Anstieg der ELISA-Serum-Ak-Titer im Vergleich zum ersten Jahr der Impfung zu messen (Abb. IV.4). Zwei Wochen nach der Grundimmunisierung mit BLUEVAC-8 betrug der ELISA-Serum-Ak-Titer 1:2 und zwei Wochen nach der Impfung 2009 mit Bovilis BTV-8 1:23. Dies mag wiederum an der rascheren Ak-

Bildung durch B-Gedächtniszellen liegen oder auch an der Anwendung eines anderen Impfstoffes (vgl. auch die Untersuchung von Gethmann et al. 2009). Eine Untersuchung legt nahe, dass die Bildung von Ak mit der Schutzwirkung eines Impfstoffes zusammenhängt und konnte zeigen, dass Schafe zehn Monate nach der Impfung mit Bovilis BTV-8 gegen eine Belastungsinfektion geschützt waren (Savini 2009).

### **3.2. Nachweis neutralisierender Antikörper**

Nachdem die Titer im Ak-ELISA nach der Grundimmunisierung bei Seren von Rindern und Schafen verhältnismäßig niedrig waren, konnten auch mit einer Ausnahme keine neutralisierenden Antikörper in den Proben festgestellt werden. Es ist zu vermuten, dass die Ausnahme, also der Nachweis neutralisierender Ak bei Rind Nr. 6 aus dem Betrieb Nr. 9 (Tab. IV.4), auf der Applikation des Impfstoffes BTVPUR AISap 8, statt wie bei den anderen Tieren BLUEVAC-8, zurückzuführen war. Die Annahme wird durch die Untersuchung der Proben der Rinder aus dem Betrieb Nr. 8 belegt, die zwei Wochen nach der Grundimmunisierung mit BTVPUR AISap 8 SNT-Ak-Titer von 1:23 im Median aufwiesen (siehe Kapitel IV.3.2.2). Bei Seren von diesen Tieren war der SNT-Ak-Titer z.T. höher als der ELISA-Ak-Titer. Weiterhin bestätigt wird die Annahme von einer anderen Untersuchung (Eschbaumer et al. 2009a), in der bei Schafen nach der Impfung mit BTVPUR AISap 8 höhere Titer neutralisierender Antikörper nachgewiesen wurden als nach der Impfung mit BLUEVAC-8.

Proben von Rindern aus dem Betrieb Nr. 21, die mit der vierfachen Dosis BTVPUR AISap 8 grundimmunisiert worden waren, zeigten schon zum Zeitpunkt des Boostes, also vier Wochen nach der ersten Applikation der erhöhten Dosis, einen SNT-Ak-Titer von 1:9 im Median (Abb. IV.15). Der höchste gemessene SNT-Titer von 1:54 im Median zwei Wochen nach der Grundimmunisierung ist durchaus mit SNT-Titern von natürlich infizierten Rindern zu vergleichen (siehe Kapitel V.6). Der SNT-Ak-Titer vom Serum von Rind Nr. 2 ist mit 1:362 zwei Wochen nach der Impfung 2009 der höchste Titer neutralisierender Antikörper unter allen geimpften Rindern (Abb. IV.16). Es wird nochmals darauf hingewiesen, dass keine RT-qPCR durchgeführt wurde und daher eine Feldvirusinfektion der Rinder nicht auszuschließen war, dies aus den oben genannten Gründen aber



unwahrscheinlich ist. Außerdem erfolgten Impfung und Probennahme im Mai 2009, also kurz nach der vektorfreien Zeit.

Die Bildung von SNT-Antikörpern durch die Applikation einer vierfach erhöhten Impfstoffdosis weist auch darauf hin, dass der Antigengehalt der vorgeschriebenen Dosis nicht zur Induktion von SNT-Antikörpern ausreicht. Eine Studie bestätigt hingegen, dass eine negative Korrelation nach der Impfung gegen BTV-8 besteht zwischen dem Nachweis neutralisierender Antikörper zum Zeitpunkt einer Belastungsinfektion und dem Auftreten klinischer Symptome oder Virämie (Oura et al. 2009). Bei der Untersuchung inaktivierter Impfstoffe gegen andere BTV-Serotypen wurde dieser Zusammenhang nicht bestätigt (Savini 2009). Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass der Nachweis neutralisierender Ak nach der Impfung entscheidend mit der Schutzwirkung der Impfung zusammenhängt.

Da Tiere aus den Betrieben Nr. 3 und 5 erst nach der Impfung 2009 neutralisierende Antikörper bildeten, wurden auch nur die Unterschiede zwischen den SNT-Titern der Seren aller Tiere aus den Betrieben zu diesem Zeitpunkt auf ihre Signifikanz überprüft (Abb. IV.7). Es ist kaum verwunderlich, dass die SNT-Titer der Rinderseren aus dem Betrieb Nr. 21 hochsignifikant höher sind als die Titer der Seren aus den Betrieben Nr. 3 und 5 (Tab. IV.5 und Tab. IV.6) sowie signifikant höher als die aus dem Betrieb Nr. 11 (Tab. IV.7). Es waren ja schon die ELISA-Serum-AK-Titer signifikant höher (Tab. IV.3). Die Grundimmunisierung war bei den Rindern in den drei Betrieben Nr. 3, 5 und 11 mit BLUEVAC-8 erfolgt. Vermutlich induzierte dieser Impfstoff in dieser Untersuchung weniger antigenspezifische B-Gedächtniszellen, die in der Lage waren, neutralisierende Antikörper zu sezernieren, als der Impfstoff BTVPUR AISap 8. Somit war die Impfung 2009 bei den Tieren aus den Betrieben Nr. 8 und 21 in dieser Hinsicht effektiver. Es besteht auch im Unterschied der beiden Betriebe Nr. 8 und 21 keine Signifikanz hinsichtlich des Nachweises neutralisierender Antikörper in den Seren der Rinder. In beiden Betrieben wurde dieselbe Kombination an Impfstoffen verwendet, mit dem Unterschied, dass Rinder aus dem Betrieb Nr. 21 mit einer vierfachen Dosis grundimmunisiert wurden. Rinderseren aus dem Betrieb Nr. 8 hatten auch signifikant höhere neutralisierende Ak-Titer als Rinderseren aus den Betrieben Nr. 3 und 5 sowie Nr. 11.

## **Schafe im zweiten Jahr der Impfung**

Bei den Schafen ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Rindern. Seren konnten BTV-8 erst nach der zweiten Impfung mit Bovilis BTV-8 neutralisieren (Abb. IV.8). Auch hier scheint dieser Impfstoff entweder eine bessere immunogene Wirkung zu haben als BLUEVAC-8 oder die vorhergegangene Impfung hat B-Gedächtniszellen für neutralisierende Antikörper gebildet, die nach der Impfung 2009 zur einer stärkeren Reaktion führten.

### **3.3. Nachweis der IFN- $\gamma$ Sekretion**

Die großen inter- und intraindividuellen Schwankungen bei der Stimulierbarkeit von PBMC mit Mitogenen wie ConA (Wattegedera et al. 2004) haben einen großen Einfluss auf die Beurteilung des IFN- $\gamma$  ELISPOT. Aufgrund dieser Schwankungen, der geringen Zahl der untersuchten Tiere, ihrer Heterogenität bezüglich BTV-8 Impf- und Infektionsstatus und der Optimierung des Protokolls können die nach dem hier angelegten Auswertbarkeitsmaßstab erhaltenen Untersuchungsergebnisse keinen allgemeingültigen Trend wiedergeben. Sie stellen aber im Zusammenhang mit einer Impfkampagne erstmals einen experimentellen Ansatz zur weiteren Evaluation von schützenden Immunreaktionen nach einer Impfung dar. Zelluläre Immunreaktionen werden allgemein im Rahmen praxisnaher Untersuchungen mit Feldproben wegen der geforderten Frische der Proben und der Notwendigkeit sofortiger Verarbeitung und Testdurchführung selten untersucht.

Ursache der intraindividuellen Schwankungen bei der Stimulierbarkeit von PBMC mit Mitogenen wie ConA könnten z.B. Unterschiede in der T-Zell-Rezeptordichte auf den einzelnen PBMC sein. So bilden PBMC mit einer geringeren Rezeptordichte weniger IFN- $\gamma$ . Eine weitere Ursache könnte die Blastenbildung sein. Wenn sich viele Zellen zu Blasten zusammenfinden, liegen Zellmembranen direkt aneinander und die relative Oberfläche der PBMC und somit die Zugänglichkeit für Mitogenstimulierbarkeit sinkt. Oder die IFN- $\gamma$  Sekretion aller PBMC aus Zellkonglomeraten erscheint auf der IFN- $\gamma$  ELISPOT Platte als ein einziger Spot, und somit wird die Gesamtzahl der gezählten Spots der wahren Anzahl IFN- $\gamma$  sezernierender Einzelzellen nicht gerecht. All diese Faktoren

könnten die starken intraindividuellen Schwankungen bei der IFN- $\gamma$  Bildung durch PBMC erklären.

Wie in Abb. IV.10 zu sehen ist, reagieren PBMC von den vier untersuchten Rindern unterschiedlich stark auf die Restimulation mit BTV-8 und BTV-1 mit IFN- $\gamma$  Sekretion. Die IFN- $\gamma$  Bildung der PBMC von Rind Nr. 2 war zu allen Zeitpunkten der Untersuchung stärker als die der PBMC von Tier 1, nämlich in Relation zur ConA Stimulation zwischen 35 % und knapp 60 % im Gegensatz zu unter 10 %. Am stärksten erfolgt die IFN- $\gamma$  spezifische Spotbildung bei allen vier Tieren vier Wochen nach der Grundimmunisierung. Das steht im Gegensatz zur humoralen Immunantwort, da die ELISA-Serum-Ak-Titer zwei Wochen nach der Grundimmunisierung am höchsten sind (Tab. IV.8). Intraindividuell variiert auch die IFN- $\gamma$  spezifische Spotbildung auf Restimulation mit BTV-8 oder BTV-1. Bemerkenswert ist jedenfalls die Tatsache, dass die PBMC von drei Rindern an mindestens einem Zeitpunkt der Untersuchung stärker auf die Restimulation mit BTV-1 reagieren. Dies könnte daran liegen, dass die durch die Impfung gebildeten T-Effektorzellen durch konservierte virale Proteine restimuliert werden, wobei die Restimulation mit Zellkulturvirus im Gegensatz zu definierten Virusproteinen oder Peptiden einen großen Unsicherheitsfaktor im Hinblick auf die Zugänglichkeit von T-Zellepitopen birgt. Der hier eingesetzte BTV-1 Stamm verursacht einen stärker lytischen zytopathogenen Effekt als BTV-8, was eine bessere Zugänglichkeit von BTV Protein für IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellen bedeuten kann. Der Kontakt von BTV-sensibilisierten PBMC mit T-Zellepitopen könnte somit zu besserer Stimulation führen. Eine Kreuzreaktivität von IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen mit BTV-1 nach BTV-8 Impfung wurde in dieser Arbeit nachgewiesen. Wie sich dies in vivo bei einer heterologen BTV-1 Serotyp Belastung auswirken könnte, ist unbekannt.

PBMC von Rind Nr. 2 reagierten sechs Monate nach der Grundimmunisierung in nicht auswertbarer Weise auf die Mitogenstimulation mit ConA, d.h. es wurden durchschnittlich weniger als 100 IFN- $\gamma$  spezifische Spots gezählt. Dies unterstreicht wiederum die starken intraindividuellen Schwankungen, hatte die Stimulation doch in den beiden vorangegangenen Tests funktioniert.

Bei der Untersuchung von PBMC von vier Schafen im IFN- $\gamma$  ELISPOT (Abb. IV.11) konnte die Spotbildung bei PBMC von zwei Schafen zu keinen Zeitpunkt

ausgewertet werden, da die Zahl der IFN- $\gamma$  spezifischen Spots nach Mitogenstimulation im Durchschnitt unter 100 lag.

Dies könnte einerseits an einer Verminderung der Reaktivität der PBMC der Tiere liegen, andererseits aber am IFN- $\gamma$  ELISPOT selbst. IFN- $\gamma$  Fänger- und Detektorantikörper sind spezifisch für bovines IFN- $\gamma$  und nicht für ovines IFN- $\gamma$ . Zwar stimmen die Aminosäuresequenz von bovinem und ovinem IFN- $\gamma$  zu 97 % überein (Randal und Kossiakoff 2000), jedoch ist die Quartärstruktur von ovinem IFN- $\gamma$  nicht erforscht. Es könnte durchaus sein, dass sich die entscheidenden Epitope, die von den Antikörpern erkannt werden, zumindest geringfügig unterscheiden und so keine optimale Avidität zwischen ovinem IFN- $\gamma$  und den Antikörpern herrscht. Somit käme es zu einer Verminderung des Gradienten zwischen der Hintergrundfärbung der Vertiefungen der ELISPOT-Platte und der Farbintensität der IFN- $\gamma$  spezifischen Spots. Der ViruSpot Reader (AID) unterscheidet Spots vom Hintergrund durch den Gradienten, die Intensität, den Farbton und die Größe der Spots. Bei der Einstellung des Geräts dürfen Intensität, Gradient und Größe aber nicht zu niedrig gewählt werden, sonst werden Spots nicht mehr von Artefakten unterschieden. Einmal gewählte Einstellungen wurden für die Auswertung aller IFN- $\gamma$  ELISPOT Platten beibehalten. Somit ist es möglich, dass eventuell gebildete IFN- $\gamma$  spezifische Spots durch Einschränkungen seitens der Bindung der monoklonalen IFN- $\gamma$  Antikörper und der Lesetechnik nicht detektiert werden konnten.

Zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der Impfung reagierten die PBMC von Schaf Nr. 3 auf die Restimulation mit BTV-1 mit der Bildung von fast 130% IFN- $\gamma$  spezifischen Spots im Verhältnis zur Mitogenstimulation mit ConA. Dagegen waren nach der Restimulation mit BTV-8 und Abzug der Negativkontrolle keine Spots zu zählen. Dies könnte ähnliche Gründe haben wie oben diskutiert.

Bei der Untersuchung von PBMC von zehn Schafen fünf Wochen nach der Impfung gegen BTV-8 (Abb. IV.12) reagierten nur acht der zehn PBMC Proben adäquat auf die Mitogenstimulation mit ConA. Zwischen den Reagenten waren wiederum die bereits besprochenen interindividuellen Unterschiede bezüglich der Bildung IFN- $\gamma$  spezifischer Spots zu sehen, wobei hier fünf der PBMC der Schafe stärker auf BTV-8 reagieren.

Bei Untersuchungen zur Impfkampagne gegen BTV-8 mit einem inaktivierten Impfstoff wurde bisher der zellulären Immunität keine Beachtung geschenkt. In älteren Untersuchungen wurde zytotoxischen T-Lymphozyten eine Bedeutung beim nicht Serotyp-spezifischen Schutz vor Reinfektionen mit BTV beigemessen (Jeggo und Wardley 1982a; Jeggo und Wardley 1982b; Jeggo et al. 1984a; Takamatsu und Jeggo 1989).

## **4.      Unschädlichkeit und Wirkung fehlerhafter Impfstoffapplikation**

### **4.1.   Intramuskuläre und intravenöse Impfstoffapplikation beim Schaf**

Nachdem im Impfstoff selbst mittels RT-qPCR kein BTV-Genom nachgewiesen werden konnte, kann vermutet werden, dass dies entweder von PCR-inhibitorischen Substanzen oder der chemischen Inaktivierung des BTV im Impfstoff herrühren könnte. Daher wurde sechs Schafen Impfstoff i.v. und i.m. appliziert, um *ex vivo* die Nachweisbarkeit von Impfvirusgenom zu prüfen. In dieser Untersuchung konnte eine, vier und 24 Stunden nach der Applikation des Impfstoffes kein BTV-spezifisches Genom in EDTA-Blutproben der Schafe nachgewiesen werden. In einer anderen Untersuchung gelang dies allerdings (Eschbaumer et al. 2010). Das kann nicht an der Sensitivität der verwendeten PCR oder am verwendeten Impfstoff liegen, da beides in der genannten Untersuchung und der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Es wird in der Untersuchung allerdings von einer ungleichmäßigen Verteilung des Impfstoffes im Blut ausgegangen, was zu einem Nachweis des Genoms mit einem niedrigeren  $c_q$ -Wert als angenommen führte. Vermutlich ist die Ungleichmäßigkeit der Verteilung die Ursache für das Ausbleiben des Nachweises des Impfvirusgenoms in der vorliegenden Untersuchung.

Es kam bei keinem der Schafe zu klinischen Veränderungen, die auf den Impfstoff zurückzuführen wären (IX.2.2). Zu erwartende klinische Befunde wären vor allem Lymphknotenschwellung, Fieber und eine lokale Schwellung am Ort der i.m. Applikation. Die meisten Schafe hatten zwar eine Erhöhung der inneren

Körpertemperatur, sowie der Herz- und Atemfrequenz und eine Verminderung des Ernährungszustandes verbunden mit Verminderung der Verdauungstätigkeit. Diese Befunde bestanden aber zum Zeitpunkt der Untersuchung vor Applikation des Impfstoffes bereits und sind, bis auf den Ernährungszustand, mit Sicherheit darauf zurückzuführen, dass die Untersuchung bei Außentemperaturen über 30 °C durchgeführt wurde.

Somit hat sich der Impfstoff bei dieser Applikation als unbedenklich herausgestellt. Die Zahl der untersuchten Tiere ist mit drei pro Applikationsart sehr gering, daher treten nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 39,6 % bei weiteren Tieren ebenfalls keine Nebenwirkungen auf. Allerdings ist die Gefahr von Nebenwirkungen durch fehlerhafte Applikation des Impfstoffes *in praxi* sicherlich geringer als im hier durchgeführten Experiment, da eine vollständige i.v. oder i.m. Applikation des Impfstoffes nicht wahrscheinlich ist.

#### **4.2. Subkutane und intramuskuläre Impfstoffapplikation**

Die ELISA-Serum-Ak-Titer geimpfter Schafe waren nach einmaliger Applikation des Impfstoffes sehr niedrig. So waren auch die Unterschiede der ELISA-Serum-Ak-Titer zwischen den Gruppen der s.c. und i.m. geimpften Schafe anhand der Titer selbst kaum nachvollziehbar. An der OD corr gemessen ergab sich jedoch ein hochsignifikanter Unterschied zwei Wochen nach der Impfung und ein signifikanter Unterschied zwei Wochen später (Tab. IV.11). Die s.c. geimpften Schafe hatten weniger im ELISA nachweisbare Ak gebildet (Abb. IV.13 und Abb. IV.14). Dies mag an den unterschiedlichen Zielzellen liegen, die mit Impfantigen konfrontiert werden. Letztlich spielen die Mikroumgebung und die Antigen präsentierenden Zellen am Injektionsort die entscheidende Rolle bei der Induktion der adaptiven Immunreaktionen.

#### **4.3. Applikation einer erhöhten Impfstoffdosis beim Rind**

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Rinderseren mittels Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA und SNT sind in den vorhergehenden Kapiteln V.3.1 und V.3.2 zusammen mit den Ergebnissen der Seren von Rindern aus den Betrieben Nr. 3, 5, 8 und 11 diskutiert worden.

Die mit vierfacher Dosis grundimmunisierten Rinder (Abb. IV.17) zeigen keine einheitlich stärkere IFN- $\gamma$  spezifische Spotbildung nach der letzten Impfung 2008 als die mit normaler Dosis grundimmunisierten Rinder. Die Auswirkung der Erhöhung des Antigen- und Adjuvanseinsatzes ist auf der humoralen Seite nach der Impfung 2009 eindeutig durch höhere ELISA-Serum-Ak-Titer und SNT-Ak Titer nachzuvollziehen (siehe auch Kapitel IV.4.3). Auf der zellulären Ebene, gemessen an der IFN- $\gamma$  spezifischen Spotbildung, war dies nicht der Fall. Relative Spotzahlen zwischen 2 % bei PBMC von Tier Nr. 8 fünf Wochen nach der Impfung nach Restimulation mit BTV-1 und knapp 100 % wie bei PBMC von Rind Nr. 4 nach der Impfung und Restimulation mit BTV-8 wichen nicht von anderen untersuchten Rindern mit unterschiedlichem Immunstatus ab.

## **5. Auswirkungen der Wiederholung der subkutanen Applikation des Impfstoffes bei Schafen**

### **5.1. Antikörperentwicklung**

Wie in Abb. IV.18 zu sehen ist, wirkte sich wie bei vorangegangenen Untersuchungen auch (Eschbaumer et al. 2009a) bei den hier untersuchten Schafen ein Boost positiv auf die Höhe des ELISA-Serum-Ak-Titers aus. So lagen zwei Wochen nach der ersten Impfung mit BLUEVAC-8 90 % der Serum-Ak-Titer zwischen 0 und 1:2. Der Median lag bei 1:1. Zwei und vier Wochen nach der zweiten Impfung mit BLUEVAC-8 lagen 50 % der ELISA-Serum-Ak-Titer zwischen 1:2, bzw. 1:1 und 1:16. An beiden Zeitpunkten lag der Median bei 1:4. Vier Wochen nach der dritten Impfung waren die ELISA-Serum-Ak-Titer noch ähnlich hoch wie zwei Wochen zuvor. Es waren also länger höhere Ak-Titer im ELISA nachweisbar.

Nach der vierten Impfung mit dem Impfstoff Bovilis BTV-8 lag der Median zwei Wochen nach der Impfung bei 1:32. Es ist möglich, dass nachdem die humorale Immunantwort mit jeder Impfung zunächst stärker war und nach der dritten Impfung die hohen Ak-Titer auch länger messbar waren, nach der vierten Impfung dies ebenfalls und unverhältnismäßig stärker der Fall war. Viel wahrscheinlicher ist

jedoch, dass die starke Reaktion auf der Verwendung eines anderen Impfstoffes zurückzuführen ist (siehe auch die Untersuchung von Gethmann et al. 2009). Es beruhte also vermutlich ein Teil der Reaktion auf bereits gebildeten B-Gedächtniszellen und ein anderer auf der stärkeren Immunogenität des Impfstoffes Bovilis BTV-8.

Die ELISA-Serum-AK-Titer der zehn für die Untersuchung im SNT ausgewählten Schafseren (Abb. IV.19) lag an allen Zeitpunkten der Untersuchung etwas über dem Median aller Schafseren dieser Untersuchung (Abb. IV.18). Dennoch konnten im SNT erst nach der dritten Impfung bei drei Schafen neutralisierende Ak-Titer von 1:1 und 1:2 nachgewiesen werden. Erst nach der vierten Impfung mit dem Impfstoff, nach dessen Applikation auch schon im ELISA überproportional hohe Ak-Titer detektiert wurden, wurden neutralisierende Ak nachgewiesen. Der Titer lag im Median bei 1:12 (Abb. IV.20). Die Gründe hierfür decken sich mit denen, die für den ELISA-Serum-AK-Titer im vorhergehenden Abschnitt diskutiert wurden.

### **Kreuzneutralisation**

Wie in der Literatur beschrieben, ist das Virusprotein VP2 die Hauptdeterminante für die Induktion neutralisierender Antikörper (Huisman und Erasmus 1981; Kahlon et al. 1983). Es kam je nach Experiment kaum oder zu keiner vollständigen Kreuzneutralisation der Serotypen. Bei genetisch eng verwandten Serotypen wurde dies jedoch nicht ausgeschlossen (Roy et al. 1994). Auch in dieser Untersuchung wird dies bestätigt. Einzig gegen BTV-1 kam es zu einer nennenswerten Neutralisation durch Seren von gegen BTV-8 geimpften Tieren (Tab. IV.13). Dies könnte also an einer engeren Verwandtschaft der verwendeten Serotypen BTV-1 und BTV-8 liegen als mit den anderen getesteten Serotypen. Dies ist eventuell bedeutsam, weil BTV-1 in Südwesteuropa (Frankreich, Spanien) endemisch vorhanden ist und die Gefahr eines Übergreifens dieses Serotyps auf Deutschland befürchtet wird (Hateley 2009).

### **5.2. Zelluläre Immunreaktionen**

Der Versuch der Variation der Blockingpuffer bei der Untersuchung der PBMC zweier Schafe aus dem Betrieb Nr. 21 vier Wochen nach der zweiten Impfung gegen BTV-8 mittels IFN- $\gamma$  ELISPOT (Abb. IV.21) zeigt die große inter- und



intraindividuelle Schwankungsbreite der Reaktion von PBMC auf einen Stimulus. Weder bei den absoluten IFN- $\gamma$  spezifischen Spotzahlen (Tab. IV.14) noch bei den in Relation zu ConA dargestellten Spotzahlen (Tab. IV.15) ist eine Variante des Blockings besser als eine andere. Auch bei der Wahl der Mitogenstimulation war keine eindeutig bessere Positivkontrolle als ConA ersichtlich. In diesem Ansatz erwies sich PWM als gleich gut wie ConA bei der Stimulation IFN- $\gamma$  spezifischer Spots als Positivkontrolle und PHA schnitt am schlechtesten ab (Tab. IV.15).

Eine Erhöhung der IFN- $\gamma$  spezifischer Spotzahlen in der Positivkontrolle durch Erhöhung der Konzentration von ConA auf 8 und 10  $\mu\text{g/ml}$  war nur bei Schaf Nr. 2 erfolgreich (Tab. IV.16). Die IFN- $\gamma$  spezifischen Spotzahlen nach Stimulation mit PHA blieben unabhängig von der Konzentration hinter der Stimulation mit ConA zurück. Somit ist die Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  für ConA als die Ideale bestätigt.

Die PBMC der Schafe bilden solitär für sich betrachtet eine sehr inkonsistente Anzahl IFN- $\gamma$  spezifischer Spots nach Restimulation mit BTV-8 und BTV-1. Je nach Blockingpuffer lagen die absoluten Spotzahlen bei beiden Restimuli zwischen Null und 14 (BTV-8) oder 27 IFN- $\gamma$  spezifischen Spots (BTV-1) (Tab. IV.14).

Bei der Untersuchung der PBMC von drei Schafen eine Woche nach der dritten Impfung (Abb. IV.22) waren bei PBMC von zwei Tieren mehr IFN- $\gamma$  spezifische Spots nach der Restimulation mit BTV-8 und bei einem Tier nach der Restimulation mit BTV-1 nachweisbar. Insgesamt wurden in Relation zu ConA zwischen 3 und 13 % (BTV-8) und zwischen 3 % und 11 % (BTV-1) nachgewiesen. Diese Werte lagen weder eindeutig über noch unter denen einmalig (Abb. IV.11) oder zweimal geimpfter Schafe (Abb. IV.21). Ein direkter Vergleich ist nicht möglich, da nicht dieselben Tiere untersucht werden konnten und die Zahl der untersuchten individuellen PBMC zu gering war, um einen Trend zu erkennen.

## **6. Untersuchung der Immunreaktionen von natürlich infizierten Rindern**

### **6.1. Antikörpertiter im ELISA**

Bei neun von insgesamt 714 untersuchten Rindern und einem von 478 untersuchten Schafen waren zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung Antikörper gegen BTV nachweisbar (Tab. IV.17). Angesichts der geringen Verbreitung von BTV-8 in Bayern zu dem Zeitpunkt der Untersuchung (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2008) ist dies zunächst nicht verwunderlich. Von diesen zehn Tieren waren acht subklinisch infiziert oder die klinischen Symptome wurden von den Besitzern nicht erkannt. Dies wäre durchaus nachvollziehbar, da die Infektionen der Tiere vermutlich im Jahr 2007 stattgefunden haben, wo das Bewusstsein für BTV in Bayern sicher noch nicht allzu stark vorhanden war. Die Betriebe Nr. 6 und Nr. 14 liegen in Ober- und Mittelfranken, also im Norden Bayerns, wo 2007 die ersten BT-Fälle gemeldet wurden (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2007). Die Betriebe Nr. 11 und 22 liegen in Oberbayern, welches von der BT-Welle nie erreicht wurde. Die Infektion der Rinder aus dem Betrieb Nr. 22 ist dennoch plausibel, da die Diagnose mittels RT-qPCR erst im Herbst 2008 gestellt wurde. So haben sich vermutlich infizierte Vektoren über Bayern verbreitet und nur dort Infektionen ausgelöst, wo noch keine Impfung durchgeführt worden war. Es handelte sich bei der Herde um Mutterkühe mit Nachwuchs, die im Sommer Tag und Nacht auf einer Weide waren, die sich neben einem bevorzugten Habitat für Mücken der Gattung *Culicoides* befand.

Die Infektion des Schafes aus dem Betrieb Nr. 11 hingegen ist wenig plausibel, da die Diagnose bereits im Jahr 2008 gestellt wurde, wo es im weiten Umkreis um den betreffenden Betrieb zu keinen BT-Ausbrüchen gekommen war. Außerdem war das Schaf das Einzige mit Ak gegen BTV in dem Betrieb. Die BTV-Ak waren nur im unverdünnten Serum nachweisbar, und daher ist es wahrscheinlich, dass es sich um eine unspezifische Reaktion im ELISA handelt, die evtl. von Antikörpern gegen eine andere Infektionskrankheit herrührt. Dies wird dadurch

untermauert, dass das Tier kurz nach der ersten Untersuchung aus ungeklärten Gründen verstarb.

Der ELISA-Serum-Ak-Titer des „frisch“ infizierten, da anhand klinischer Symptome verdächtigten Rindes Nr. 4 aus dem Betrieb Nr. 22 betrug 1:256. Der ELISA-Serum-Ak-Titer des Rindes Nr. 1 aus dem Betrieb Nr. 14, dessen klinische Infektion schon etwas weiter zurücklag, betrug 1:16. Ein derartiger ELISA-Serum-Ak-Titer unterscheidet sich nicht von dem grundimmunisierten Rinder (Abb. IV.1).

Die ELISA-Serum-Ak-Titer der anderen Rinder aus dem Betrieb Nr. 22 lagen bei zwei Tieren bei 1:64, bei zwei weiteren bei 1:8 und bei zwei Tieren war zwar BTV-Genom aber noch keine Ak nachweisbar. Diese niedrigen oder nicht nachweisbaren ELISA-Serum-Ak-Titer wiesen auf ein akutes Infektionsgeschehen hin.

Die Rinder aus den Landkreisen Dachau und Miltenberg sollen zwei Monate vor der Diagnose der BTV-Infektion mittels RT-qPCR grundimmunisiert worden sein. Ihre ELISA-Serum-Ak-Titer lagen zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 1:16 und 1:128. Das Tier aus dem Landkreis Miltenberg war klinisch erkrankt. Wenn die Tiere tatsächlich vorschriftsmäßig grundimmunisiert worden sind, weist dies darauf hin, dass eine BTV-Impfung bei Rindern in Einzelfällen unter Umständen weder eine BTV-Virämie noch die klinische Erkrankung verhindern kann.

In dieser Untersuchung waren in Seren von einzelnen grundimmunisierten Rindern abhängig vom Impfstoff genauso hohe ELISA-Serum-Ak-Titer nachweisbar wie bei Seren von natürlich infizierten Rindern. Somit ist eine Unterscheidung infizierter von geimpften Rindern anhand des ELISA-Serum-Ak-Titers zumindest mit dem hier angewandten Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA (VMRD) nicht möglich.

## **6.2. Nachweis neutralisierender Antikörper**

Die Rinder aus den Betrieben Nr. 6 und Nr. 14 hatten vor der Impfung nicht nur im ELISA nachweisbare Serum-Ak im Blut, sondern auch neutralisierende Antikörper (Tab. IV.21 und Tab. IV.22). Die Impfung hatte auch hierauf einen positiven Einfluss und konnte in den Seren von drei von vier Rindern den Titer verdoppeln.

Die Impfung im Vorfeld kombiniert mit der Feldvirusinfektion führte bei den Rindern aus den Landkreisen Dachau und Miltenberg zu neutralisierenden Ak-Titern von 1:22 bis 1:181. In anderen Untersuchungen wurde eine Steigerung des Titers neutralisierender Ak nach einer Belastungsinfektion bei geimpften Schafen nachgewiesen (Eschbaumer et al. 2009a).

Auch bei den Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 waren schon vor der Impfung neutralisierende Ak nachweisbar.

Über die Titer im SNT in dieser Untersuchung lässt sich abschließend sagen, dass sie in der Regel unter den ELISA-Serum-Ak-Titern lagen und nicht parallel verliefen, d.h. eine Verdopplung im ELISA führte nicht unbedingt zu einer Verdopplung im SNT und der Zeitpunkt des höchsten gemessenen Titers im ELISA war nicht unbedingt der Zeitpunkt des höchsten gemessenen Titers im SNT (Bsp. Schafe Abb. IV.19 und Abb. IV.20, Bsp. Rinder Abb. IV.15 und Abb. IV.16). Die wiederholte Impfung gegen BTV-8 erhöhte nicht nur die ELISA-Serum-Ak-Titer sondern auch die SNT-Titer.

### **6.3. Zelluläre Immunreaktion**

Die Untersuchung der PBMC von vier Rindern, bei denen vier Wochen vorher BTV-Genom mittels RT-qPCR nachgewiesen worden war (Abb. IV.21), ergab keine höheren Spotzahlen im Verhältnis zu ConA als bei nur geimpften Rindern (Abb. IV.10). Es wäre zu erwarten gewesen, dass in natürlich infizierten Rindern durch die Replikation des Feldvirus im Tier mehr spezifische T-Effektorzellen gebildet werden als nach der Impfung mit einem inaktivierten Impfstoff. Es waren bei den PBMC von drei Rindern mehr IFN- $\gamma$  spezifischen Spotzahlen auf die Restimulation mit BTV-1 als mit BTV-8 nachzuweisen. Dies mag wiederum an der bereits diskutierten besseren Zugänglichkeit von T-Zellepitopen des BTV-1 bzw. dem Erkennen konservierter, T-zellstimulierender Proteine von BTV-1 durch die PBMC liegen.

Bei Experimenten mit verminderter ConA Konzentration (Tab. IV.24) wurde wiederum die Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  als ideal bestätigt.

Im direkten Vergleich eines Rindes, das eine natürliche BTV-8 Infektion durchlaufen hatte und zusätzlich geimpft worden war, mit zwei Tieren, die nur grundimmunisiert und 2009 nochmals geimpft wurden (Abb. IV.24), bildeten PBMC von dem Rind mit der zurückliegenden natürlichen BTV-8 Infektion weniger IFN- $\gamma$  spezifischen Spots als PBMC von einem der geimpften Rinder. Das dritte Rind bildete in der Negativkontrolle zu viele Spots, so dass bei den Ansätzen mit den Stimuli BTV-8 und BTV-1 nach Abzug der Negativkontrolle null IFN- $\gamma$  spezifische Spots übrig blieben.

Nachdem nur Momentuntersuchungen an einigen wenigen Tieren durchgeführt werden konnten, sind vergleichende Schlussfolgerungen zu zellulären Immunreaktionen nach Impfung und natürlicher Infektion hier nicht möglich.

Es ist denkbar, dass die IFN- $\gamma$  produzierenden T-Effektorzellen, die nach der BTV-Infektion bei Rind Nr. 1 gebildet worden waren, zum Zeitpunkt der Untersuchung im strömenden Blut nicht mehr existierten. Die in vivo Kinetik IFN- $\gamma$  produzierender BTV antigenspezifischer T-Zellen und T-Gedächtniszellen ist beim Rind nicht bekannt.

Beim Versuch, durch Vermindern und Erhöhen der MOI für die in vitro BTV-Restimulation das ideale Maß für die Bildung der IFN- $\gamma$  spezifischen Spots zu finden, wurde MOI 1 als beste Konzentration bestätigt.

## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

### **Humorale und zelluläre Immunreaktionen nach der Impfung gegen BTV-8 bei Schafen und Rindern in ausgewählten Betrieben in Bayern**

Alexandra Hund

Ziele dieser Studie waren die Feststellung der Herdenprävalenz von BTV-8 Infektionen in ausgewählten bayerischen Schaf- und Rinderbeständen und die Prüfung der humoralen und zellulären Immunantwort von Schaf und Rind nach Impfung mit den Impfstoffen BLUEVAC-8, BTVPUR AISap 8 und Bovilis BTV-8 im Rahmen der gesetzlich angeordneten Impfungen 2008 und 2009. Des Weiteren wurde die Unschädlichkeit des Impfstoffes BLUEVAC-8 bei nicht durch den Hersteller vorgesehenen Applikationsarten beim Schaf (i.v. und i.m.) getestet. Die Nachweisbarkeit des Impfvirusgenoms im Tier wurde im Blut der i.v. und i.m. geimpften Schafen untersucht. Zudem wurde der Effekt der Erhöhung der vorgeschriebenen Impfstoffdosis von BTVPUR AISap 8 auf die Immunantwort des Rindes geprüft. Die Wirkung der Wiederholung der Impfung bei Schafen wurde während insgesamt viermaliger Impfstoffapplikation untersucht. Zusätzlich wurden Immunreaktionen von Tieren, welche vor der Impfung bereits natürlich mit BTV-8 infiziert worden waren, evaluiert.

#### **Material und Methoden**

Die Herdenprävalenz von BTV-8 bei Schafen und Rindern wurde anhand eines cELISA Testkits und einer RT-qPCR untersucht. Nach der Impfung der Tiere gegen BTV-8 wurde die Wirkung derselben anhand der ELISA-Antikörper-Titer und der Bildung neutralisierender Antikörper gegen BTV-8, sowie gegen BTV-1, -2, -4 und -16 (Kreuzneutralisation) gemessen. Außerdem wurde die Fähigkeit zur Induktion zellulärer Immunreaktionen, messbar an Hand der Interferon- $\gamma$  Sekretion bei in vitro Restimulation von peripheren mononukleären Blutzellen mit BTV-8 und BTV-1 (IFN- $\gamma$  ELISPOT), untersucht. Die Prüfung zur Unschädlichkeit bei Fehlapplikation wurde anhand klinischer Symptome durchgeführt und die Antikörpertiter der Tiere mittels cELISA und SNT verfolgt. Der Nachweis des

Impfvirusgenoms im Blut der Schafe, denen der Impfstoff i.v. und i.m. appliziert wurde, wurde anhand einer RT-qPCR geführt. Die Auswirkung von Wiederholungen der Impfstoffapplikation bei Schafen wurde ebenfalls anhand cELISA, SNT und IFN- $\gamma$  ELISPOT untersucht. Dieselben Tests fanden Anwendung bei der Untersuchung der Immunreaktionen von natürlich infizierten Rindern.

## **Ergebnisse**

Bei neun Tieren aus den ausgewählten Betrieben konnten BTV-spezifische Antikörper und bei 15 Rindern aus der Routinediagnostik des LGL konnte BTV-8 Genom nachgewiesen werden.

Die Impfwirksamkeitskontrolle ergab höchste gemessene ELISA-Ak-Titer im Median von 1:16 bei Rindern und von 1:2 bei Schafen im ersten Jahr der Impfung. Im zweiten Jahr der Impfung lagen die Titer deutlich höher, nämlich bei Rindern im Median bei 1:32 und bei Schafen bei 1:23. Neutralisierende Antikörper konnten bei Rindern und Schafen in den meisten untersuchten Betrieben erst nach der Impfung im zweiten Jahr nachgewiesen werden. Ausnahmen bildeten einige wenige Rinder, die nach dem Boost im Median einen SNT-Titer von 1:23 aufwiesen. Eine Kreuzneutralisation der Serotypen BTV-1, -2, -4 und -16 durch Serumantikörper der Tiere mit den höchsten ELISA-Ak-Titern erfolgte nur gegen BTV-1 bei allen Tieren mit Titern zwischen 1:2 und 1:22.

PBMC der untersuchten Tiere reagierten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probennahme verschieden stark auf eine Lektinstimulation (Con A, Positivkontrolle), auf die Restimulation mit BTV-8 und die heterologe Stimulation mit BTV-1. Im ELISPOT bildeten PBMC einiger Tiere mehr IFN- $\gamma$  spezifische Spots nach der homologen Restimulation mit BTV-8, andere reagierten stärker auf den BTV-1 Stimulus. Eine BTV Serotyp übergreifende zelluläre Reaktion konnte mit diesen beiden Serotypen nachgewiesen werden.

Die intramuskuläre und intravenöse Fehlapplikation des Impfstoffes beim Schaf führte weder zu einem Nachweis von Impfvirusgenom im Blut noch zu Nebenwirkungen. Nach intramuskulärer Applikation war eine signifikant höhere optische Dichte im Ak-ELISA messbar als nach subkutaner Applikation.

Bei den Rindern, denen eine vierfache Impfdosis BTVPUR AISap 8 verabreicht wurde, konnten sowohl im Ak-ELISA als auch im SNT signifikant höhere Titer nachgewiesen werden als bei Rindern, die die vorgeschriebene einfache Impfdosis erhalten hatten.

Die Wiederholung der Impfung bei Schafen wirkte sich durch höhere Serum-Ak-Titer im ELISA aus, die länger auf dem höheren Niveau bestehen blieben. Nach der vierten Impfstoffapplikation mit einem neu hinzugekommenen Impfstoff war der Titer mit 1:32 im Median am höchsten. Neutralisierende Antikörper gegen BTV-8 waren wiederum erst nach der vierten Impfung bei allen Schafen nachweisbar.

Natürlich infizierte Rinder, die entweder durch vorhandene ELISA-Ak oder BTV-8 Genomnachweis im Blut identifiziert wurden, wiesen Antikörpertiter zwischen 1:1 und 1:256 vor der Impfung auf. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung lagen die Titer bei diesen Tieren zwischen 1:16 und 1:256. Virus neutralisierende Serumantikörper waren bei allen natürlich infizierten Tieren nachweisbar mit Titern zwischen 1:8 und 1:512.

## **Schlussfolgerungen**

Die Grundimmunisierung führt bei Schafen und Rindern zu vergleichsweise niedrigen Antikörpertitern im cELISA, und nicht nachweisbaren Titern im SNT. Die Applikation des Impfstoffes i.m. oder auch die Erhöhung der Dosis führten zu einer Erhöhung der ELISA-Ak-Titer; Nebenwirkungen waren bei den entsprechend geimpften Tieren nicht feststellbar. Auch die Wiederholung der Impfung beim Schaf führte zu einer Erhöhung der ELISA-Ak-Titer. Neutralisierende Ak wurden bei den meisten Tieren erst nach der Impfung im zweiten Jahr mit dem Impfstoff BTV PUR AISap 8 nachgewiesen.

Eine zelluläre Immunreaktion, gemessen an der Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) Sekretion nach in vitro Virusrestimulation von mononukleären Blutzellen (PBMC), wurde in dieser Arbeit erstmals bei Tieren im Feld bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse zur zellulären Immunreaktion gegen BTV mit selektierten und limitierten Blutproben sind ein erster experimenteller Ansatz zur



---

weiteren Evaluation von zellulären Immunreaktionen nach der BTV-Impfung von Rind und Schaf.

## **VII. SUMMARY**

### **Humoral and Cellular Immune Responses after Vaccination against BTV-8 in Sheep and Cattle in Selected Farms in Bavaria**

Alexandra Hund

The objectives of this study were the determination of the prevalence of BTV-8 infections in selected Bavarian cattle and sheep farms and the evaluation of humoral and cellular immune responses of cattle and sheep after compulsory vaccination with the vaccines BLUEVAC-8, BTVPUR AISap 8 and Bovilis BTV-8 in the years 2008 and 2009. The safety of the vaccine when not applied according to the producers' instructions (i.v., i.m.) and the detectability of the genome of the vaccinevirus in the blood of sheep vaccinated i.v. and i.m. were tested as well. The effect of an increase of the BTV PUR AISap-8-dose in cattle and of repeated vaccination of sheep (four vaccinations) was tested. Immune reactions of animals, which had been diagnosed to be naturally infected before the vaccinations were evaluated.

#### **Material and Methods**

The prevalence of BTV-8 in sheep and cattle farms was measured using a cELISA and a RT-qPCR. After vaccination of the animals against BTV-8 the effect of the vaccination was assessed by the determination ELISA-antibody titer and of neutralising antibodies against BTV-8, as well as BTV-1, -2, -4 and -16 (cross neutralisation). Furthermore the ability of the vaccine to induce a cellular immune response was measured by determination of the secretion of interferon-gamma after in vitro restimulation of peripheral blood mononuclear cells with BTV-8 and BTV 1 (IFN- $\gamma$  ELISPOT).

The safety after wrongful application was evaluated using the clinical symptoms and the antibody titers in ELISA and SNT. The detection of the genome of the vaccine-virus in the blood of animals vaccinated i.v. and i.m. was attempted using a RT qPCR.

The effect of the repetition of the application of the vaccine was examined using cELISA, SNT and IFN- $\gamma$  ELISPOT. These tests were used as well to examine naturally infected animals.

## Results

BTV antibodies were detected in nine animals from the selected farms; BTV genome was detected in 15 samples that had been submitted for routine screening to the Bavarian Health and Food Safety Authority.

Following vaccination cattle developed a median ELISA-antibody titer of 1:16 and sheep of 1:2 at its peak in the first year of the vaccination campaign. In the second year the median titers were higher: 1:32 in cattle and 1:23 in sheep. Neutralising antibodies were detected in most cases for the first time after this second vaccination, except for cattle in one farm, which developed a titer of neutralising antibodies of 1:23 after the boost.

Cross neutralisation of the serotypes BTV-1, -2, -4 and -16 by serum of the animals with the highest ELISA-antibody titers could only be detected against BTV-1 in all animals with titers between 1:2 and 1:22.

PBMC of the tested animals reacted at different times of sampling with different intensity to the stimulation with lectines (ConA, positive control), to the restimulation with BTV-8 and the heterologous stimulation with BTV-1. In the ELISPOT assay more IFN- $\gamma$  specific spots were often formed after the stimulation with BTV-8, but at other times after the stimulation with BTV-1. This is considered to be a non-serotype-specific cellular reaction with BTV-8 and BTV-1.

No clinical signs occurred and vaccine virus genome could not be detected following i.m. or i.v. application of the vaccine BLUEVAC-8. Following the i.m. application the optical density was significantly higher in the cELISA than after s.c. application.

Cattle given a four times higher dose of BTVPUR AISap 8 developed higher titers in cELISA and SNT than cattle vaccinated with the dose according to the label.

The repetition of the vaccination of sheep led to higher ELISA-antibody titers, which remained longer on a higher level. After the fourth vaccination with a new vaccine the titer was the highest with 1:32.

Neutralising antibodies against BTV-8 were first detectable after the fourth vaccination.

Naturally infected cattle identified by the presence of antibodies or BTV-8 genome in their blood prior to the vaccination had ELISA-antibody titers between 1:1 and 1:256 at that time. After the vaccination the titers ranged from 1:16 to 1:256.

Neutralising antibodies were detected in all naturally infected animals with titers between 1:8 and 1:512.

## **Conclusions**

The basic vaccination led to low titers (ELISA) or not detectable ones (SNT) in blood samples of cattle and sheep. The i.m. application of the vaccine or the increase of dose led to higher ELISA titers; side effects did not occur in these animals. The repetition of the vaccination in sheep led to an increase in ELISA-titers. Neutralising antibodies first occurred in most animals after the vaccination in the second year.

The cellular immune response measured as secretion of IFN- $\gamma$  after in vitro restimulation of PBMC with BTV was evaluated in this study for the first time in the field. The results are a first experimental approach for further evaluation of cellular immune response after the BTV vaccination in cattle and sheep.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Afshar A., Bluetongue: Laboratory diagnosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994; 17, 221-242.

Batten C.A., Bachanek-Bankowska K., Bin-Tarif A., Kgosana L., Swain A.J., Corteyn M., Darpel K., Mellor P.S., Elliott H.G., Oura C.A., Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol* 2008; 129, 80-88.

Biteau-Coroller F., Gerbier G., Stärk K.D.C., Grillet C., Albina E., Zientara S., Roger F., Performance evaluation of a competitive ELISA test used for Bluetongue antibody detection in France, a recently infected area. *Vet Microbiol* 2006; 118, 57-66.

Bonneau K.R., Mullens B.A., MacLachlan N.J., Occurrence of Genetic Drift and Founder Effect during Quasispecies Evolution of the VP2 and NS3/NS3A Genes of Bluetongue Virus upon Passage between Sheep, Cattle, and *Culicoides sonorensis*. *J Virol* 2001; 75, 8298-8305.

Brewer A.W., MacLachlan N.J., Ultrastructural Characterization of the Interaction of Bluetongue Virus with Bovine Erythrocytes in vitro. *Vet Pathol* 1992; 29, 356-359.

Brewer A.W., MacLachlan N.J., The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. *Arch Virol* 1994; 136, 287-298.

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Anzahl der bestätigten Blauzungenkrankheits-Fälle in Deutschland Adresse: [http://www.bmelv.de/cIn\\_182/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungen-FaelleDeutschland2006.html?nn=449622](http://www.bmelv.de/cIn_182/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungen-FaelleDeutschland2006.html?nn=449622). Letzter Zugriff: 24. März 2010.

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Anzahl der bestätigten Blauzungenkrankheits-Fälle in Deutschland, Adresse: [http://www.bmelv.de/cln\\_182/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungen-FaelleDeutschland2007.html?nn=449622](http://www.bmelv.de/cln_182/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungen-FaelleDeutschland2007.html?nn=449622). Letzter Zugriff: 24. März 2010.

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Anzahl der bestätigten Blauzungenkrankheits-Fälle in Deutschland, Adresse: [http://www.bmelv.de/cln\\_182/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungen-FaelleDeutschland2008.html?nn=449622](http://www.bmelv.de/cln_182/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungen-FaelleDeutschland2008.html?nn=449622). Letzter Zugriff: 24. März 2010.

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Anzahl der bestätigten Blauzungenkrankheits-Fälle in Deutschland, Adresse: [http://www.bmelv.de/cln\\_182/sid\\_1915264A27C9DD910641875F46CA9B13/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungen-FaelleDeutschland2009.html?nn=449622](http://www.bmelv.de/cln_182/sid_1915264A27C9DD910641875F46CA9B13/SharedDocs/Standardartikel/Landwirtschaft/Tier/Tiergesundheit/Blauzungenkrankheit/Blauzungen-FaelleDeutschland2009.html?nn=449622). Letzter Zugriff: 24. März 2010.

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55, 611-622.

Cherrington J.M., Ghalib H.W., Sawyer M.M., Osburn B.I., Detection of viral antigens in bluetongue-virus infected ovine tissues, using the peroxidase-antiperoxidase technique. *Am J Vet Res* 1985; 48, 2356-2359.

Clausen P.H., Stephan A., Bartsch S., Jandowsky A., Hoffmann-Köhler P., Schein E., Mehlitz D., Bauer B., Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, *Culicoides* spp.) on dairy farms of Central Germany during the 2007/2008 epidemic of bluetongue. *Parasitol Res* 2009; 105, 381-386.

Conraths F.J., Gethmann J.M., Staubach C., Mettenleiter T.C., Beer M., Hoffmann B., Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* 2009; 15, 433-435.

Cox J., Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay. *Methods* 2006; 38, 274-282.

Czerkinsky C., Andersson G., Ekre H.-P., Nilsson L.-Å., Klareskog L., Ouchterlony Ö., Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988; 110, 29-36.

De Clercq K., Mertens P., De Leeuw I., Oura C., Houdart P., Potgieter A.C., Maan S., Hooyberghs J., Batten C., Vandemeulebroucke E., Wright I.M., Maan N., Riocreux F., Sanders A., Vanderstede Y., Nomikou K., Raemaekers M., Bin-Tarif A., Shaw A., Henstock M., Breard E., Dubois E., Gastaldi-Thiery C., Zientara S., Verheyden B., Vandenbussche F., Emergence of bluetongue serotypes in Europe, part 2: the occurrence of a BTV-11 strain in Belgium. *Transbound Emerg Dis* 2009; 56, 355-361.

DeMaula C.D., Heidner H.W., Rossitto P.V., Pierce C.M., MacLachlan N.J., Neutralization Determinants of United States Bluetongue Virus Serotype Ten. *Virology* 1993; 195, 292-296.

Doherty P.C., The Numbers Game for Virus-Specific CD8+ T Cells. *Science* 1998; 280, 227.

Eaton B.T., Crameri G.S., The site of bluetongue virus attachment to glycoporphins from a number of animal erythrocytes. *J Gen Virol* 1989; 70 ( Pt 12), 3347-3353.

El Hussein A., Calisher C.H., Holbrook F.R., Schoepp R.J., Beaty B.J., Detection of bluetongue virus antigens in *Culicoides variipennis* by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1989; 27, 1320-1323.

EMA, European Public Assessment Report (EPAR), BTVPUR AISap 8, EPAR summary for the public, 2009, EMA V/C/146

Eschbaumer M., Hoffmann B., König P., Teifke J.P., Gethmann J.M., Conraths F.J., Probst C., Mettenleiter T.C., Beer M., Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Vaccine* 2009a; 27, 4169–4175.

Eschbaumer M., Hoffmann B., Moss A., Savini G., Leone A., König P., Zemke J., Conraths F., Beer M., Emergence of bluetongue virus serotype 6 in Europe - German field data and experimental infection of cattle. *Vet Microbiol* 2009b; [Epub ahead of print].

Eschbaumer M., Wäckerlin R., Hoffmann B., Beer M., Re: Detection of bluetongue virus genome after vaccination with an inactivated vaccine. *Vaccine* 2010; 28, 881-882.

French T.J., Roy P., Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J Virol* 1990; 64, 1530-1536.

Gethmann J., Hüttner K., Heyne H., Probst C., Ziller M., Beer M., Hoffmann B., Mettenleiter T.C., Conraths F.J., Comparative safety study of three inactivated BTV-8 vaccines in sheep and cattle under field conditions. *Vaccine* 2009; 27, 4118-4126.

Gibbs E.P., Greiner E.C., The epidemiology of bluetongue. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994; 17, 207-220.

Hateley G., Bluetongue in northern Europe: the story so far. *In Pract* 2009; 31, 202-209.

Hoffmann B., Depner K., Schirrmeyer H., Beer M., A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods* 2006; 136, 200-209.



Hoffmann B., Bluetongue Virus Serotype 8 Reemergence in Germany, 2007 and 2008. *Emerg Infect Dis* 2008; 14, 1421-1423.

Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G., Thuer B., Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2008; 14, 1855-1861.

Hübschle O.J.B., Bluetongue virus hemagglutination and its inhibition by specific sera. *Arch Virol* 1980; 64, 133-140.

Huismans H., Erasmus B.J., Identification of the serotype-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res* 1981; 48, 51-58.

Huismans H., Van Dijk A.A., Bluetongue Virus Structural Components. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 162, 21-41.

Institut Pourquier, Adresse: <http://www.institut-pourquier.fr/en>. Letzter Zugriff: 22. Dezember 2009.

Jeggo M.H., Wardley J.C., Generation of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus types. *Immunology* 1982a; 45, 629-635.

Jeggo M.H., Wardley R.C., Production of murine cytotoxic T lymphocytes by bluetongue virus following various immunisation procedures. *Res Vet Sci* 1982b; 33, 212-215.

Jeggo M.H., Wardley R.C., Brownlie J.A., A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. *Immunology* 1984a; 52, 403-410.

Jeggo M.H., Wardley R.C., Taylor W.P., Role of neutralising antibody in passive immunity to bluetongue infection. *Res Vet Sci* 1984b; 36, 81-86.

Jeggo M.H., Wardley R.C., Brownlie J., Corteyn A.H., Serial inoculation of sheep with two bluetongue virus types. *Res Vet Sci* 1986; 40, 386-392.

Jeggo M.H., Wardley, R.C., Bluetongue vaccine: cells and/ or antibodies. *Vaccine* 1985; 3, 57-58.

Jennings M., Boorman J., Use of the indirect fluorescent antibody technique for the detection of bluetongue virus antigen in tissue smears from *Culicoides variipennis*. *Vet Microbiol* 1980; 5, 13-18.

Jochim M.M., Jones S.C., Identification of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease virus by immunofluorescence with monoclonal antibodies. *Proc Amer Vet Lab Diagn* 1983; 26, 277-286.

Kahlon J., Sugiyama K., Roy P., Molecular basis of bluetongue virus neutralization. *J Virol* 1983; 48, 627-632.

Kalyuzhny A., Stark S., A simple method to reduce the background and improve well-to-well reproducibility of staining in ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 2001; 257, 93-97.

Katz J., Alstad D., Gustafson G., Evermann J., Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6, 139-142.

Lacetera N., Bernabucci U., Ronchi B., Scalia D., Nardone A., Moderate summer heat stress does not modify immunological parameters of Holstein dairy cows. *Int J Biometeorol* 2002; 46, 33-37.

Lalvani A., Brookes R., Hambleton S., Britton W.J., Hill A.V.S., McMichael A.J., Rapid Effector Function in CD8+ Memory T Cells. *J Exp Med* 1997; 186, 859-865.

Lobato Z.I.P., Coupar B.E.H., Gray C.P., Lunt R., Andrew M.E., Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 59, 293-309.

Luedke M.S., Jochim M.M., Clinical and Serologic Response in Vaccinated Sheep given Challenge Inoculation with Isolates of Bluetongue Virus. *Am J Vet Res* 1968; 29, 841-852.

Luzyanina T., Roose D., Schenkel T., Sester M., Ehl S., Meyerhans A., Bocharov G., Numerical modelling of label-structured cell population growth using CFSE distribution data. *Theor Biol Med Model* 2007; 4, 26.

MacLachlan N.J., Crafford J.E., Vernau W., Gardner I.A., Goddard A., Guthrie A.J., Venter E.H., Experimental Reproduction of Severe Bluetongue in Sheep. *Vet Pathol* 2008; 45, 310-315.

Mayr A., Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustitration). In: Mayr A., Bachmann, P.A., Bibrack, B., Wittmann, G. (Hg.), *Virologische Arbeitsmethoden*, Band 1. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1974; pp. 35-39.

Mehlhorn H., Walldorf V., Klimpel S., Jahn B., Jaeger F., Eschweiler J., Hoffmann B., Beer M., First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitol Res* 2007; 101, 219-228.

Mellor P.S., Wittmann E.J., Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet J* 2002; 164, 20-37.

Mertens P.P., Pedley S., Cowley J., Burroughs J.N., Corteyn A.H., Jeggo M.H., Jennings D.M., Gorman B.M., Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology* 1989; 170, 561-565.

Mintiens K., Méroc E., Mellor P.S., Staubach C., Gerbier G., Elbers A.R.W., Hendrickx G., De Clercq K., Possible routes of introduction of bluetongue virus

serotype 8 into the epicentre of the 2006 epidemic in north-western Europe. *Prev Vet Med* 2008; 87, 131-144.

OIE, Chapter 2.1.3 Bluetongue, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2009.

Onions D.E., The immune response to virus infections. *Vet Immunol Immunopathol* 1983; 4, 237-277.

Oura C.A.L., Wood J.L.N., Sanders A.J., Bin-Tarif A., Henstock M., Edwards L., Floyd T., Simmons H., Batten C.A., Seroconversion, neutralising antibodies and protection in bluetongue serotype 8 vaccinated sheep. *Vaccine* 2009; 27, 7326-7330.

Randal M., Kossiakoff A.A., The 2.0 A structure of bovine interferon-gamma; assessment of the structural differences between species. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2000; 56, 14-24.

Richards R.G., MacLachlan N.J., Heidner H.W., Fuller F.J., Comparison of virologic and serologic responses of lambs and calves infected with bluetongue virus serotype 10. *Vet Microbiol* 1988; 18, 233-242.

Roy P., Urakawa T., Van Dijk A.A., Erasmus B.J., Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *J Virol* 1990; 64, 1998-2003.

Roy P., Bluetongue virus proteins. *J Gen Virol* 1992; 73, 3051-3064.

Roy P., Bishop D.H.L., LeBlois H., Erasmus B.J., Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* 1994; 12, 805-811.

Roy P., Functional Mapping of Bluetongue Virus Proteins and Their Interactions with Host Proteins During Virus Replication. *Cell Biochem Biophys* 2008; 50, 143-157.

Roy P., Boyce M., Noad R., Prospects for improved bluetongue vaccines. *Nat Rev Micro* 2009; 7, 120-128.

Ruckerbauer G.M., Gray D.P., Girard A., G.L. B., Boulanger P., Studies on bluetongue and detection of the virus in infected materials by immunofluorescence. *Can J Comp Med* 1967; 31, 175-180.

Saegerman C., Hubaux M., Urbain B., Lengele L., Berkvens D., Regulatory issues surrounding the temporary authorisation of animal vaccination in emergency situations: the example of bluetongue in Europe. *Rev Sci Tech* 2007; 26, 395-413.

Saegerman C., Berkvens D., Mellor P.S., Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg Infect Dis* 2008; 14, 539-544.

Sathiyaseelan T., Baldwin C.L., Evaluation of cell replication by bovine T cells in polyclonally activated cultures using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) loading and flow cytometric analysis. *Res Vet Sci* 2000; 69, 275-281.

Savini, Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle *Vet Microbiol* 2009; 133, 1-8.

Savini G., Ronchi G.F., Leone A., Ciarelli A., Migliaccio P., Franchi P., Mercante M.T., Pini A., An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy. *Vet Microbiol* 2007; 124, 140-146.

Savini G., MacLachlan N.J., Sanchez-Vizcaino J.M., Zientara S., Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008; 31, 101-120.

Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A., Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75, 163-189.

Schwanig M., Die Zulassung von Impfstoffen Regelungen und Prozesse auf europäischer Ebene. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2002; 45, 338-343.

Smith J.G., Liu X., Kaufhold R.M., Clair J., Caulfield M.J., Development and Validation of a Gamma Interferon ELISPOT Assay for Quantitation of Cellular Immune Responses to Varicella-Zoster Virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8, 871-879.

Stirtzinger T., Valli V.E., Jacobs R.M., Beiner L., Jansen B., In vitro response of purified ovine peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin-M. *Can J Vet Res* 1986; 50, 115.

Stott J.L., Barber T.L., Osburn B.I., Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus. *Am J Vet Res* 1985; 46, 1043-1049.

Takamatsu H., Jeggo M.H., Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. *Immunology* 1989; 66, 258-263.

Taylor J.B., Strickland J.R., In vitro effect of swainsonine on bovine and ovine lymphoblastogenesis. *J Anim Sci* 1998; 76, 2857-2862.

Thiry E., Saegerman C., Guyot H., Kirten P., Losson B., Rollin F., Bodmer M., Czaplicki G., Toussaint J.F., De Clercq K., Dochy J.M., Dufey J., Gillemann J.L., Messeman K., Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec* 2006; 159, 327.

Todryk S.M., Pathan A.A., Keating S., Porter D.W., Berthoud T., Thompson F., Klenerman P., Hill A.V.S., The relationship between human effector and memory T cells measured by *ex vivo* and cultured ELISPOT following recent and distal priming. *Immunology* 2009; 128, 83-91.

Toussaint J.F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K., Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods* 2007a; 140, 115-123.

Toussaint J.F., Sailleau C., Mast J., Houdart P., Czaplicki G., Demeestere L., VandenBussche F., van Dessel W., Goris N., Breard E., Bounaadja L., Etienne T., Zientara S., De Clercq K., Bluetongue in Belgium, 2006. *Emerg Infect Dis* 2007b; 13, 614-616.

Van der Walt N.T., A hemagglutination and hemagglutination inhibition test for bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res* 1980; 47, 113-117.

Vandenbussche F., Vanbinst T., Verheyden B., Van Dessel W., Demeestere L., Houdart P., Bertels G., Praet N., Berkvens D., Mintiens K., Goris N., De Clercq K., Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. *Vet Microbiol* 2008; 129, 15-27.

Verordnung zur Durchführung gemeinschaftlicher Vorschriften über Maßnahmen zur Bekämpfung, Überwachung und Beobachtung der Blauzungenkrankheit (EG-Blauzungenbekämpfungs-Durchführungsverordnung), zuletzt geändert durch die Bekanntmachung der Neufassung der EG-Blauzungenbekämpfungs-Durchführungsverordnung vom 24. September 2008 (BGBl. I S. 1905)

Verordnung über bestimmte Impfstoffe zum Schutz vor der Blauzungenkrankheit (BlauzungenImpfStV), in der Fassung vom 2. Mai 2008 (Bundesanzeiger vom 6. Mai, S. 1599)

Wäckerlin R., Eschbaumer M., Schulz C., Beer M., Hoffmann B., Vergleichende Untersuchungen zugelassener serologischer Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen das Bluetongue-Virus. *LabLoeffler* 2009; 02, 2-4.

Ward M.P., The epidemiology of bluetongue virus in Australia - a review. *Aust Vet J* 1994; 71, 3-7.

Wattegedera S., Sills K., Howard C., Hope J., McInnes C., Entrican G., Variability in cytokine production and cell proliferation by mitogen-activated ovine peripheral blood mononuclear cells: modulation by interleukin (IL)-10 and IL-12. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102, 67-76.

Wattegedera S S.K., Howard CJ, Hope JC, McInnes CJ, Entrican G, Variability in cytokine production and cell proliferation by mitogen-activated ovine peripheral blood mononuclear cells: modulation by interleukin (IL)-10 and IL-12. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102, 67-76.

Whetter L.E., Maclachlan N.J., Gebhard D.H., Heidner H.W., Moore P.F., Bluetongue Virus Infection of Bovine Monocytes. *J Gen Virol* 1989; 70, 1663-1676.

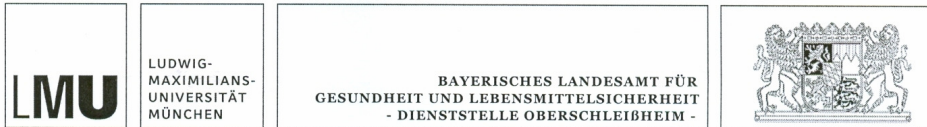
Wilson A., Darpel K., Mellor P.S., Where Does Bluetongue Virus Sleep in the Winter? *PLoS Biol* 2008; 6, 210.



# IX. ANHANG

## 1. Material und Methoden

### 1.1. Fragebogen



## Fragebogen für Landwirte

im Zusammenhang mit der Probennahme für  
das BT- / BKF- und BVD-Projekt  
des LGL Oberschleißheim und der LMU München

Datum der Probennahme: \_\_\_\_\_

Betriebs-ID:

Regierungsbezirk:     **UFR**     **OFR**     **MFR**     **OPF**  
                              **NBY**     **OBY**     **SWB**

Landkreis:

## Betrieb

Name:

Straße / Haus-Nr.:

PLZ / Ort:

Telefon-Nr.:

Betriebs-Nr.:

## Tiere

- Rinder                       Schafe                       Ziegen
- andere Nutztiere (Welche?):

Zahl der **Rinder** insgesamt:

davon \_\_\_\_\_ Kälber (bis 6 Monate)

\_\_\_\_\_ Jungtiere (über 6 bis 24 Monate bzw. weibl. bis zur 1. Kalbung)

\_\_\_\_\_ Kühe

\_\_\_\_\_ Bullen

- Nutzungsart:**     Milchvieh                       Mutterkuhhaltung
- Mastvieh                       Aufzuchtbetrieb

Welche Nutzungsart hauptsächlich:

**Rasse(n):**    hauptsächlich gehalten:

                  andere Rassen gehalten:

Zahl der **Schafe** insgesamt:

davon \_\_\_\_\_ Lämmer (bis 9 Monate)

\_\_\_\_\_ Jungschafe (über 9 bis 18 Monate bzw. weibl. bis zum 1. Ablammen)

\_\_\_\_\_ Mutterschafe (ab 19 Monate)

\_\_\_\_\_ Böcke

- Haupterwerb     Nebenerwerb                       Hobbyhaltung

- Nutzungsart:**     Zucht                       Milch                       Mast

Welche Nutzungsart hauptsächlich:

**Rasse(n):**    hauptsächlich gehalten:

                  andere Rassen gehalten:

## Haltung

### Rinder:

Weidehaltung     Stallhaltung     Stall- und Weidehaltung

Bei Stall und Weide kombiniert:     saisonal     asaisonal

Welche Tiergruppen haben Weidegang?

Haltungsform:     Laufstall     Anbindestall

Aufstallungstyp:    (z.B. Tiefstreu, Hoch-/Tiefboxen, Gitterrost, Iglu, ...)

Welche Tiergruppen sind wie aufgestallt?

### Schafe:

Weidehaltung     Stallhaltung     Stall- und Weidehaltung

Bei Stall und Weide kombiniert:     saisonal     asaisonal

Welche Tiergruppen haben Weidegang?

Haltungsform:

### Kontakt der Tiere im Betrieb

direkt:     direkt auf der Weide     direkt im Stall

Welche Tierarten/Altersgruppen haben direkten Kontakt miteinander?

**ja/möglich/nein**

indirekt: über Geräte (z.B. Schubkarren, Gabel, etc.):   

über Personen:   

durch den Weidewechsel:   

Welche Tierarten/Altersgruppen haben indirekten Kontakt miteinander?

Kontakt zu anderen Tieren/Herden:

Pensionstiere	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Tierklinik	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Austellungen/Märkte/Hoffest etc.	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Wanderschäfer auf Weide/Wiese	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Kontakt zu Tieren im Ort/Umgebung	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

## Sonstiges

Zukäufe (im letzten Jahr):  nein  ja

Welche Tierart (Rd./Schf./Zg.)?

Woher?

Wie viele/ welche (Ohrmarken-Nr.)?

Tierverluste:  nein  ja

Welche Tierart (Rd./Schf./Zg.)?

Wie viele?

Wodurch?

Seit 2007 vermehrt?

**BT- Fälle:**  nein/unbekannt  ja

Falls „ja“: Wann? Wie viele? Welche Tierarten/ -gruppen?

## Symptome

Sind im Jahr 2007 oder 2008 folgende Symptome aufgetreten:

Rind	Schaf	Ziege	Symptom
			Läsionen an Flotzmaul / Lippen / Nasenöffnungen
			Läsionen in der Maulhöhle
			Nasenausfluss (klar / getrübt)
			Augenveränderungen (Ausfluss / Konjunktiven / Hornhaut / Skleren)
			Ödeme am Kopf / um die Augen
			Läsionen an den Klauen / im Zwischenklauenspalt (mit/ohne Lahmheit)
			Fieber
			Durchfall
			Haut-/ Fellveränderungen (rund / flächig, schuppig / nässend, Krusten)
			<b>Reproduktionsstörungen:</b>
			Gehäuftes Umrindern/ Umbocken (Änderungen: z.B. neuer Stier, Besamungstechniker, Management ...)
			Aborte, Mumifikation, Frühgeburten, Totgeburten
			Geburt lebensschwacher Kälber/ Lämmer?
			Missbildungen?
			Sonstiges

## Impfungen

BTV8-Impfung:  ja  nein

Welcher Impfstoff?  Merial  CZV

Wann wurde geimpft?

Wurden alle(!) Tiere geimpft? (Nicht geimpfte, z.B. wegen Krankheit, vermerken!)

**andere Impfungen:**

## Insektenbekämpfung

Anwendung von Ektoparasitika  ja  nein

Wenn ja: Was, wie oft und welche Tiere?

## **2. Ergebnisse**

### **2.1. Ergebnisse der Auswertung der Fragebögen**

Siehe dazu Tab. IX.1, Tab. IX.2 und Tab. IX.3.

### **2.2. Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Schafe mit i.v. und i.m. Applikation des Impfstoffes**

Siehe dazu Tab. IX.4.

Tab. IX.1: Daten aus den untersuchten Betrieben über Tiere, deren Nutzung und Rassen

Betrieb Nr.	Zahl der Rinder	Zahl der Schafe	andere Tiere <sup>1</sup>	Nutzung Rind <sup>2</sup>	eigene Aufzucht	Rinder rassen <sup>3</sup>	Haupterwerb Rind	Nutzung Schaf	Schaf-rassen <sup>5</sup>	Haupterwerb Schaf
1	55	11	P, H, K	1	x	1	x	1, 2	2	
2	126	58	Nein	1		1, 6	x	2	3	
3	78	23	G, K	1	x	1, 6	x	1, 2	11	
4	133	20	K	1	x	1	x	1, 2	11	
5	160	12	Nein	1	x	1, 6	x	1, 2	5, 4, 11	
6	105	22	G, K, H	1	x	1	x	1, 2	11	
7	37	23	K, H	1	x	1	x	1, 2	1	
8	39	220	G, H, K	1	x	1, 4	x	1, 2	4, 11	x
9	62	13	G, P	1	x	1	x	1	1	
10	101	14	Nein	1	x	4	x	1	2	
12	167	41	S, H	1	x	1, 2	x	1	3, 10, 2	
13	108	13	Nein			1	x	1	1	
14	13	0	Nein	1		2, 3		/	/	/
15	0	300	Nein	/	/	/	/	k.A.	k.A.	k.A.
16	95	24	S, H, K	1	x	1	x	1	1	
17	183	50	S, G, Ha, H, K	1, 3		1, 2	x	1	6, 7	
18	0	19	H	/	/	/	/	1	1, 10	
19	4	35	Nein	3		1, 6		1	3, 4, 8	
20	0	19	S	/	/	/	/	1	11	
23	0	19	Nein	/	/	/	/	1	4, 3	
25	0	19	G	/	/	/	/	1	11	
28	15	100	S	4		1, 2		4, 2	2, 11	
22	18	0	Nein	2		5, 1		/	/	/

1) P: Pferde, Ha: Hasen, S: Schweine, G: Geflügel, H: Hunde, K: Katzen; 2) 1: Milchvieh, 2: Mutterkuhhaltung, 3: Mastvieh, 4: Ausbildung von Studenten der Tiermedizin. Das Erstgenannte stellt die hauptsächliche Nutzungsart dar; 3) 1: Deutsches Fleckvieh, 2: Deutsche Schwarzbunte/ Holstein Friesian, 3: Deutsche Rotbunte, 4: Braunvieh, 5: Pinzgauer, 6: Kreuzungen. Der erstgenannten Rasse gehören die meisten Tiere an; 4) 1: Mast, 2: Zucht. Das Erstgenannte stellt die hauptsächliche Nutzungsart dar; 5) 1: Coburger Fuchs, 2: Bergschaf, 3: Schwarzkopfschaf, 4: Merino, 5: Rhönschaf, 6: Texel, 7: Kamerunschaf, 8: Blaukopfschaf, 9: Heidschnucken, 10: Milchschafe, 11: Kreuzungen; k.a.: keine Angabe; /: Tierart im Betrieb nicht vorhanden

Tab. IX.2: Daten aus den untersuchten Betrieben über Haltung und Weidegang der Tiere. Legende siehe IX.2.1.

Betrieb Nr.	Haltung Kühe <sup>1</sup>	Jungvieh <sup>1</sup>	Kälber <sup>2</sup>	Gruppenhaltung Kälber	Weidegang Rind	Weidegang Tiergruppen Rind	Weidegang Schafe	Weidegang Tiergr. Schaf
1	A	A	B		x	alle	x	alle
2	L	L	I				x	alle
3	A	L	B	x			x ganzjährig	alle
4	L	L	I	x	x	Jungvieh	x ganzjährig	alle
5	L	L	I	x			x	alle
6	L	L	B	x	x ganzjährig	Kühe	x	alle
7	A	A	B	x			x	alle
8	A	A	B		x	alle	x	alle
9	A	A	B	x			x ganzjährig	alle
10	L	L	B	x			x	alle
12	L	L	B	x			x	alle
13	L	L	I				x ganzjährig	alle
14	A	/	/		x	alle	/	/
15	/	/	/	/	/	/	x	alle
16	L	L	B	x			x	alle
17	L	L	B	x			x	alle
18	/	/	/	/	/		x ganzjährig	alle
19	/	A						keine
20	/	/	/	/	/		x ganzjährig	alle
23	/	/	/	/	/		x ganzjährig	alle
25	/	/	/	/	/		x ganzjährig	alle
28	A	/					x ganzjährig	alle
22	A	A			x	alle	/	/

1) A: Anbindestall, L: Laufstall; 2) B: Kälberbox, I: Kälberiglu; / Tierart im Betrieb nicht vorhanden



Tab. IX.3: Daten aus den untersuchten Betrieben über Kontakt der Tiere und Krankheitssymptome. Legende siehe IX.2.1.

Betrieb Nr	Kontakt dir.	Kontakt indir.	Zukäufe Rinder (n)	Zukäufe Schafe (n)	Kontakt zu hof fremden Tieren	Tierverluste Rind <sup>1</sup>	Tierverluste Schaf	BT-Fälle <sup>2</sup>	Repro-Störungen Rind (n) <sup>3</sup>	Repro-Störungen-Schaf (n) <sup>3</sup>	Symptome sonstiges	Andere Impfungen <sup>4</sup>	Insektenbekämpfung <sup>5</sup>
1		x	1		x	3					ZNS- Störungen bei trächtigen Schafen		R, S
2		x							1 M			R/C	R, S
3		x			x				1 M	1 L		R/C	R
4	x	x			x	1			2 A, K	L	Limax beim Rind, Moderhinke (MH) bei Schafen		R, S
5	x	x	1		x				1 M		Euter-Schenkel-Dermatitis		R
6	x	x							2 A				
7		x							2A, 2 L			R/C	R
8	x	x	2								Lämmer: Lippengrind		R, S
9		x							K				
10	x	x			x	2			A		Rind: Dermatitis digitalis (DD), Flechte	R/C	R
12		x	1	10	x	1	2		5 A, 5 L, R, K	5 L	Schaf: NA, Moderhinke, Rind: DD, Flechten, Kryptosporidien		R
13			10	alle			2		2 A		Limax		R
14			alle			1		1					R
16		x										G	
17			1	1							Kälber mit eitrigem NA		R, S
18				1	x								
19	x	x	4	alle	x		2			3 T			
20				2			2						S
23							2			3 L	Durchfall		S
25										1T,2M	Schaf Lungenentzündung		S
28		x	x	x	x		2			L, T, M			
29			x					2					

Angaben beziehen sich auf die letzten zwei Jahre vor der Befragung; 1) 1: Andere, 2: unbekannt, 3: BKF; 2) 1: ein Rind 2007 klinisch erkrankt, 2: ein Rind 2008 klinisch erkrankt, bei sechs weiteren wurde BTV-8 Genom nachgewiesen; 3) A: Abort, K: niedrige Konzeptionsrate, L: Lebensschwache Nachkommen M: Missbildungen, R: retentio secundarium, T: Totgeburt; 4) R/C: Rota-Corona-Impfung, G: Rinderrippe; 5) R: Insektenbekämpfung beim Rind, S: beim Schaf; NA: Nasenausfluss



### 3. Tabellenverzeichnis

Tab. III.1: Ausgewählte Betriebe mit Angabe der Gesamtzahlen der Tiere und der davon untersuchten Tiere.....	21
Tab. III.2: Stamm und Herkunft der eingesetzten BTV Serotypen .....	25
Tab. III.3: BTV-8 Primer und Sonden für die BTV-8 RT-qPCR.....	30
Tab. III.4: Enhanced Green Fluorescent Protein Nr. 4 (EGFP) Primer und Sonden zur Detektion der IC für die BTV-8 RT-qPCR .....	30
Tab. III.5: PanBTV Primer und Sonden für die PanBTV RT-qPCR .....	30
Tab. III.6: Interne Kontrolle: Enhanced Green Fluorescent Protein Nr. 1(EGFP) Primer und Sonden zur Detektion der IC für die PanBTV RT-qPCR .....	30
Tab. III.7: BTV-8 Mix für die BTV-8 RT-qPCR .....	31
Tab. III.8: EGFP Mix Nr. 4 für die BTV-8 RT-qPCR.....	31
Tab. III.9: PanBTV Mix für die PanBTV RT-qPCR .....	31
Tab. III.10: EGFP Mix Nr. 1 für die PanBTV RT-qPCR .....	32
Tab. III.11: Mastermix für die BTV-8 RT-qPCR .....	32
Tab. III.12: Mastermix für die PanBTV RT-qPCR.....	33
Tab. III.13: Betriebe und Zeitpunkte der Probennahme .....	45
Tab. III.14: Thermalprofile der BTV-8 RT-qPCR(1) und der PanBTV RT-qPCR(2) ..	46
Tab. III.15: In Betrieben verwendete Impfstoffe bei Schafen und Rindern in den Jahren 2008 und 2009 .....	49
Tab. III.16: Untersuchungen zur Impfwirksamkeitskontrolle beim Rind: Abstände zwischen den Probennahmen in den Betrieben und Anzahl der zu den Zeitpunkten der Probennahmen im Betrieb noch vorhandenen Tiere. ....	50

Tab. III.17: Untersuchungen zur Impfwirksamkeitskontrolle beim Schaf: Abstände zwischen den Probennahmen in den Betrieben und Anzahl der zu den Zeitpunkten der Probennahmen im Betrieb noch vorhandenen Tiere. ....	51
Tab. III.18: Betriebe, deren Tiere früh im Jahr 2008 geimpft wurden und Anzahl der untersuchten Rinder. ....	52
Tab. III.19: Betriebe, deren Tiere spät im Jahr 2008 geimpft wurden und Anzahl der untersuchten Rinder. ....	53
Tab. III.20: Proben, die zur Impfwirksamkeitskontrolle auf neutralisierende Antikörper untersucht wurden. ....	53
Tab. III.21: Betriebe mit Tieren aus der Routinediagnostik des LGL, bei denen mittels BTV-PCR BTV-8 Genom nachweisbar war. ....	60
Tab. IV.1: Im Fragebogen erhobene Daten von Betrieben mit Ak-positiven Tieren vor der Impfung. ....	61
Tab. IV.2: Betriebe und Impfstoffkombinationen in den Jahren 2008 und 2009. ....	66
Tab. IV.3: p-Werte der Vergleiche von ELISA-Ak-Titern von Rinderseren aus den genannten Betrieben nach Impfungen verschiedenen Impfstoffkombinationen. ....	66
Tab. IV.4: Antikörpertiter der Rindes Nr. 6 aus dem Betrieb Nr. 9 im ELISA und SNT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung gegen BTV-8. ....	68
Tab. IV.5: Antikörpertiter im ELISA und SNT von sieben Rindern aus dem Betrieb Nr. 3 vier Wochen nach der Impfung 2009. ....	69
Tab. IV.6: Antikörpertiter im ELISA und SNT von sieben Rindern aus dem Betrieb Nr. 5 vier Wochen nach der Impfung 2009. ....	70
Tab. IV.7: Antikörpertiter im ELISA und SNT von acht Rindern aus dem Betrieb Nr. 11 vier Wochen nach der Impfung 2009. ....	71
Tab. IV.8: ELISA-Serum-Ak-Titer von vier Rindern zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Boost gegen BTV-8. ....	75

---

Tab. IV.9: ELISA-Serum-Ak-Titer von vier Schafen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Impfung gegen BTV-8.....	77
Tab. IV.10: ELISA-Serum-Ak-Titer von zehn Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 fünf Wochen nach der Impfung gegen BTV-8.....	78
Tab. IV.11: Irrtumswahrscheinlichkeiten der Unterschiede der ELISA-Serum-Ak-Titer von i.m. und s.c. geimpften Schafen nach der Impfung.....	80
Tab. IV.12: ELISA-Serum-Ak-Titer von acht Rindern drei und fünf Wochen nach der dritten Impfung gegen BTV-8.....	83
Tab. IV.13: Antikörpertiter im ELISA und Reaktivität gegen BTV-1, -2, -4, -8, und BTV-16 im SNT von fünf Schafen und sechs Rindern.....	87
Tab. IV.14: IFN- $\gamma$ spezifische absolute Spotzahlen bei Mitogenstimulation der PBMC von zwei Schafen nach Einsatz verschiedener Blockingpuffer und Mitogene als Positivkontrolle.....	89
Tab. IV.15: IFN- $\gamma$ spezifische Spotzahlen in % nach Stimulation mit PHA und PWM und Einsatz verschiedener Blockingpuffer im Verhältnis zu ConA = 100 % .....	89
Tab. IV.16: IFN- $\gamma$ spezifische Spotzahlen der PBMC von drei Schafen nach Inkubation mit erhöhter Mitogenkonzentration in % im Verhältnis zur Standardkonzentration ConA 5 $\mu$ g/ml (= 100 %) .....	90
Tab. IV.17: Tiere mit im Serum nachweisbaren BTV-8-ELISA-Antikörpern vor der Impfung .....	91
Tab. IV.18: Betriebe mit Tieren, bei denen in der Routinediagnostik des LGL mittels BTV-RT-qPCR BTV-8 Genom nachweisbar war.....	92
Tab. IV.19: Reziproke Ak-Titer von sechs Rindern aus dem Lkr. Dachau .....	93
Tab. IV.20: Reziproke Ak-Titer von einem Rind aus dem Lkr. Miltenberg .....	93

Tab. IV.21: Reziproke Ak-Titer von Seren zweier Rinder aus dem Betrieb Nr. 6 mit Nachweis von BTV-Ak vor der Impfung und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Impfung.....	93
Tab. IV.22: Reziproke Ak-Titer von Seren von zwei Rindern aus dem Betrieb Nr. 6 mit Nachweis von BTV-Ak vor der Impfung zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Impfung.....	93
Tab. IV.23: Reziproke Ak-Titer von acht Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 zu den angegebenen Zeiten nach der Impfung. ....	94
Tab. IV.24: IFN- $\gamma$ spezifische Spotzahlen nach der Stimulation von PBMC von vier Rindern mit ConA 1 und 3 $\mu\text{g/ml}$ im Verhältnis zu ConA 5 $\mu\text{g/ml}$ = 100 % .....	96
Tab. IV.25: ELISA-Ak-Titer von Seren von vier Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 vier Wochen nach dem Nachweis von BTV-Genom und der Impfung gegen BTV-8. ....	96
Tab. IV.26: IFN- $\gamma$ spezifische Spotzahlen nach der Stimulation der PBMC von drei Rindern mit PHA 5 $\mu\text{g/ml}$ im Verhältnis zu ConA = 100 % und verschiedenen MOI bei BTV-1 und -8 Restimulation.....	97
Tab. IV.27: ELISA-Serum-Ak-Titer der Rinder drei Wochen nach der Impfung 2009 .....	97
Tab. IX.1: Daten aus den untersuchten Betrieben über Tiere, deren Nutzung und Rassen.....	141
Tab. IX.2: Daten aus den untersuchten Betrieben über Haltung und Weidegang der Tiere. Legende siehe IX.2.1. ....	142
Tab. IX.3: Daten aus den untersuchten Betrieben über Kontakt der Tiere und Krankheitssymptome. Legende siehe IX.2.1.....	143
Tab. IX.4: Klinische Untersuchung von sechs Schafen vor und 24 h nach der Impfung mit BLUEVAC-8, Nr. 53,56, 61 wurden i.v., Nr. 51, 57, 62 i.m. geimpft .....	143

## 4. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. II.1: Ausbrüche der Blauzungenkrankheit bei allen betroffenen Spezies in Deutschland (Conraths et al. 2009) .....	6
Abb. III.1: Standorte der 22 Betriebe in Bayern .....	19
Abb. III.2: Zeitpunkte der Impfungen und Probennahmen zur Impfwirksamkeitskontrolle bei Rind und Schaf in ausgewählten Betrieben 2008 .....	48
Abb. III.3: Zeitpunkte der Impfung und der Entnahme von Blut zur Bestimmung der Ak-Titer bei insgesamt 75 Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 .....	57
Abb. IV.1: Mediane der ELISA-Serum-Ak-Titer von Rindern nach der Impfung gegen BTV-8 .....	62
Abb. IV.2: Mediane der ELISA-Serum-Ak-Titer von Schafen zu bestimmten Zeitpunkten nach der Impfung gegen BTV-8 .....	63
Abb. IV.3: Mediane der ELISA-Ak-Titer von Rinderseren nach der Impfung 2008 und 2009 .....	64
Abb. IV.4: Medianer Antikörpertiter von 20 Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 nach der Grundimmunisierung 2008 und der Impfung 2009. ....	66
Abb. IV.5: SNT Titer von Seren von sieben Rindern aus dem Betrieb Nr. 8 und deren Median (Med) .....	69
Abb. IV.6: ELISA-Serum-Ak-Titer der Rinderseren nach den Impfungen 2008 und 2009, die auch im SNT untersucht wurden.....	70
Abb. IV.7: Signifikanz der Unterschiede zwischen den SNT-Ak-Titern vier Wochen nach der Impfung 2009 bei fünf Betrieben .....	71
Abb. IV.8: SNT-Ak-Titer von zehn Schafen nach zwei Impfungen gegen BTV-872	
Abb. IV.9: Positivkontrolle: IFN- $\gamma$ spezifische Spots nach der ConA Stimulation der PBMC eines Rindes .....	73

Abb. IV.10: IFN- $\gamma$ spezifische Spitzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation von PBMC von vier Rindern aus dem Betrieb Nr. 3 zwei und vier Wochen sowie fünfeinhalb Monate nach dem Boost gegen BTV- 8.....	74
Abb. IV.11: IFN- $\gamma$ spezifische Spitzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation von PBMC von vier Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 zwei und vier Wochen nach der Impfung gegen BTV-8.....	75
Abb. IV.12: IFN- $\gamma$ spezifische Spitzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation von PBMC von zehn Schafen aus dem Betrieb Nr. 21 fünf Wochen nach der Impfung gegen BTV-8. ....	76
Abb. IV.13: Korrigierte Optische Dichte (OD corr) von Seren von 20 i.m. geimpften Schafen nach der Impfung. ....	78
Abb. IV.14: Korrigierte Optische Dichte von Seren von 58 s.c. geimpften Schafen nach der Impfung. ....	79
Abb. IV.15: ELISA-Antikörpertiter von sechs Rindern aus dem Betrieb Nr. 21 nach zwei Impfungen gegen BTV-8. ....	80
Abb. IV.16: SNT-Antikörpertiter von sechs Rindern aus dem Betrieb Nr. 21 nach zwei Impfungen gegen BTV-8. ....	81
Abb. IV.17: IFN- $\gamma$ spezifische Spitzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation von PBMC von acht Rindern drei und fünf Wochen nach der dritten Impfung gegen BTV-8. ....	82
Abb. IV.18: ELISA-Serum-Ak-Titer von 28 Schafen nach vier Impfungen. ....	83
Abb. IV.19: ELISA-Serum-Ak-Titer von 10 Schafen nach vier Impfungen gegen BTV-8. ....	85
Abb. IV.20: SNT-Ak-Titer von 10 Schafen nach vier Impfungen gegen BTV-8. ....	86



- 
- Abb. IV.21: IFN- $\gamma$  spezifische Spitzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation der PBMC von zwei Schafen nach Einsatz unterschiedlicher Blockingpuffer..... 88
- Abb. IV.22: IFN- $\gamma$  spezifische Spitzahlen nach Restimulation der PBMC von drei Schafen mit BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) eine Woche nach der dritten Impfung. .... 90
- Abb. IV.23: IFN- $\gamma$  spezifische Spitzahlen nach Restimulation der PBMC mit BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) von vier Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 vier Wochen nach dem Nachweis von BTV-Genom und der Impfung gegen BTV-8.... 95
- Abb. IV.24: IFN- $\gamma$  spezifische Spitzahlen nach BTV-8 und BTV-1 (MOI~1) Restimulation der PBMC von drei Rindern aus dem Betrieb Nr. 22 drei Wochen nach der dritten Impfung gegen BTV-8..... 97

## **X. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Als Erstes sind die Leiter der Betriebe und ihre Familien zu nennen, die sich Zeit genommen und uns erlaubt haben, ihre Tiere zu beproben: Ohne Blut keine Doktorarbeit! Wir haben uns immer sehr willkommen gefühlt und wurden reich mit Anekdoten und Selbstgemachtem versorgt.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel danke ich dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit.

Herrn Prof. Dr. Klee gebührt Dank für seine Funktion als Doktorvater.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Büttner für die bereichernde Zusammenarbeit.

Ganz besonders danke ich Dr. Nicole Gollnick für die große Unterstützung in jeglicher Hinsicht, für die konstruktive Kritik und Motivation.

Ich danke Dr. Antonie Neubauer-Juric für die geduldige Beantwortung sämtlicher kleiner und großer Fragen vor Ort im Labor.

Ich danke Carola Sauter-Louis für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Dank gebührt den vielen Helfern bei den Beprobungsaktionen, vor allem Axel und Hilke.

Ein außerordentlicher Dank geht an die Besetzung der Veterinärvirologie des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, allen voran Patricia Greißinger für Beistand, Geduld, die Aufrechterhaltung der guten Laune und für die Lakritzbonbons. Des Weiteren danke ich Birgit von Kölln-Braun, Verena Rupp, Anita Effenberger, Manuela Nienhaus und besonders Isa Stöhr und Sandra Müller für die PCR; und last but not least Heike Lang für die Unterstützung beim ELISPOT.

Meinen Freunden danke ich für die großen und kleinen Hilfen, die seelische und moralische Unterstützung, die Ablenkung und das Zuhören, allen voran Michael S. für den Kampf gegen den Teufel Formatierung, sowie Uli, Jule S., meinen Mitbewohnern Sim, Livi und Ben; außerdem Jule F. für diesen wundervoll kuscheligen Bademantel, in dem ich den größten Teil dieser Seiten zu Papier brachte...

Ich danke meinen Eltern für Alles.

Der wärmste Dank geht an die zwei übrigen Musketiere, Gundi und Birgit (Einer für alle, alle für einen!). Ohne Euch wär es viel schwerer gewesen und hätte nicht halb soviel Spaß gemacht. Es war eine schöne Zeit!

