

Aus dem Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen
Aus dem Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. G. Sutter
Angefertigt unter der Anleitung von Dr. G. Wolf

Untersuchungen zum Vorkommen von Pestiviren beim kleinen Wiederkäuer und Border Disease Virus beim Rind in Bayern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Gundula Egger
aus
Bayreuth

München 2010

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1	Eigenschaften der Pestiviren	2
2.2	Bovine Virus Diarrhoe/ Mucosal Disease und Border Disease: Klinische Verlaufsformen	6
2.2.1	Intrauterine Infektion	6
2.2.2	Postnatale Infektion immunkompetenter Tiere	8
2.3	BVDV-Infektionen bei kleinen Wiederkäuern	10
2.4	Border Disease beim Rind	11
2.5	Seroepidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von Pestiviren bei kleinen Wiederkäuern	12
3.	Material und Methoden	15
3.1	Rekrutierung der Betriebe	15
3.2	Beschreibung der Betriebe	16
3.2.1	Betriebsstrukturen	16
3.2.2	Verteilung der Betriebe in Bayern	18
3.3	Erhebung relevanter Betriebsdaten anhand eines Fragebogens	20
3.3.1	Betriebsformen der untersuchten Bestände	21
3.3.2	Nutzungsart	21
3.3.3	Kontakt der Wiederkäuer untereinander	23
3.3.3.1	Direkte Tierkontakte innerhalb eines Mischbetriebes	23
3.3.3.2	Indirekte Kontakte über Personen, Geräte und alternativ genutzte Flächen	24
3.3.3.3	Kontakt zu nicht betriebseigenen Wiederkäuern	25

3.3.4	Zukäufe	26
3.3.5	BVDV-/ BDV-Vorbericht	26
3.3.6	Symptome, die für eine BVDV- oder BDV-Infektion sprechen	29
3.3.6.1	Tierverluste	29
3.3.6.2	Läsionen an den sichtbaren Schleimhäuten	30
3.3.6.3	Durchfall	31
3.3.6.4	Hairy Shaker– ähnliche Symptome	32
3.3.6.5	Umrindern/ Umbocken	32
3.3.6.6	Abort	33
3.3.6.7	Früh-/ Totgeburt	34
3.3.6.8	Geburt lebensschwacher Jungtiere	35
3.3.6.9	Missbildungen	35
3.3.7	Impfung	36
3.4	Probenmaterial	37
3.4.1	Anzahl der Proben pro Betrieb	37
3.4.2	Blutentnahme	37
3.4.3	Behandlung und Asservierung der Blutproben	38
3.5	Laboruntersuchungen	38
3.5.1	Indirekter BVDV-Ab-ELISA	39
3.5.2	Indirekter BDV-Ab-ELISA	40
3.5.3	<i>Blocking</i> -ELISA zum Nachweis von Pestivirus-NS3-Antikörpern	40
3.5.4	PCR	42
3.5.5	Pestivirus-NS3-Antigennachweis mittels FACS-Analyse	43
3.5.6	Zellkultur	44
3.5.7	Serumneutralisationstest (SNT)	44

4	Ergebnisse.....	46
4.1	Virusnachweise.....	46
4.1.1	Typisierung von Pestiviren aus bayerischen Rindern mittels <i>real time</i> RT-PCR-Sonden	46
4.1.2	Übersicht über die Verteilung der BVDV-Genotypen 1 und 2 in Bayern	48
4.1.3	Ausschluss von Pestiviren bei kleinen Wiederkäuern in Verdachtsbetrieben mittels PCR	51
4.1.4	Nachweis persistent infizierter Rinder in Verdachtsbetrieben mittels Leukozyten-Immunfluoreszenz	51
4.2	Nachweis von Pestivirus-Antikörpern bei kleinen Wiederkäuern	52
4.2.1	Ergebnisse zur Beurteilung der Eignung der ELISAs für Blute von kleinen Wiederkäuern	52
4.2.1.1	Indirekter ELISA.....	52
4.2.1.2	<i>Blocking</i> -ELISA.....	54
4.2.1.3	Serumneutralisationstest	57
4.2.2	Vergleich der drei Testprinzipien, die für Antikörernachweise in Seren kleiner Wiederkäuer verwendet wurden	58
4.3	BVDV-Status der Rinder in Mischbetrieben mit kleinen Wiederkäuern.....	60
4.4	Vorkommen von Pestivirusinfektionen bei kleinen Wiederkäuern.....	63
4.4.1	Festlegung des Pestivirus-Status der kleinen Wiederkäuer.....	63
4.4.2	Differenzierung der positiven Seren kleiner Wiederkäuer mittels SNT	64
4.4.3	Vorkommenshäufigkeit von Border Disease	68
4.4.4	BVDV-Infektionen bei kleinen Wiederkäuern in Abhängigkeit des BVDV-Status der Rinder im Kontaktbereich.....	69
4.4.4.1	Mischbetriebe mit aktueller BVDV-Infektion	69
4.4.4.2	Mischbetriebe mit Altserologie	73
4.4.4.3	Mischbetriebe mit unbekanntem BVDV-Status.....	75

4.4.5	Regionale Verteilung der seropositiven kleinen Wiederkäuer.....	76
4.4.6	Auswertung der per Fragebogen erfassten Daten und Bezug zu den Laborergebnissen.....	78
4.4.6.1	Tierkontakte und Krankheitssymptome der kleinen Wiederkäuer	78
4.4.6.2	Nutzungsarten, Tierkontakte und Krankheitssymptome der Rinder.....	79
5	Diskussion	80
5.1	Bewertung der verwendeten ELISAs als screening Teste für Pestivirusantikörper bei kleinen Wiederkäuern	80
5.2	Bewertung der SNT-Ergebnisse.....	82
5.3	Statistische Betrachtung zu den Neutralisationstesten.....	84
5.4	Betrachtungen zu Pestivirus-Antikörper-Prävalenzen	87
5.5	Bewertung der per Fragebogen erfassten klinischen Daten.....	88
5.6	Bewertung der Ergebnisse der Genotypisierung von Rinderisolaten bezüglich der Pestivirusübertragung von kleinen Wiederkäuern	89
5.7	Schlussbemerkung	90
6	Zusammenfassung	91
7	Summary	92
8	Anhang	93
8.1	Materialliste	93
8.1.1	Geräte und Laborhilfsmittel.....	93
8.1.2	Kommerzielle Kits	95
8.1.3	Chemikalien, Puffer und Lösungen	95
8.1.4	Zellen.....	96
9	Abkürzungsverzeichnis	97
10	Literaturverzeichnis.....	99
11	Danksagungen.....	105
12	Fragebogen für Landwirte	106

ABBILDUNG 1: ORGANISATION DES PESTIVIRUSGENOMS.....	3
ABBILDUNG 2: PHYLOGENETISCHER BAUM DER PESTIVIREN,	4
ABBILDUNG 3: HERDENGROÙE SCHAFE DER BEPROBTEN BETRIEBE	16
ABBILDUNG 4: HERDENGROÙE ZIEGEN DER BEPROBTEN BETRIEBE	17
ABBILDUNG 5: BAYERNWEITE VERTEILUNG DER UNTERSUCHTEN BETRIEBE MIT KLEINEN WIEDERKÄUERN ...	18
ABBILDUNG 6: ÜBERSICHT ÜBER DIE HERKUNFT DER RINDERISOLATE FÜR DIE GENOTYPISIERUNG	19
ABBILDUNG 7: ÜBERSICHT ÜBER ERGEBNISSE DER GENOTYPISIERUNG DER RINDERISOLATE.....	49
ABBILDUNG 8: INDIREKTER ELISA (SVANOVIR BDV-AB-ELISA)	53
ABBILDUNG 9: INDIREKTER ELISA (SVANOVIR BDV-AB-ELISA)	54
ABBILDUNG 10: PRIOCHECK BVDV-AB-ELISA	55
ABBILDUNG 11: PRIOCHECK BVDV-AB-ELISA	55
ABBILDUNG 12: ÜBERSICHT ÜBER ALLE SNT-ERGEBNISSE (SCHAFSEREN),	57
ABBILDUNG 13: ABBILDUNG ALLER SCHAFSEREN, DIE IN MINDESTENS EINEM TEST POSITIV REAGIERTEN	58
ABBILDUNG 14: SVANOVIR BVDV-AB-ELISA ODCORR-WERTE ALLER RINDERSEREN (N=455)	61
ABBILDUNG 15: EINTEILUNG DER MISCHBETRIEBE MIT RINDERN IN SECHS KLASSEN.....	62
ABBILDUNG 16: ÜBERSICHT ÜBER DIE BVDV-1-WILMA-SNT-TITERANSTIEGE	71
ABBILDUNG 17: ÜBERSICHT ÜBER DIE BVDV-1-WILMA-SNT-TITERANSTIEGE	71
ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER SNT-TITER DER SEROPOSITIVEN SCHAFE DES BETRIEBES 76.....	72
ABBILDUNG 19: VERGLEICH DER SNT-TITER DER ZIEGEN AUS BETRIEB 75.....	75
ABBILDUNG 20: VERGLEICH DER SNT-TITER DER SEROPOSITIVEN SCHAFE DES BETRIEBES 36.....	75
ABBILDUNG 21: ÜBERSICHT ÜBER DIE BAYERNWEITE VERTEILUNG DER BETRIEBE	77
ABBILDUNG 22: HÄUFIGKEITSDICHTE DER SNT-TITER	85

1. EINLEITUNG

Ruminante Pestiviren sind weltweit in Rinder-, Schaf- und Ziegenpopulationen verbreitet und besitzen große wirtschaftliche Bedeutung. Über das Vorkommen des Bovinen Virusdiarrhoe Virus-1 und -2 (BVDV) beim Rind gibt es umfangreiche Daten aufgrund systematischer Untersuchungen und staatlicher Überwachung. Dagegen ist über das Vorkommen des Border Disease Virus (BDV) und des BVDV bei kleinen Wiederkäuern in Deutschland relativ wenig bekannt.

Ab Januar 2011 wird in Deutschland die BVDV-Untersuchung aller Rinder und die Merzung persistent infizierter Tiere verpflichtend. Das Ziel ist die landesweite Tilgung von BVDV. Das bei Rindern hauptsächlich vorkommende BVDV ist allerdings ebenso wie das Border Disease Virus (BDV) der kleinen Wiederkäuer nicht streng wirtsspezifisch. Unter natürlichen Bedingungen scheint die Interspeziesübertragung vom Rind auf das Schaf besonders ausgeprägt zu sein. Daneben existieren Berichte über BDV-Infektionen bei Rindern, die sich durch Kontakt zu virämischen Schafen infizierten. In Anbetracht dieser Tatsachen stellt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß Schafe und Ziegen als Virusreservoir für bovine Pestiviren dienen. Bei der BVDV-Tilgung könnte der kleine Wiederkäuer vor allem in Betrieben eine wichtige Rolle spielen, in denen Rinder und Schafe oder Ziegen gemeinsam gehalten oder geweidet werden. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle des kleinen Wiederkäuers bei der Verbreitung von BVDV in Bayern zu bewerten. Dazu wurden Tiere aus Mischbetrieben untersucht, die neben Rindern kleine Wiederkäuer halten. Ein weiteres Interesse bestand an der Untersuchung der Prävalenz von BDV, dazu wurden Schaf- und Ziegenbetriebe in ganz Bayern untersucht. Außerdem wurden aus Diagnostikeinsendungen stammende bovine Pestivirusisolale genotypisiert, um festzustellen, wie häufig BDV bei Rindern vorkommt.

Für Rinderproben wurde ein indirekter BVDV-Antikörper ELISA zur Bestimmung des Herdenstatus mittels Stichproben verwendet, virologisch wurden FACS- und PCR-Untersuchungen durchgeführt. Bei den Blutproben kleiner Wiederkäuer kamen eine Pestivirus-PCR, zwei ELISAs und Serumneutralisationsteste (SNT) gegen BVDV-1, -2 und BDV zum Einsatz. Ferner wurden die bei Schaf- und Ziegenserien verwendeten Antikörper-ELISAs mittels dreier SNTs evaluiert.

2. LITERATURÜBERSICHT

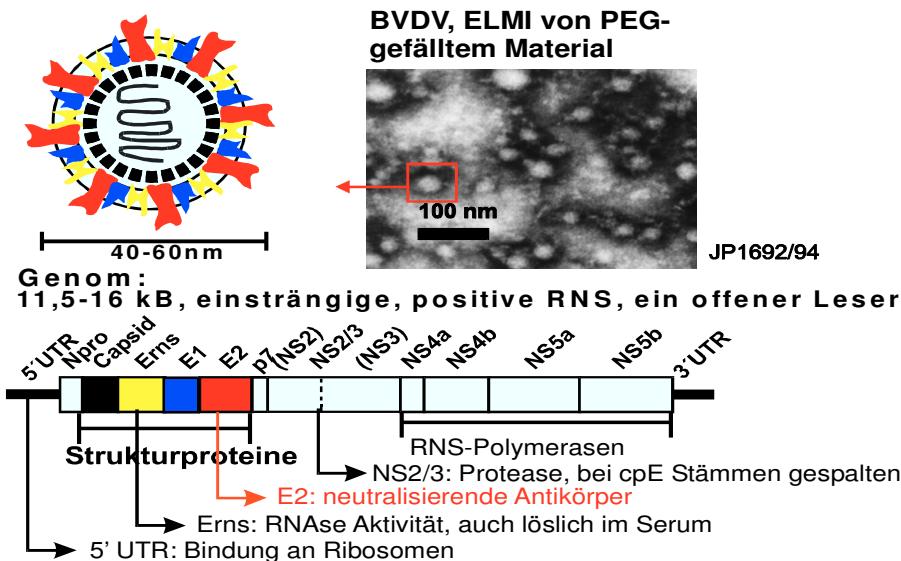
2.1 EIGENSCHAFTEN DER PESTIVIREN

Pestiviren sind mit einer Größe von 40-60 nm relativ kleine, behüllte RNA-Viren (Gray and Nettleton, 1987) von pleomorpher Gestalt. Die Virionen bestehen aus einem einzelsträngigen, positiv polarisierten RNA-Genom, welches von einer 5-7 Mikrometer dicken lipidhaltigen Hülle umgeben ist. Die Hülle besteht neben einer Lipidmembran aus den drei Glykoproteinen E^{rns}, E1 und E2 (Donis, 1995; Thiel et al., 1991). Das Glykoprotein E2 spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung des Virus an Zellrezeptoren bzw. beim Eintritt in die Wirtszelle (Hulst and Moormann, 1997), es induziert die Bildung neutralisierender Antikörper (Donis, 1995). E^{rns} und E1 besitzen keine bzw. nur eine geringe immunisierende Wirkung (Bolin, 1993). Das Hüllprotein E^{rns} wirkt als Ribonuklease (Iqbal et al., 2004). Eine Besonderheit des E^{rns}-Proteins gegenüber den anderen Hüllproteinen besteht darin, dass es in infizierten Zellen ungebunden im Zytoplasma vorkommt und auch sezerniert wird.

Das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) wird ebenso wie das Border Disease Virus (BDV) und das Schweinepestvirus (CSFV) dem Genus Pestiviren zugeordnet. Gemeinsam mit den Hepaci- und den Flavivirinae, denen tier- und humanmedizinisch bedeutende Viren wie das Louping ill-, FSME- oder das Gelbfiebervirus angehören, bilden sie die Familie der Flaviviridae. Die Gruppe der Pestiviren umfasst laut *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* als Hauptvertreter BVDV-1, -2, BDV und CSFV. Daneben wurden andere Genotypen wie z.B. „Giraffe“, „Antilope“ und „Bungowannah“ aufgrund von Nukleinsäure-Sequenz-Daten beschrieben (Kirkland et al., 2007).

Das einsträngige Genom hat eine Länge von durchschnittlich 12,3 kB und besitzt einen offenen Leserahmen (ORF), der jeweils von einer 5' UTR bzw. 3' UTR flankiert wird. (Collett et al., 1988; Collett et al., 1991). Der offene Leserahmen beginnt mit dem Autoproteasegen N^{pro}, gefolgt von den Genen, die für die Strukturproteine C (Kapsidprotein), E^{rns} (Envelope, Ribonuclease Soluble), E1 und E2 kodieren. Dem schließen sich die Abschnitte für die Kodierung der Nicht-Strukturproteine p7, NS2/3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b an (Collett et al., 1988). Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Pestivirusgenoms

Abbildung 1: Organisation des Pestivirusgenoms

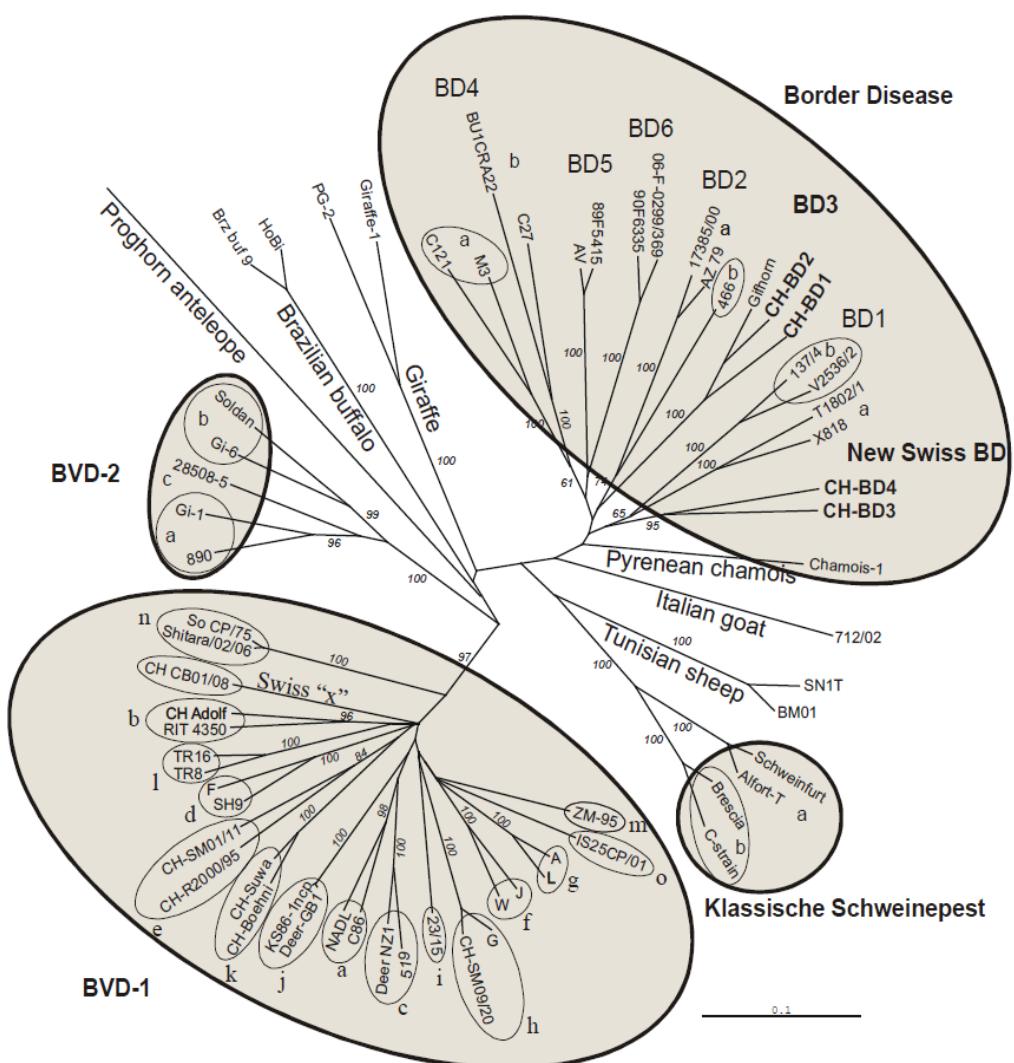


Die Typisierung von Isolaten erfolgt anhand von Sequenzanalysen bestimmter Regionen des Genoms. Bevorzugte Genomabschnitte sind hierfür die 5' UTR und N^{pro} (Hofmann et al., 1994; Ridpath and Bolin, 1998; Vilcek et al., 1994). Beim BVD-Virus existieren zwei Genotypen, ferner sind 12 Subgenotypen für BVDV-1 (Vilcek et al., 2005) bzw. 2 für Genotyp 2 beschrieben worden (Flores et al., 2002). Die Unterscheidung der beim Rind vorkommenden Genotypen 1 und 2 des BVD-Virus erfolgt anhand der hoch konservierten 5' UTR (Fulton et al., 2005; Ridpath et al., 1994). In Nordamerika wurden schwere Krankheitsverläufe mit hochgradiger Thrombozytopenie beschrieben, bei denen der Genotyp 2 nachgewiesen wurde (Corapi et al., 1990; Rebhun et al., 1989). Die Symptome dieses als „Hämmorrhagisches Syndrom“ bezeichneten Krankheitsbildes wurden vor allem den Genotyp 2-Stämmen zugeordnet (Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 2000). Allerdings wurde diese Meinung später revidiert, da kein Zusammenhang zwischen der hämmorrhagischen Verlaufsform und dem Genotyp festgestellt werden konnte (Carman et al., 1998).

In einigen Ländern wurden BVDV-Isolate genotypisiert, um die Verbreitung der Genotypen 1 und 2 zu erforschen. In Deutschland und Japan dominierte der Genotyp 1 mit 89% bzw. 84%, allerdings war die Anzahl der Isolate mit 96 (Deutschland) bzw. 31 (Japan) relativ gering (Wolfmeyer et al., 1997; Yamamoto et al., 2008). In den USA wurden 53 Isolate aus 16 Staaten genotypisiert, hier war der Anteil von BVDV-2 mit 40% erstaunlich hoch (Tajima and Dubovi, 2005).

In der Gruppe der Border Disease Viren werden meistens sechs Genotypen genannt (Dubois et al., 2008), allerdings werden auch hier neue Sub- bzw. Genotypen beschrieben (Stalder et al., 2005). Generell gilt für die Genotypen der Border Disease Viren, dass sie im Genom größere Abweichungen voneinander aufweisen als andere Pestiviren (Becher et al., 1995; Liu et al., 2009). Sukzessive werden neue Typen charakterisiert, ein Beispiel hierfür ist der Stamm „Gifhorn“, der BDV 3 zugeordnet wurde. Becher stellte fest, dass sich dieser Stamm sowohl genetisch als auch antigenetisch von allen anderen bekannten Pestiviren inklusive der BDV unterscheidet (Becher et al., 2003). In Abbildung 2 wurden die phylogenetischen Cluster der Pestivirusstämme auf Basis der N^{pro}-kodierenden Sequenzen dargestellt, hieraus ist ersichtlich, dass Stamm „Gifhorn“ inzwischen weiteren BDV-Stämmen zugeordnet wird (Stalder, 2008).

Abbildung 2: Phylogenetischer Baum der Pestiviren,
basierend auf der N^{pro}-kodierenden Sequenz (Stalder, 2008)



Zellkultur zur Lyse ihrer Wirtszellen (Gillespie et al., 1960), nichtzytopathogene Biotypen (ncp) lösen dagegen in der Zellkultur keine morphologischen Veränderungen aus. Der molekularbiologische Unterschied der beiden Biotypen liegt im NS2/3-Gen: Nach Kümmerer ist die proteolytische Spaltung dieses Gens in NS2 und NS3 der entscheidende Unterschied zwischen dem zytopathogenen und nichtzytopathogenen Biotyp (Kümmerer et al., 2000b). In vielen Fällen sind Ribonukleinsäure-Rekombinationen oder Punktmutationen im NS2-Gen (Kümmerer and Meyers, 2000a) verantwortlich für die Zytopathogenität, auch existieren Berichte über das Vorkommen von zusätzlichen Ubiquitinsequenzen im cp-Gen (Meyers et al., 1991).

Beide Biotypen sind maßgeblich an der Pathogenese der Mucosal Disease beteiligt. Der Fötus wird transplazental mit dem ncp-Virus innerhalb des ersten Drittels der Trächtigkeit infiziert (McClurkin et al., 1984; Nettleton, 1987). Diese Föten bilden eine Immuntoleranz gegenüber dem Pestivirus aus und werden als persistent infizierte Jungtiere geboren. Die Immuntoleranz bleibt ebenso wie die Virusausscheidung ein Leben lang erhalten. Wird dieses persistent infizierte Tier mit einem antigenetisch sehr ähnlichen cp-Virus „superinfiziert“ oder mutiert das körpereigene nichtzytopathogene Virus zu zytopathogen, erkrankt das Tier an der stets tödlich verlaufenden Mucosal Disease (Brownlie, 1990; Tautz et al., 1998).

2.2 BOVINE VIRUS DIARRHOE/ MUCOSAL DISEASE UND BORDER DISEASE: KLINISCHE VERLAUFSFORMEN

Erste Beschreibungen der Bovinen Virusdiarrhoe stammen aus dem Jahr 1946 von Olafson, der über Diarrhoeerkrankungen in Verbindung mit gastrointestinalen Erosionen, hohem Fieber und Leukopenie in den USA berichtete. Seit 1959 ist die weltweit vorkommende Erkrankung auch in Deutschland bekannt (Schulz, 1959; Voss, 1960). Das klinische Bild des Krankheitskomplexes BVD/MD beim Rind ist vielfältig und reicht von subklinischen Verläufen bis hin zu Todesfällen durch MD. Generell muss zwischen der intrauterinen und der postnatalen, transienten Infektion unterschieden werden.

Bei Border Disease (BD) handelt es sich um eine weltweit vorkommende Viruserkrankung der Schafe und Ziegen, die v.a. in Gebieten mit intensiver Tierhaltung hohe wirtschaftliche Bedeutung besitzt. Die Erkrankung wurde nach der Region ihrer Erstbeschreibung benannt, der Grenzregion zwischen England und Wales (Hughes, 1959). Diese in Deutschland relativ unbekannte Krankheit ist bei Ziegen selten, wurde aber auch bei Wildwiederkäuern nachgewiesen (Kleinschmidt, 2003). Bei BD existieren ebenso wie bei BVD/MD zwei Übertragungswege, die intrauterine Infektion und die Kontaktinfektion.

2.2.1 INTRAUTERINE INFektION

Die Infektion seronegativer, gravider Tiere hat je nach Trächtigkeitsstadium unterschiedliche Auswirkungen auf den Fötus, während die Mutter meist symptomlos bleibt und eine spezifische Immunität ausbildet. Das Auftreten unterschiedlicher klinischer Symptome ist abhängig vom Trächtigkeitsstadium zum Zeitpunkt der Infektion. Im Anfangsstadium der Trächtigkeit ist die Zygote durch die Zona pellucida geschützt und so weitgehend unempfänglich für Pestiviren (Tsuboi and Imada, 1996), erst nach dem Schlupf um den 7. Tag können intrauterine Infektionen stattfinden. Als Folge einer Pestivirusinfektion in einem relativ frühen Graviditätsstadium kann es zum Absterben des Embryos bzw. Fetus und der vollständigen Resorption bzw. Abort (Carlsson et al., 1989; McGowan and Kirkland, 1995)

kommen. Von einigen Autoren wurde festgestellt, dass die direkte Schädigung der embryonalen Zellen die Ursache für den Fruchttod ist (Brownlie et al., 1998; Grooms, 2004), allerdings wurden keine pathogenetischen Unterschiede erläutert, die zur Entstehung immuntoleranter Tiere führen. Der Fruchttod findet nach Grooms ca. 10-27 Tage post infectionem statt (Grooms, 2004), die abgestorbene Frucht wird erst nach Wochen bis Monaten ausgestoßen (Baker, 1995; Thierauf, 1993). Ein Teil der abgestorbenen Feten mumifiziert und verbleibt weiterhin im Uterus. Für die Aufrechterhaltung der Infektionskette sind die intrauterinen Infektionen vor Reifung des spezifischen Immunsystems von entscheidender Bedeutung, in diesem Stadium kann das Virus nicht als Antigen erkannt werden. Das Virus infiziert fetales Gewebe persistent ohne dabei eine vitale Beeinträchtigung hervorzurufen. Bei der späteren Reifung des spezifischen Immunsystems werden virale Strukturen als körpereigen angenommen, sie führen zur Ausbildung einer spezifischen Immuntoleranz. So werden persistent infizierte Kälber bzw. Lämmer geboren, die mit sämtlichen Se- und Exkreten das Virus lebenslang ausscheiden (Houe, 1995; Nettleton et al., 1998). Die Toleranz beschränkt sich allerdings auf den Virusstamm, der der Infektion zugrunde lag; gegen antigenetisch unterschiedliche Stämme kann eine spezifische Immunität gebildet werden. Persistent infizierte Jungtiere werden häufig klinisch gesund geboren und können so über lange unbemerkt in der Population verbleiben. Ein Teil der Virämiker kommt allerdings als relativ kleine, kümmernde Neonaten zur Welt und entwickelt nach der Geburt aufgrund von Sekundärinfektionen u.a. Diarrhoe und respiratorische Symptome (Stokstad and Loken, 2002). Nachkommen, die aus virämischen Tieren gezogen werden, sind ebenfalls lebenslang persistent infiziert.

Im Laufe ihres Lebens besteht bei persistent infizierten Rindern immer die Gefahr der oben beschriebenen Virusmutation oder Superinfektion, so dass sie an der stets tödlich verlaufenden Mucosal Disease erkranken. Leitsymptome der MD sind Erosionen der Schleimhaut des Intestinaltraktes verbunden mit starken, teils blutigen Durchfällen, allgemeiner Schwäche, Fieber, Anorexie und Dehydratation. Die Veränderungen an den sichtbaren Schleimhäuten sind v.a. an den Maulschleimhäuten ausgeprägt, besonders betroffene Stellen sind der Gaumen, Bereiche um die Schneidezähne, Zunge und bukkale Schleimhaut (Baker, 1995). Die Haut im Zwischenklauenspalt ist ebenfalls betroffen, die ulzerierenden Läsionen führen zu mehr oder weniger starken Lahmheiten.

Bei Schafen und Ziegen sind ebenfalls MD-ähnliche Symptome wie Erosionen und Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt bei persistent infizierten Tieren beschrieben worden (Barlow et al., 1983), Nettleton et al. bezeichneten dieses Symptom als „Late-onset-Disease“ (Loken, 1987; Nettleton et al., 1998).

Die Symptomatik der neugeborenen Kälber bzw. Lämmer, die etwa in der Mitte der Gravidität infiziert werden, ist abhängig vom Grad der Schädigung der betroffenen Organe. Störungen der in diesem Zeitraum stattfindenden Organentwicklung sind vor allem an Augen und Zentralem Nervensystem zu verzeichnen. So sind Fälle von Hydranenzephalie, Hydrozephalus, Mikroenzephalie, Kleinhirnhypoplasie, Hypomyelogenese, Mikrophthalmie, Retinaatrophie und Hypoplasie des Nervus opticus beschrieben (Baker, 1995; Done et al., 1980; Hewicker-Trautwein et al., 1995; Sawyer, 1992). Ein Teil der Neugeborenen zeigt Missbildungen wie Skelettdeformationen (Brachygnathie, Mikromelie), Thymusatrophie oder mangelhafte Behaarung (Baker, 1995; Grooms, 2004). Bei Lämmern ist das Vorkommen von sogenannten *Hairy Shaker*-Lämmern charakteristisch für Border Disease. *Hairy Shaker* besitzen ein außergewöhnlich langes, haariges Vlies und zeigen unterschiedlich starken Tremor. Dieses Zittern kann sich in leichten Fällen nur an Kopf und Ohren zeigen, in schweren Fällen ist der ganze Körper betroffen. Viele dieser betroffenen Lämmer verenden innerhalb der ersten Lebenstage oder während der Säugeperiode (Nettleton, 1987).

Findet die Infektion im letzten Dritt der Trächtigkeit statt, ist sowohl die Organentwicklung als auch die Ausbildung des Immunsystems abgeschlossen. Infektionen im letzten Trimenon führen deshalb beim ungeborenen Jungtier zur Ausbildung einer spezifischen Immunität: Diese Kälber und Lämmer kommen meistens gesund zur Welt, besitzen allerdings präkolostrale, neutralisierende Antikörper.

2.2.2 POSTNATALE INFektION IMMUNKOMPETENTER TIERE

Postnatale BVDV- bzw. BDV-Infektionen erfolgen meist auf dem oronasalen Weg durch den Kontakt mit persistent infizierten Tieren, die als ständige Virusausscheider das wichtigste Virusreservoir im Bestand bilden (Houe, 1995; Ridpath et al., 2006). Die Ausbildung klinischer Symptome bei der Infektion immunkompetenter Tiere ist im Wesentlichen abhängig vom Immunstatus des Tieres und der Virulenz des Virusstammes. Meistens verläuft die Infektion unbemerkt ohne jegliche Symptomatik (Baker, 1995; Nettleton et al., 1998). Einige Autoren berichten bei Rindern über schwerwiegende, akut verlaufende Erkrankungen mit wässriger Diarrhoe, Agalaktie, Fieber, respiratorischen Symptomen, Anorexie und Todesfällen (Baker, 1995; Carman et al., 1998; Nettleton et al., 1998; Rebhun

et al., 1989). Die genannten Berichte über akute Infektionen beschreiben außerdem MD-ähnliche Veränderungen in Form von Ulzerationen an den Kopfschleimhäuten bzw. im ganzen Verdauungstrakt. Weiterhin konnten in Zusammenhang mit der akut verlaufenden Form hämatologische Veränderungen in Form von Thrombozyto- und Leukopenie nachgewiesen werden. Die daraus resultierenden klinischen Symptome werden als Hämorrhagisches Syndrom bezeichnet. Betroffene Tiere zeigen infolge einer ausgeprägten Thrombozytopenie generalisierte erhöhte Blutungsneigung, Ekchymosen sowie petechiale Blutungen an den Schleimhäuten (Corapi et al., 1990; Liebler et al., 1995; Rebhun et al., 1989). Meist sind hiervon Neugeborene oder Jungtiere betroffen, bei adulten Wiederkäuern tritt dieses Syndrom seltener auf.

2.3 BVDV-INFEKTIONEN BEI KLEINEN WIEDERKÄUERN

Ruminante Pestiviren sind sowohl in der Wild- als auch in der Hauswiederkäuerpopulation weit verbreitet; das Wirtsspektrum umfasst einen Großteil der Artiodactyla. So sind neben Rind, Schaf und Ziege auch Reh, Rotwild, Gämse, Bison, Lama, Alpaka, Giraffe, Antilope BVDV-1 und Gabelbock für BVDV bzw. BDV empfänglich (Depner et al., 1991b; Doyle and Heuschele, 1983; Sausker and Dyer, 2002; Vilcek and Nettleton, 2006).

Pestiviren sind nicht streng wirtsspezifisch und können somit die Speziesbarriere überwinden. Als Ursache wurden von Paton Änderungen des Glykoproteins E2 postuliert, da er bei Untersuchungen von Isolaten aus unterschiedlichen Wirten Unterschiede in diesem Bereich feststellte (Paton et al., 1997). Im Regelfall kommt BVDV bei Rindern, BDV bei Schafen und Ziegen und CSFV bei Schweinen vor. BVDV-Infektionen können auch bei Schafen und Ziegen auftreten (Carlsson, 1991; Mishra et al., 2007; Paton et al., 1995), ebenso existieren Hinweise auf BDV-Infektionen beim Rind (Strong et al., 2010). Weiterhin sind schon lange Infektionen mit BVDV bzw. BDV bei Schweinen bekannt (Carbrey et al., 1976; Loeffen et al., 2009). Das einzige Pestivirus, bei dem bislang keine speziesübergreifenden Infektionen nachgewiesen wurden, ist CSFV, der Erreger der klassischen Schweinepest.

Es wurden bislang natürliche und experimentell übertragene BVDV-Infektionen sowohl bei Schafen als auch bei Ziegen nachgewiesen (Carlsson, 1991; Depner et al., 1991a; Mishra et al., 2008). Serologische Untersuchungen über Kreuzneutralisationsteste führten zu dem Schluss, dass beide Genotypen des BVDV bei kleinen Wiederkäuern vorkommen, wenngleich BVDV-1 häufiger vertreten ist als BVDV-2 (Krametter-Frotscher et al., 2007b; Mishra et al., 2009). BVDV-Infektionen führen bei Schafen und Ziegen zu ähnlichen Symptomen wie bei Rindern, wenngleich die Symptome normalerweise milder verlaufen. Ein Großteil der Infektionen verläuft hier ebenfalls subklinisch, zumindest werden sie vom Tierhalter nicht bemerkt. Allerdings können bovine Stämme auch zum Ausbruch von Border Disease mit charakteristischen Symptomen wie *Hairy Shaker*-Lämmern und hoher Lämmersterblichkeit führen (Carlsson, 1991). Bei experimentell induzierten BVDV-Infektionen gravider Schafe wurden bei den Feten ähnliche pathologische Veränderungen gefunden wie bei bovinen intrauterinen BVDV-Infektionen. So beschrieb Hewicker-Trautwein schwerwiegende Defekte bei der fetalen Gehirnentwicklung, ebenso führten experimentelle

Infektionen, die Carlsson im Jahre 1991 bei acht Mutterschafen durchführte, zu zentralnervösen Ausfallserscheinungen bei den Lämmern (Carlsson, 1991; Hewicker-Trautwein and Trautwein, 1994). Andere Autoren beschrieben, dass bovine Infektionen bei Schafen zu Aborten, Früh- bzw. Totgeburten und nicht lebensfähigen Lämmern führten (Carlsson, 1991; Scherer et al., 2001). Weiterhin bewies Scherer die Existenz von BVDV-persistent infizierten Schafen. Ebenso sind vereinzelte Berichte über Ziegen veröffentlicht worden, die eine persistente Infektion mit BVDV aufwiesen (Nelson et al., 2008). Ziegen gelten als vergleichsweise unempfindlich gegenüber Pestiviren, allerdings führen experimentelle Infektionen ebenfalls zu Reproduktionsstörungen, Schädeldeformationen, zentralnervösen Ausfällen und der Geburt lebensschwacher Jungtiere (Depner et al., 1991a; Wohlsein et al., 1992). Lange Zeit galten Ziegen als unempfänglich für den BVDV-Genotyp 2, inzwischen wurden allerdings zwei aus Ziegen stammende Isolate als BVDV-2 identifiziert (Kim et al., 2006; Mishra et al., 2007).

2.4 BORDER DISEASE BEIM RIND

In der Literatur finden sich nur wenige Hinweise auf BDV-Infektionen beim Rind. In Untersuchungen, bei denen 310 österreichische Rinderisolate genotypisiert wurden, wurde ein geringer Prozentsatz an Isolaten gefunden (n=1), die BDV zugeordnet werden konnten. Diese Isolate stammten von Rindern, die typische Anzeichen einer BVDV-Infektion zeigten (Hornberg et al., 2009). Ein Artikel von Carlsson aus dem Jahr 1994 berichtet von einem schwedischen Betrieb, auf dem neben einem mit BDV infizierten PI-Schaf Rinder gehalten wurden. Die Rinder, die direkten Kontakt zu dem PI-Schaf hatten bildeten eine spezifische Immunität aus (Carlsson and Belak, 1994). In einem Projekt der Universität Zürich wurden BDV-PI-Lämmer mit neun seronegativen Kälbern zusammen gehalten. Sechs der neun Kälber bildeten im Untersuchungszeitraum von zwei Monaten eine spezifische Immunität aus, allerdings wurde weder in Blut- noch in Nasentupferproben virale RNA nachgewiesen (Reichle, 2009).

2007 wurden in Grossbritannien erstmals Fälle von drei Rindern beschrieben, die persistent mit BDV infiziert waren (Cranwell et al., 2007). Insgesamt wurden 1400 Rinderblutproben, die in einem Antigen-ELISA positiv getestet worden waren, mit einer Multiplex-PCR untersucht. Eines der drei virämischen Tiere war ein neugeborenes, kümmerndes Kalb, welches bald nach der Geburt verstarb. Bei den anderen beiden Tieren handelte es sich um

ein 13 Monate und ein 2,5 Jahre altes Rind, die klinische Symptome wie Durchfall und Abmagerung zeigten. Das ältere der beiden Tiere wies Anzeichen von Mucosal Disease auf.

2.5 SEROEPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM VORKOMMEN VON PESTIVIREN BEI KLEINEN WIEDERKÄUERN

Beschreibungen von Border Disease-Fällen und seroepidemiologischen Untersuchungen existieren von Autoren aus Europa, Amerika, aber vereinzelt auch aus Ländern anderer Kontinente wie Syrien, Tunesien oder Peru (Berriatua et al., 2006; Krametter-Frotscher et al., 2007b; Loken and Barlow, 1981; Rosadio et al., 1984; Thabti et al., 2005; Wilsmore and Roeder, 1984). In einigen Ländern wurden weiterführende Studien zur Feststellung der Seroprävalenz von Pestiviren bei kleinen Wiederkäuern durchgeführt. Die Ergebnisse aus unterschiedlichen Ländern differieren laut Nettleton zwischen Prävalenzen von 5 bis 50% (Nettleton, 2007). Allerdings ist dies in einigen Ländern der Mittelwert von Ergebnissen aus verschiedenen Regionen, die Einzelergebnisse der Prävalenzstudien liegen zum Teil deutlich über 50%.

In Österreich wurden von Krametter-Frotscher die Seroprävalenzen bei kleinen Wiederkäuern in unterschiedlichen Regionen eruiert, wobei starke regionale Unterschiede festgestellt wurden. In Kärnten lag die Einzeltierprävalenz bei 1527 untersuchten Schafseren bei 16,3% und die Herdenprävalenz bei 47,6%, in Tirol lagen beide Prävalenzen mit 34,9% bzw. 89,3% deutlich höher (Schiefer et al., 2006; Schleiner et al., 2006). In einer späteren Veröffentlichung berichten die Autoren von 29,4 bzw. 62,9% Einzeltier- bzw. Herdenprävalenz bezogen auf die Untersuchung von 4931 Schafseren aus vier österreichischen Bundesländern (Krametter-Frotscher et al., 2007b). Die seropositiven Proben, die in den österreichischen Studien gefunden wurden, wurden mittels SNT näher charakterisiert. Der Großteil der gefundenen Antikörper wurde auf Infektionen mit BVDV-1, deutlich weniger auf BDV und nur ein geringer Prozentsatz auf BVDV-2 zurückgeführt. Neben den Schafen wurden 549 Ziegen aus den vier Bundesländern auf Pestivirus-Antikörper untersucht. 11,5% der Einzeltiere bzw. 31,3% der Herden waren seropositiv, wobei hier ebenfalls starke regionale Schwankungen festgestellt wurden. Bei der genaueren

Differenzierung der Pestivirus-Antikörper wurden die gleichen Ergebnisse erzielt wie bei den Schafseren, hier dominierte ebenfalls BVDV Typ 1.

Die höchsten Prävalenzen bei beiden Tierarten wurden in Gebieten gefunden, in denen traditionell Schafe, Ziegen und Rinder gemeinsam gealpt werden. In einer anderen Veröffentlichung aus dem Jahr 2007 bekräftigte Krametter die Ergebnisse der vorangegangenen Studien, indem sie Schafe und Ziegen vor und nach der Alpung beprobte. Die Ergebnisse ließen einen signifikanten Anstieg der seropositiven Tiere durch Nutzung von Gemeinschaftsweiden erkennen (Krametter-Froetscher et al., 2007). Weiterhin wurde im Rahmen dieser Projekte festgestellt, dass die Seroprävalenz in Betrieben mit gemeinsamer Schaf- und Rinderhaltung signifikant höher ist als in Betrieben, bei denen Schafe und Ziegen keinen Kontakt zu Rindern haben.

Auch in anderen europäischen Ländern befassten sich Studien mit der Verbreitung von Pestiviren bei kleinen Wiederkäuern. Aus Deutschland existiert eine ältere Studie, die in Süd- und Mittelhessen eine Seroprävalenz bei Schafen von 30,2% ermittelte (Frost, 1991), in der Schweiz betrug sie bis zu 65% (Schaller and Zanoni, 2000), in England und Wales 10,8% (Sands and Harkness, 1978), und in Nordirland 5,3% (Graham et al., 2001). Graham konnte in seinen epidemiologischen Untersuchungen übrigens keinen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von seropositiven Schafen und Rinderhaltung feststellen.

Aus den Ländern mit intensiver Schafhaltung wie Australien und Neuseeland, existieren v.a. Fallberichte über Border Disease-Ausbrüche. Nur wenige Artikel befassen sich mit seroepidemiologischen Untersuchungen. Lim stellte 1984 anhand einer Befragung von 478 Schafhaltern fest, dass in Victoria 0,8% der Mutterschafe (n=111) Lämmer mit *Hairy Shaker*-Symptomen zur Welt brachten. Anhand dieser Befragung schloss er darauf, dass BD in dieser Region kein wirtschaftliches Problem darstellt (Lim and Carnegie, 1984). Allerdings wurde nicht berücksichtigt, dass Symptome des *Hairy Shaker*-Syndroms auch andere Ursachen haben könnten. Laboruntersuchungen wurden nicht durchgeführt, die Prävalenz wurde rein anhand der Angaben der Tierhalter ermittelt.

Andere Autoren untersuchten sowohl Schaf- als auch Ziegenblutproben: In den Niederlanden wurden bei 45% der untersuchten Schaf- und 27% der Ziegenbetriebe Antikörper gefunden, allerdings wurden in dieser Studie nur 29 Schaf- und 126 Milchziegenfarmen beprobzt (Orsel et al., 2009). In Dänemark wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten von Schafen und Ziegen festgestellt, bei beiden Spezies betrug die Prävalenz 8,3% bezogen auf die Einzeltieruntersuchungen (Tegtmeier et al., 2000). In Norwegen betrug die Prävalenz bei Schafen 4,5% (Loken et al., 1991b) und 3,6% bei Ziegen (Loken, 1990).

In Spanien beschäftigten sich ebenfalls einige Forschergruppen mit der Verbreitung von Pestiviren bei kleinen Wiederkäuern. Berriatua untersuchte Milchproben aus dem Baskenland mit einem Antikörper-ELISA, die daraus resultierende Prävalenz betrug im Mittel 68%. Allerdings stellte Berriatua ebenfalls starke regionale Abweichungen fest: In der Provinz Araba wurden mit 93% am meisten, in Biskaya mit 54% am wenigsten seropositive Tiere gefunden (Berriatua et al., 2006). Andere Autoren ermittelten mit 17,9% in der Nähe von Madrid (Raul C. Mainar-Jaime, 1999) bzw. 17,6% in Nordspanien (Valdazo-Gonzalez et al., 2008) deutlich niedrigere Prävalenzen. Allerdings wurden bei Valdazo Blutproben von Schlachtlämmern aus einem Schlachthof in Nordspanien untersucht. Die geografische Herkunft der Lämmer waren drei Regionen in Nord- und Westspanien, es erfolgte jedoch keine regionale oder betriebsweise Zuordnung der seropositiven Proben. Weiterhin werden in Spanien die Lämmer häufig in großen Mastbetrieben mit teilweise bis zu 50.000 Mastplätzen bis zum fertigen Schlachtgewicht gemästet. In diese Betriebe werden neben spanischen Tieren auch Lämmer aus dem Ausland verbracht. Die Ergebnisse dieser Studie geben daher keinen repräsentativen Überblick über die serologische Situation in den drei Regionen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 REKRUTIERUNG DER BETRIEBE

Seit Juli 2008 läuft am Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen der Universität München das Projekt „Molekulare Differenzierung von Pestiviren und Untersuchungen zum Vorkommen von Pestiviren bei Schaf und Ziege in Bayern“. Ziel dieser Studie ist es, eine Prävalenzschätzung für Pestiviren beim kleinen Wiederkäuer für Bayern zu erstellen. Dazu wurden neben Schaf- und Ziegenherden auch Mischbetriebe mit gemeinsamer Schaf-u./o. Ziegen- und Rinderhaltung untersucht.

Zu Beginn des Projektes wurde versucht, über die bayerischen Veterinärämter an Adressen geeigneter Betriebe zu gelangen, was aufgrund von Datenschutzbestimmungen scheiterte. Aus dem gleichen Grund konnten Schafblutproben, die im Rahmen der staatlichen Tierseuchenbekämpfung gewonnen wurden, nicht genutzt werden. Im Dezember erschien in der Zeitschrift „Der bayerische Schafhalter“ ein Fachartikel über Border Disease mit einer Studienbeschreibung. Dem Aufruf, an dem Projekt teilzunehmen, folgten allerdings nur wenige Schafhalter. Ebenso stieß ein Infoblatt, welches am Zentralen Landwirtschaftsfest 2008 am Stand des Verbandes der bayerischen Schafhalter verteilt wurde, auf wenig Resonanz.

Der Großteil der 100 beprobten Betriebe mit Schafen und/oder Ziegen wurde über persönliche Kontakte zu Tierärzten und Landwirten rekrutiert. Die Betriebe mussten keine zusätzlichen Kriterien wie z.B. Mindesttierzahl, bestimmte Haltungs- oder Betriebsformen erfüllen.

Die Betriebe wurden bis auf wenige Ausnahmen selbst angefahren und beprobt. Dafür wurden Synergien mit zwei anderen Projekten des LGL genutzt, so dass die Blutentnahme durch ein Team aus drei Tierärztinnen durchgeführt wurde.

3.2 BESCHREIBUNG DER BETRIEBE

3.2.1 BETRIEBSSTRUKTUREN

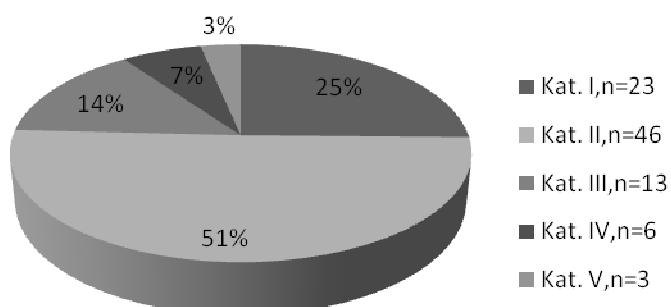
Insgesamt wurden für die Studie 100 Betriebe beprobt. Darunter waren 39 Betriebe, die Rinder und Schafe hielten, 7 Betriebe hielten Rinder, Schafe und Ziegen und 3 Betriebe besaßen neben Rindern noch Ziegen. Weiterhin wurden insgesamt 37 reine schafhaltende Betriebe und 6 reine Ziegenherden beprobt. In 8 Herden wurden Schafe und Ziegen zusammen gehalten.

Bei den Mischbetrieben wurden insgesamt 14 rinderhaltende Betriebe (29%) untersucht, die weniger als 19 Tiere hielten; 14% der Bestände (n=7) besaßen 20-49, ebenfalls 14 Betriebe hielten 50-99 Rinder. In der Kategorie 100-199 Tiere konnten 11 Betriebe (22%) für die Studie gewonnen werden, Großbetriebe mit mehr als 200 Rindern waren mit 3 Betrieben (6%) vertreten.

Der Großteil der beprobten Schafe (Abbildung 3) wurde in Herden mit bis zu 50 Tieren gehalten: 25% der Betriebe (n=23) besaßen 1-9 Schafe, 51% (n=46) hielten 10-49 Tiere. Dies entspricht in etwa der Struktur der Schafhaltung in Bayern. Bayernweit gesehen dominieren in der Schafhaltung Kleinbetriebe (90%), die nicht mehr als 49 Schafe halten. In 13 Beständen wurden 50-199, in 6 Beständen 200-499 Schafe gehalten. In der Gruppe der Großbetriebe mit mehr als 500 Tieren wurden insgesamt 3 Betriebe (3%) untersucht.

Abbildung 3: Herdengröße Schafe der beprobten Betriebe

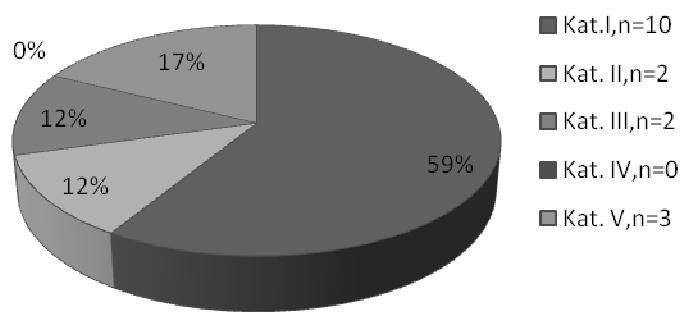
Einteilung in Kategorien und Anzahl der Betriebe: I: 1-10, II: 11-49, III: 50-199, IV: 200-499, V: >500



Bei den Ziegenbetrieben sah die Betriebsstruktur ähnlich aus wie bei den Schafen. Die Dominanz der Kleinbetriebe ist bei den bayerischen Ziegenhaltern noch ausgeprägter als bei den Schafhaltern, ein Großteil der Betriebe (91%) besitzt nicht mehr als neun Ziegen. So wurden auch in dieser Studie mit 59% (n=10) hauptsächlich kleine Bestände mit weniger als neun Ziegen besucht, gefolgt von Betrieben, die 10-19 Tiere besaßen (n=2; 12%). Zwei teilnehmenden Beständen gehörten 20-29 Ziegen (12%), drei Betriebe (17%) besaßen mehr als 50 Tiere.

Abbildung 4: Herdengröße Ziegen der beprobteten Betriebe

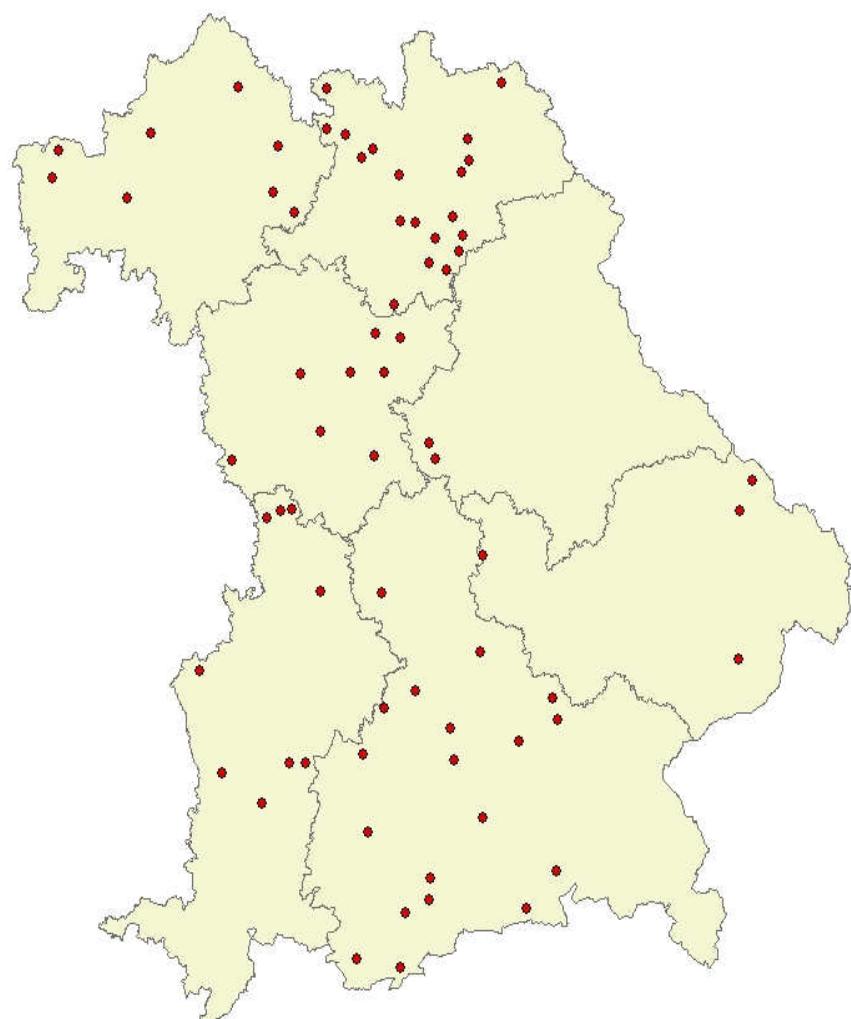
Einteilung in Kategorien und Anzahl der Betriebe: I: 1-9, II: 10-19, III: 20-29, IV: 30-49, V: >50



3.2.2 VERTEILUNG DER BETRIEBE IN BAYERN

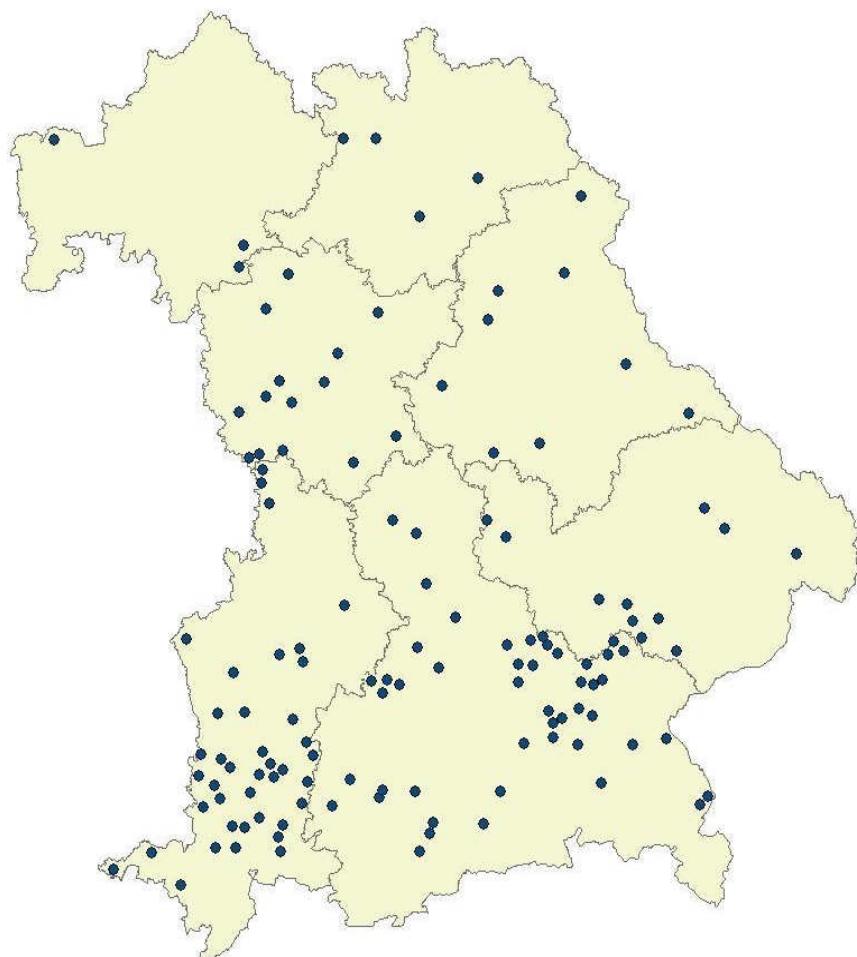
Das Untersuchungsgebiet umfasste ganz Bayern, es wurden in jedem Regierungsbezirk Betriebe beprobt. Der Großteil der untersuchten Betriebe stammte aus Oberbayern (n=43), gefolgt von den oberfränkischen Betrieben (n=18). In Mittelfranken wurden 12 Betriebe beprobt, in Unterfranken und Schwaben jeweils 10, in Niederbayern 5 und in der Oberpfalz 2 Betriebe beprobt. In Abbildung 5 sind die Betriebe anhand der Postleitzahlen den Regionen zugeordnet worden. Waren mehrere Betriebe mit der gleichen Postleitzahl vorhanden wurden diese in der Grafik zu einem Punkt zusammengefasst.

Abbildung 5: Bayernweite Verteilung der untersuchten Betriebe mit kleinen Wiederkäuern



Für einen Teilbereich dieser Arbeit, die Genotypisierung positiver Proben mittels PCR, wurden Rinderblute herangezogen, die im Rahmen der BVDV-Diagnostik am Institut als Antigen-positive Proben identifiziert wurden. Die Regionalisierung erfolgte durch die Postleitzahlen der Betriebe, falls diese nicht verfügbar waren, wurden die Proben anhand der Postleitzahl des Tierarztes zugeordnet. Da das Einsendungsgebiet des Instituts hauptsächlich den west- und südbayerischen Raum umfasst, stammten diese 325 Rinderblutproben vorwiegend aus diesen Gebieten.

Abbildung 6: Übersicht über die Herkunft der Rinderisolate für die Genotypisierung



3.3 ERHEBUNG RELEVANTER BETRIEBSDATEN ANHAND EINES FRAGEBOGENS

In jedem Betrieb, der im Rahmen dieser Studie untersucht wurde, wurde zusammen mit dem Tierhalter ein Fragebogen ausgefüllt. Die Rinderblute aus der Diagnostik wurden von Tierärzten eingesandt; von diesen Tieren war meist ein kurzer Vorbericht bekannt. Nähere Daten des Betriebes wurden für diesen Teil der Arbeit nicht eruiert.

In den Betrieben mit kleinen Wiederkäuern wurden die Betriebsdaten wie Anschrift, Regierungsbezirk und Anzahl der gehaltenen Wiederkäuer festgehalten. Die Anzahl der gehaltenen Rinder wurde aufgeschlüsselt nach Kälbern (Jungtiere bis zum Alter von 6 Monaten), Jungtiere von 6 bis 24 Monate bzw. bei weiblichen Tieren bis zur ersten Kalbung, Kühe und Bullen. Bei den kleinen Wiederkäuern umfasste die Einteilung neben Muttertieren und Böcken noch Jungtiere bis zum ersten Lebensjahr. Außerdem wurde aufgrund des möglichen Vorhandenseins artfremder Pestiviren jeder Betriebsleiter befragt, ob er Schweine hielt. Insgesamt gaben 13 Tierhalter zu Protokoll, dass sie neben kleinen und großen Wiederkäuern auch Schweine gehalten haben.

Die einzelnen Punkte des Fragebogens, die im Folgenden näher ausgeführt werden, wurden jeweils für jede Tierart gesondert aufgenommen. Drei Betriebe, bei denen eine aktuelle oder kurz zurückliegende BVDV-Infektion nachgewiesen wurde, wurden später nochmals nach Krankheitssymptomen befragt; diese Antworten wurden gesondert notiert. Das hier beschriebene Projekt war ein Kooperationsprojekt mit zwei anderen Projekten des LGL. In dem im Anhang aufgeführten Fragebogen sind einige Punkte vorhanden, die nicht ausgewertet wurden, da sie für Pestiviren nicht relevant sind.

3.3.1 BETRIEBSFORMEN DER UNTERSUCHTEN BESTÄNDE

Bei den rinderhaltenden Betrieben wurden 31 Betriebe im Voll- und 18 Betriebe im Nebenerwerb bewirtschaftet. Die im Haupterwerb geführten Betriebe hielten meistens mehr als 50 Rinder, während v.a. kleinere Betriebe mit weniger als 50 Rindern die Landwirtschaft im Nebenerwerb betrieben.

In den schafhaltenden Betrieben dominierte die Haltung im Nebenerwerb (80%), insgesamt wurden allerdings hauptsächlich kleine Herden mit weniger als 50 Schafen beprobt, die bevorzugt als Hobbytiere gehalten wurden. Die mittelgroßen und großen Schafherden wurden hauptsächlich im Haupterwerb bewirtschaftet.

Bei den Ziegenbetrieben dominierte ebenfalls die Haltung im Nebenerwerb (82%), lediglich die drei größten besuchten Betriebe gaben an, die Ziegen im Haupterwerb zu nutzen.

3.3.2 NUTZUNGSART

Bei den Rindern dominierte deutlich die Nutzungsart Milchvieh. Von den insgesamt 49 Beständen dienten 29 Herden (59%) der Milcherzeugung, jeweils 10 Bestände (20%) betrieben reine Rindermast bzw. Mutterkuhhaltung. In den milchliefernden Betrieben wurden meist mehr als 50 Rinder (n=23; 79%), in den Mast- und Mutterkuhbetrieben wurden meist weniger als 50 Rindern gehalten.

Tabelle 1: Nutzungsart Rinder in Abhängigkeit von der Betriebsgröße

Anzahl Rinder	Milchvieh	Mast	Mutterkuh
1-19	3	6	6
20-49	3	3	1
50-99	10	1	2
>100	13	0	1
Summe	29	10	10

Die Schafbetriebe wurden danach befragt, ob sie ihre Tiere hauptsächlich zu Zuchzwecken oder für die Fleischerzeugung hielten. Betriebe, die weder gezielte Zucht noch reine Mast betrieben wurden in die Gruppe Zucht und Mast eingeteilt. In diese Gruppe fielen auch die meisten Hobbyhalter bzw. Schafhalter, die ihre Tiere aus anderen Interessen wie Landschaftspflege oder als Streicheltiere hielten. Im Rahmen der Studie wurde kein Betrieb beprobt, der Schafmilch erzeugte. Zuchtbetriebe waren mit 23% (n=21) im Vergleich zu den anderen Nutzungsarten geringer vertreten, gefolgt von den Betrieben, die angaben, die Tiere sowohl zur Zucht als zur Mast einzusetzen (33%, n=30). Betriebe, bei denen der Schwerpunkt auf der Erzeugung von Mastlämmern lag bildeten mit 44% oder 40 Betrieben den größten Anteil.

Tabelle 2: Nutzungsart Schafe in Abhängigkeit von der Betriebsgröße

Anzahl Schafe	Zucht	Mast	Zucht+Mast
1-9	8	12	3
10-49	8	24	14
50-199	3	4	6
200-499	1	0	5
>500	1	0	2
Summe	21	40	30

Die untersuchten Ziegenherden wurden dagegen hauptsächlich zur Zucht eingesetzt, wobei in diese Gruppe auch Hobbytiere eingeordnet wurden oder Ziegen, die zur Landschaftspflege benutzt wurden. Von insgesamt 17 Ziegenhaltern gaben 12 (71%) an, ihre Tiere hauptsächlich aus züchterischem Interesse oder in Hobbyhaltung zu halten. In 2 Beständen wurden die Ziegen hauptsächlich für die Fleischerzeugung, in drei Betrieben für die Milchproduktion genutzt. In dieser Kategorie waren nur Bestände mit mehr als 50 Ziegen vertreten.

Tabelle 3: Nutzungsart Ziegen in Abhängigkeit von der Betriebsgröße

Anzahl Ziegen	Zucht/Hobby	Mast	Milch
1-9	9	1	0
10-19	2	0	0
20-29	1	1	0
30-49	0	0	0
>50	0	0	3
Summe	12	2	3

3.3.3 KONTAKT DER WIEDERKÄUER UNTEREINANDER

In jedem Betrieb wurde vermerkt, ob die Tierarten direkten oder indirekten Kontakt miteinander hatten, ob Kontakte zu betriebsfremden Wiederkäuern bestanden hatten und ob der Betrieb Tiere zugekauft hatte. Im Zuge dieser Befragung wurde außerdem von jedem Betrieb eine Betriebsskizze angefertigt, aus der ersichtlich war, wo die einzelnen Tiergruppen aufgestellt waren. Jedem Stallteil wurde eine Nummer zugeordnet, die auf der Blutentnahmeliste bei dem jeweiligen Tier vermerkt wurde. So konnte nachvollzogen werden, welche Tiere direkten Kontakt zueinander hatten.

3.3.3.1 Direkte Tierkontakte innerhalb eines Mischbetriebes

Wurde die Frage nach Kontakt der unterschiedlichen Tierarten zueinander bejaht, wurde genauer hinterfragt, wo der direkte Kontakt stattfand bzw. welche Tiergruppen direkten Kontakt zueinander hatten. So gaben 23 von 39 Landwirten, die Rinder und Schafe hielten, an, dass ihre Tiere keinen Kontakt zueinander hatten; bei einem Bauern hatten die Milchkühe Weidegang und konnten so zu den Schafen des Betriebes Kontakt aufnehmen. Bei einem Betrieb grenzte die Schafweide direkt an die Weide der Mutterkuhherde, somit hatten in diesem Betrieb alle Schafe und alle Rinder die Möglichkeit, über den Zaun Kontakte wahrzunehmen. In insgesamt 14 Beständen wurden die Schafe mit Rindern in einem gemeinsamen Stall gehalten: In zehn Fällen hatten die Schafe Kontakt mit allen Rindern, in zwei Fällen wurden Schafe und Jungrinder nebeneinander gehalten und in ebenfalls zwei Fällen hatten die Schafe direkten Kontakt zu den Kälbern des Betriebes.

In Betrieben mit gemeinsamer Haltung von Rindern, Schafen und Ziegen (n=7) hatten die einzelnen Tierarten nur in einem Betrieb keine direkte Kontaktmöglichkeit. In einem Bestand wurden die Rinder im Winter im gleichen Stall wie die Ziegen gehalten; die dazugehörigen Schafe waren tagsüber mit den Ziegen auf einer Weide, hatten aber keinen direkten Kontakt zu den Rindern. In drei weiteren Betrieben hatten die verschiedenen Tierarten bedingt durch gemeinsame oder angrenzende Weiden im Sommer direkten Kontakt, während sie im Winter in getrennten Ställen untergebracht waren. Drei Landwirte gaben an, dass ihre Tiere sowohl im Stall als auch auf der Weide direkt zusammentrafen. In einem dieser Betriebe wurde die

Mutterkuhherde im Winter direkt neben den Jungziegen und den trächtigen Ziegen gehalten, die Schafe dieses Bestandes hatten im Sommer Kontakt zu den Ziegen aber keinerlei direkte Kontaktmöglichkeit zu Rindern. In den drei Beständen, in denen Ziegen und Rinder zusammen gehalten wurden, hatte keine der Ziegen direkten Kontakt zu den Rindern.

Tabelle 4: Direkter Kontakt der Tierarten in Mischbetrieben (n=49)

mit Angabe des Kontaktortes, Aufschlüsselung nach Betriebsart

Betriebsart	Kein Kontakt	Weide	Stall	Weide+ Stall
R+S	23	2	14	0
R+S+Z	1	3	1	2
R+Z	3	0	0	0

3.3.3.2 Indirekte Kontakte über Personen, Geräte und alternativ genutzte Flächen

Weiterhin wurde für Mischbetriebe abgefragt, ob die unterschiedlichen Tierarten indirekten Kontakt zueinander hatten. Hier wurde unterschieden, ob der indirekte Kontakt über die versorgenden Personen, benutzte Gerätschaften oder über gemeinsam benutzte Weiden stattfand. Hierunter wurden auch Betriebe gezählt, die das gemähte Gras einer Tierweide an eine andere Tierart verfütterten. Alle Betriebe, in denen die Tiere unterschiedlicher Spezies ganzjährig direkten Kontakt zueinander hatten, wurden in dieser Wertung herausgenommen. Betriebe, in denen die Tierarten nur saisonal direkten Kontakt hatten, wie z.B. gemeinsames Winterquartier oder Sommerweide, wurden in diese Auswertung mit einbezogen.

Von den 49 Mischbetrieben gab nur ein Tierhalter an, dass seine Rinder und Schafe keinerlei indirekten Kontakt zueinander hatten. Auf diesem Betrieb wurden die Rinder im Laufstall ohne Weidegang gehalten, während die Schafe etwa einen Kilometer entfernt ganzjährig in einem separaten Stall untergebracht waren und von einer Person versorgt wurden, die sich ausschließlich um die Schafe kümmerte. In insgesamt vier Betrieben wurden die unterschiedlichen Tierarten von der gleichen Person versorgt, die somit die indirekte Kontaktquelle darstellte. Weitere 35 Betriebsleiter gaben an, dass zusätzlich zur

gemeinsam betreuenden Person auch verschiedene Gerätschaften wie Schubkarren, Mistgabeln etc. gemeinsam verwendet wurden. Somit überwog diese Kategorie deutlich mit insgesamt 73%. In sieben Betrieben bestanden indirekte Kontakte über Gerätschaften. Personen und Weiden. Zwei Landwirte (4%) gaben an, dass nur über Personen und Weide direkte Kontaktmöglichkeiten bestanden, jedoch keine Geräte gemeinsam benutzt wurden.

Tabelle 5: Indirekter Kontakt der Tierarten in Mischbetrieben (n=49)

mit Angabe der Art der Kontaktquelle: Personen (P), Geräte (G), Weide (W)

Betriebsart	Nur P	P+G	P+W	G+P+W
R+S	3	30	2	3
R+S+Z	0	3	0	4
R+Z	1	2	0	0

3.3.3.3 Kontakt zu nicht betriebseigenen Wiederkäuern

Hier wurde zwischen verschiedenen Kontaktquellen zu anderen Wiederkäuern unterschieden. Unter den Punkt „Pensionstiere“ fielen 26 Betriebe, die ihre Tiere auf Gemeinschaftsweiden gaben oder zeitweilig Tiere anderer Besitzer beherbergten. Insgesamt sechs Landwirte gaben an, in den letzten drei Jahren ein Tier in die Tierklinik gebracht zu haben; bei diesen Betrieben handelte es sich immer um Mischbetriebe, die Rinder in die Klinik eingeliefert hatten. Unter den Tierhaltern der kleinen Wiederkäuer war kein einziger, der Schafe oder Ziegen in die Klinik gebracht hatte. Unter dem nächsten Punkt wurden verschiedene Veranstaltungen wie Ausstellungen, Hoffeste, Märkte etc. zusammengefasst, bei denen Tiere verschiedener Besitzer zusammen aufgetrieben wurden; hierunter fielen 13 Bestände. In 10 Beständen hatten die Tiere Kontakt zu Tieren vorbeiziehender Wanderschäfer, in 34 Fällen bestanden Kontaktmöglichkeiten zu Nachbartieren. Unter den 100 Betrieben waren insgesamt 47, bei denen die Tiere keinen Kontakt zu anderen Wiederkäuern hatten.

Tabelle 6: Anzahl der Betriebe mit Kontakt zu betriebsfremden Wiederkäuern,
Aufschlüsselung nach Kontaktquelle

Kontaktquelle	Pensionstiere	Klinik	Ausstellung	Wanderschäfer	Nachbartiere
Anzahl d. Betriebe	26	6	13	10	34

3.3.4 ZUKÄUFE

Jeder Tierhalter wurde befragt, ob er in den letzten drei Jahren Wiederkäuer zugekauft hatte. Alle Schaf- und Ziegenhalter kauften Böcke oder tauschten diese mit anderen Betrieben zur Blutlinienaufrischung. Keine Zukäufe weiblicher oder junger Tiere tätigten 47 Betriebe; in 26 Betrieben wurden Schafe zugekauft, in neun Betrieben Rinder und in sechs Ziegen. In insgesamt zwölf Beständen wurden je zwei Tierarten zugekauft. Insgesamt gesehen überwog mit 53% der Anteil der Betriebe, die eine oder mehrere Tierarten zugekauft hatten.

Tabelle 7: Anzahl der Betriebe mit Zukäufen, Aufgeschlüsselt nach den zugekauften Tierarten

Zukäufe	R	S	Z	R+S	R+Z	S+Z
Anzahl Betriebe	9	26	6	8	2	2

3.3.5 BVDV-/ BDV-VORBERICHT

Von jedem Betrieb wurde der BVDV- bzw. BDV-Vorbericht aufgenommen. Hierzu wurden die Betriebsleiter befragt, ob in ihrem Bestand bisher bestätigte Fälle dieser Krankheiten aufgetreten waren. Falls diese Frage bejaht wurde, wurde näher nachgefragt, wann diese Fälle aufgetreten waren und ob persistent infizierte Tiere gefunden wurden. Hier wurden alle Angaben- auch länger zurückliegende Fälle- notiert.

Weiterhin wurde eruiert, ob die Betriebsleiter im Rahmen des freiwilligen bayerischen BVDV-Bekämpfungsverfahrens spezifische Untersuchungen durchführen ließen. Bei Bejahung wurde festgehalten, wann und mit welchem Ergebnis diese Blutuntersuchungen durchgeführt wurden.

Tabelle 8: BVDV-spezifischer Vorbericht bei Rindern, Aufschlüsselung nach Betriebsart

BVDV-Fälle?	R+S	R+S+Z	R+Z
Ja	12	2	0
Nein	27	5	3

Unter den untersuchten 100 Betrieben war kein einziger Betrieb, der vorberichtlich mit BD zu tun gehabt hatte; zumindest waren den Betriebsleitern keine Fälle bekannt. Anders sah es bei den rinderhaltenden Betrieben aus: 14 der insgesamt 49 Mischbetriebe mit Rinderhaltung hatten aktuell oder in der Vergangenheit wissentlich Kontakt mit dem BVD-Virus, allerdings lagen in fünf Betrieben die Infektionen länger als 10 Jahre zurück. Nur einer dieser Landwirte ließ seitdem regelmäßig serologische Untersuchungen der Jungrinder durchführen, wodurch eine aktuelle BVDV-Infektion als unwahrscheinlich angesehen werden konnte; bei den restlichen Betrieben war der aktuelle BVD-Status unbekannt. Weitere fünf Tierhalter gaben an, innerhalb der letzten 10 Jahre BVDV-Fälle im Betrieb gehabt zu haben, zwei von ihnen gelten seitdem gemäß der Jungtier-Untersuchung als negativ. Vier der besuchten Betriebe konnten in die Kategorie „aktuelle BVDV-Fälle“ eingeordnet werden, in zwei Fällen waren zum Untersuchungszeitpunkt PI-Tiere im Bestand vorhanden, in zwei weiteren Beständen waren die PI-Tiere einen bzw. sechs Monate vorher gemerzt worden.

Tabelle 9: Positive BVDV-Mischbetriebe mit Angabe der Studien-, Betriebsnummer, -art, Zeitpunkt der BVD-Infektion, Ergebnis der serologischen Jungtier-Untersuchung und Vorhandensein von persistent infizierten Tieren (PI)

Betriebs-ID	Betriebsart	Letzte BVDV-Fälle	BVDV-Ak bei Jungtieren	PI-Tiere im Bestand?
2	R+S	1999	Nicht untersucht	-
3	R+S	1981	Negativ	-
4	R+S	1998	Nicht untersucht	-
5	R+S	1994	Nicht untersucht	-
9	R+S	½ J. vor Erhebung	Positiv	PI bis vor ½ J.
12	R+S	2003	Nicht untersucht	-
21	R+S	aktuell*	Positiv	4 PI im Bestand
28	R+S	aktuell	Keine JT im Bestand	5 PI im Bestand
44	R+S	2005	Negativ	-
61	R+S	aktuell	Positiv	-
73	R+S	2002	Nicht untersucht	-
75	R+S+Z	1995	Nicht untersucht	-
90	R+S+Z	2006	Negativ	-
93	R+S	aktuell	Positiv	3 PI bis 1 Monat vor Erhebung

* aktuell: Zum Zeitpunkt der Erhebung

3.3.6 SYMPTOME, DIE FÜR EINE BVDV- ODER BDV-INFektion sprechen

Die Landwirte wurden befragt, ob bei ihren Tieren Symptome aufgetreten waren, die Hinweise auf eine BVDV- bzw. BDV-Infektion geben könnten. Zur Veranschaulichung dieser Fragestellung wurden den Tierbesitzern Fotos von *Hairy Shaker*-und *Mucosal Disease*-Fällen gezeigt. Falls eine ätiologische Diagnose vorlag, wurde diese in den Unterlagen vermerkt. Eigene klinische Beobachtungen, die bei der Adspektion der gebluteten Tiere auffielen wurden ebenfalls vermerkt.

3.3.6.1 Tierverluste

Unter diesem Punkt wurde generell nachgefragt, ob die Tierhalter in den letzten Jahren Tierverluste zu verzeichnen hatten und wenn ja, bei welcher Tierart. Außerdem interessierte die Anzahl der verstorbenen Tiere. Sofern die Todesursache bekannt war wurde dies ebenfalls notiert. Von den 100 Betrieben gaben 29 Betriebsleiter an, dass bei ihnen Tiere verstorben waren. Da dieses Projekt in Kooperation mit einer Studie durchgeführt wurde, bei der BKF-positive Betriebe beprobt wurden, ist ein Teil der Symptome und Tierverluste, die im Rinderbereich verzeichnet wurden, auf BKF zurückzuführen waren. Insgesamt neun Landwirte gaben diese Erkrankung als Abgangsursache bei den Rindern an, drei weitere Landwirte führten die Todesfälle auf *Mucosal Disease* zurück. In zwei Betrieben wurde von plötzlichen Todesfällen unbekannter Genese berichtet. Ein Landwirt mit 136 Rindern und 41 Schafen gab an, dass er Verluste sowohl bei den Rindern als auch bei den Schafen zu verzeichnen hatte; hier verstarben durchschnittlich vier bis fünf Kälber pro Jahr und ca. zwei Mutterschafe. Diese Problematik bestand laut Betriebsleiter schon über mehrere Jahre und hatte sich innerhalb der letzten Jahre nicht gebessert. Bei den Kälbern waren Durchfallerkrankungen das größte Problem, bei den Schafen war für die plötzlichen Todesfälle keine Ursache bekannt.

Tierverluste, die nur Schafe betrafen, wurden in 11 der Betriebe angegeben. In fünf Betrieben wurden die Todesfälle bakteriellen Infektionen bzw. Geburtskomplikationen zugeordnet. In zwei weiteren Beständen mit je 19 Tieren verstarben jährlich ca. zwei Schafe. Ein Schafhalter mit 200 Schafen berichtete von ca. 60 Todesfällen im Jahr 2008, er führte

diese allerdings auf eine sehr schlechte Futterqualität zurück. Zwei Tierhalter berichteten über massive Probleme sowohl während der Lammzeit als auch während der Aufzuchtperiode; es wurden ca. 5% der Lämmer tot oder lebensschwach geboren; die meisten verendeten nach relativ kurzer Zeit. In einem weiteren Betrieb wurde ein Lamm mit *Hairy Shaker*-ähnlichen Symptomen geboren, dieses Tier verstarb drei Tage nach der Geburt.

Bei den Ziegenhaltern gab es drei Betriebsleiter an, Probleme mit Tierverlusten gehabt zu haben; in allen drei Betrieben waren die Jungtiere betroffen. In zwei Beständen verstarben die Ziegenlämmer; in einem Betrieb handelte es sich um Neugeborene, in dem anderen Betrieb verendeten fünf Zicklein, die kurz zuvor zugekauft worden waren. Trotz Sektion konnte keine eindeutige Todesursache festgestellt werden. Ein dritter Ziegenhalter berichtete, dass bei ihm im Jahr 2000 mehrere Jungtiere geboren wurden, die aufgrund einer steifen Hinterhand nicht aufstehen konnten und kurze Zeit darauf verstarben.

Tabelle 10: Anzahl der Betriebe mit Tierverlusten mit Angabe der betroffenen Tierart

Symptom	R	S	R+S	Z
Tierverluste	14	11	1	3

3.3.6.2 Läsionen an den sichtbaren Schleimhäuten

Die Intention für die Erfassung von Läsionen um bzw. in der Maulhöhle und der Schleimhaut war, eventuell vorhandene Mucosal Disease-Fällen zu erfragen. Vier Landwirte gaben an, Läsionen an der Maulhöhle und deren Schleimhaut bei ihren Rindern beobachtet zu haben, allerdings handelte es sich bei drei der vier Tiere nachweislich um an BKF erkrankte Rinder. Der vierte genannte Fall war ein Betrieb mit BVD-Problematik, in dem ein Kalb an Mucosal Disease verendete. Bei den Schafen wurden drei Fälle bei Lämmern registriert, alle drei wurden vom Tierhalter der Erkrankung „Lippengrind“ zugeordnet.

Tabelle 11: Anzahl der Betriebe mit Vorkommen von Läsionen an sichtbaren Schleimhäuten oder im Maulbereich,

Aufschlüsselung nach betroffener Tierart

Symptom	R	S
Läsion Maul+Schleimhaut	4	3

3.3.6.3 Durchfall

In dieser Rubrik gaben insgesamt 15 Tierhalter an, Probleme mit Durchfällen gehabt zu haben. Bei den Rindern waren in fünf der neun genannten Betriebe Kälber betroffen, in zwei Fällen wurde als Ursache Kryptosporidien bzw. eine BVDV-Infektion vermutet. Einer dieser Betriebsleiter mit 136 Rindern berichtete über z.T. massive Durchfallprobleme bei ihren Jungtieren, die pro Jahr in ca. vier Fällen mit dem Tod endeten. In diesem Betrieb wurden neben den Rindern Schafe gehalten, die nach Aussage des Besitzers nicht unter Durchfall litten. Nach eigenen Beobachtungen- der Betrieb wurde mehrmals besucht- waren die Schafe ebenfalls an länger anhaltenden Durchfällen erkrankt; bei ihnen war dies verbunden mit Abmagerung und plötzlichen Todesfällen unbekannter Genese.

Von den fünf Schafbetrieben mit Durchfallerkrankungen gab ein Betriebsleiter als Ursache Bandwurmbefall an, die Ursache in den anderen Fällen wurde als unbekannt angegeben. In dem einen Ziegenbetrieb mit Durchfallproblematik war die Ursache für die Durchfälle bei den Jungtieren ebenfalls unbekannt. Allerdings handelte es sich hier um neu zugekauftes Jungvieh, die nach Einstellung in den neuen Betrieb und Futterumstellung an Durchfall erkrankten. Diese Jungtiere waren jedoch insgesamt in einem schlechten Gesundheitszustand.

Tabelle 12: Anzahl der Betriebe mit Vorkommen von Durchfallproblematik,

Aufschlüsselung nach der betroffenen Tierart

Symptom	Ja, R	Ja, S	Ja, Z
Durchfall	9	5	1

3.3.6.4 Hairy Shaker- ähnliche Symptome

Unter diesem Punkt wurden Symptome bei Lämmern zusammengefasst, die dem oben beschriebenen *Hairy Shaker*-Syndrom ähneln. Vier Tierhalter gaben an, derartige Symptome bei ihren Tieren beobachtet zu haben. Bei einem sehr engagierten Merinozüchter wurde im Jahr 2008 ein Lamm geboren, welches am ganzen Körper zitterte, festlag und keine Milch aufnehmen konnte; dieses Tier verstarb nach drei Tagen. Ein anderer Schafhalter mit 350 Tieren berichtete, dass bis 2004 über einen Zeitraum von acht Jahren mehrere Lämmer geboren wurden, die am Kopf zitterten. Diese Jungtiere nahmen allerdings ganz normal Futter auf und waren im übrigen Verhalten ungestört. Einige dieser Lämmer starben relativ rasch nach der Geburt, die restlichen wuchsen ganz normal auf und verloren im Alter von zwei bis drei Monaten die Symptome. Weiterhin berichtete dieser Schafhalter, dass er jedes Jahr etwa fünf bis zehn Lämmer bekäme, die ein auffallend langes Vlies besäßen, ansonsten aber völlig normal wären. Ein anderer Tierhalter mit 200 Schafen gab an, in einem Jahr 60 bis 70 Lämmer gehabt zu haben, die unterschiedlich stark zitterten. Diese Lämmer hatten außerdem zum Zeitpunkt der Geburt kein richtiges Vlies ausgebildet. Ein Teil der Tiere überlebte, blieb aber weiterhin stark im Wachstum zurück. Allerdings war das Zittern in diesem Betrieb kein reines Jungtierproblem, ein Teil der 200 Altschafe zeigte ebenfalls dieses Symptom; von diesen Tieren verstarben etwa 10 bis 20. Im vierten Betrieb dieser Kategorie wurde kurz nach der Blutentnahme ein Lamm mit verkürzten Hinterbeinen, vorgewölbter Stirn und Zittern geboren, welches aufstehen konnte und vom Besitzer mit der Flasche getränkt wurde. Über den Verbleib bzw. die Entwicklung dieses Lammes sind keine Informationen vorhanden.

3.3.6.5 Umrindern/ Umbocken

Als Umrindern bzw. Umbocken bezeichnet man wiederholte Brunstsymptome nach einer Bedeckung. Die Ursachen für dieses Symptom können zahlreich sein, u.a. Endometritiden, hormonelle Dysfunktionen, oder aber auch Störungen infolge einer BVDV-bzw. BDV-Infektion. Von den untersuchten Betrieben gaben sechs Rinderhalter gehäuftes Umrindern an. In einem Betrieb wurde ein halbes Jahr vorher ein PI-Tier diagnostiziert, in diesem Zeitraum traten vermehrt Fruchtbarkeitsprobleme auf. Die Ursache der Fruchtbarkeitsprobleme in den restlichen fünf Betrieben war unbekannt.

Zwei Schafhalter gaben an, Fruchtbarkeitsprobleme im Bestand zu haben. Einer der Besitzer führte dies auf schlechte Futterqualität zurück, dieser Landwirt hatte zudem weitere gesundheitliche Probleme im Bestand.

Tabelle 13: Anzahl der Betriebe mit dem Symptom „Umrindern/ Umbocken“,

Aufschlüsselung nach betroffener Tierart

Symptom	R	S
Umrindern/ Umbocken	6	2

3.3.6.6 Abort

Die Ursachen für Aborte sind ebenso wie beim vorgenannten Symptom sehr vielfältig und oft nicht eindeutig einer Kausalität zuzuordnen. In neun Betrieben wurden Fälle von Aborten angegeben, es konnten in sieben Fällen keine näheren Angaben zur Ursache gemacht werden, allerdings waren hier fast nur Einzeltiere betroffen. Zwei Betriebsleiter berichteten von Aborten in Zusammenhang mit einer bekannten BVDV-Infektion, hier waren jeweils mehrere Tiere betroffen.

Im Bereich der Schafhaltung wurde insgesamt acht Mal von Abortfällen berichtet. Vier Tierhalter gaben an, dass in ihrem Bestand sporadisch Aborte auftraten, die Abortursache war immer unbekannt. In einer weiteren Schafherde hatten neun der 31 Muttermiere aus unbekannten Gründen abortiert. Ein anderer Schafzüchter führte die Abortproblematik auf eine mangelhafte Futterqualität zurück, in einem weiteren Betrieb lag ein Chlamydienbefund vor, der als Abortursache angenommen wurde. Ein Schafzüchter mit 200 Tieren und vorberichtlichen Hinweisen auf eine BDV-Infektion gab an, dass bei ihm mehrere Mutterschafe pro Jahr abortieren. Weiterhin berichtete ein Ziegenzüchter von zwei Aborten bei seinen Ziegen im vergangenen Jahr, auch hier war die Ursache unbekannt.

Tabelle 14: Anzahl der Betriebe mit Abortproblematik,
Aufschlüsselung nach betroffener Tierart

Symptom	R	S	Z
Abort	9	8	1

3.3.6.7 Früh-/ Totgeburt

Im Unterschied zum Abort wird bei einer Frühgeburt eine lebensfähige Frucht relativ zeitnah zum Geburtstermin geboren; bei einer Totgeburt können neben infektiösen Ursachen auch andere Faktoren wie Geburtshindernisse, verzögerte Austreibung etc. zum Tod des Neugeborenen geführt haben. Bei der Befragung der Landwirte gaben jeweils 5 von ihnen an, dass dieses Symptom bei ihren Rindern bzw. Schafen aufgetreten war. Ein Landwirt berichtete von derartigen Problemen in Zusammenhang mit einer BVDV-Infektion; drei weitere Landwirte gaben keine näheren Ursachen an, allerdings hatten diese auch nur sporadische Fälle im Bestand. In dem Bestand mit 136 Rindern wurden pro Jahr etwa vier bis fünf Kälber tot geboren, allerdings war dies nur ein Symptom neben mehreren anderen gesundheitlichen Problemen in dem Bestand.

Bei den Schafherden wurde ebenfalls von fünf Tierhaltern von Früh- bzw. Totgeburten berichtet. Zwei Schafhalter schilderten sporadisch auftretende Fälle, es handelte sich hier um zwei kleine Herden mit 19 Schafen in Hobbyhaltung. Die drei anderen registrierten Fälle dagegen berichteten von sehr ausgeprägter Problematik, hier handelte es sich um mittelgroße Schafherden mit über 100 Tieren. In allen drei Betrieben wurde noch von anderen Fruchtbarkeitsproblemen wie Aborte, lebensschwache Jungtiere und Missbildungen berichtet. Als Ursache wurde in einem Betrieb eine nachgewiesene Infektion mit Chlamydien angenommen, in den anderen beiden Fällen war die Ursache unbekannt.

Tabelle 15: Anzahl der Betriebe mit Vorkommen von Früh- bzw. Totgeburten,
Aufschlüsselung nach betroffener Tierart

Symptom	R	S
Früh-/Totgeburt	5	5

3.3.6.8 Geburt lebensschwacher Jungtiere

In diese Kategorie wurden neben den lebensschwach geborenen Jungtieren auch kümmernde Jungtiere aufgenommen.

In acht der rinderhaltenden Betriebe wurden vorberichtlich lebensschwache Kälber geboren, in zwei Betrieben wurde dies mit einer BVDV-Infektion in Verbindung gebracht. In den anderen sechs Beständen wurden hierzu keine näheren Angaben getätigt.

Bei den Schafen wurden schwache und kümmernde Tiere häufig mit einem Milchmangel der Mutter, v.a. bei Mehrlingsgeburten, in Verbindung gebracht. In sechs Betrieben wurde dieser Grund angegeben, allerdings wurden hier auch nur sporadische Fälle gemeldet. Bei den sechs anderen Betrieben mit Schafhaltung handelte es sich um Betriebe, die neben lebensschwachen, kümmernden Lämmern weitere Bestandsprobleme wie Aborte und/ oder Frühgeburten hatten.

Bei den ziegenhaltenden Betrieben fielen drei in diese Gruppe. Zwei Betriebsleiter berichteten von lebensschwachen Jungtieren nur bei Zwillingsgeburten berichtet. In einem der beprobteten Milchziegenbetriebe wurden 2008 mehrere lebensschwache Ziegenlämmer mit struppigem Fell geboren, die kurz nach der Geburt an Durchfall erkrankten und z.T. verstarben.

Tabelle 16: Anzahl der Betriebe, in denen lebensschwache Jungtiere geboren wurden, Aufschlüsselung nach betroffener Tierart

Symptom	R	S	Z
Lebensschwache Jungtiere	8	12	3

3.3.6.9 Missbildungen

Unter Missbildungen wurden alle abnormen anatomischen Veränderungen bei neugeborenen Jungtieren erfragt. Hier wurden 14 Betriebe mit derartigen Problemen registriert. Den größten Anteil bildeten hier die Schafe (n=10), gefolgt von Rindern (n=3) und Ziegen (n=1). Bei den Schafen wurde dreimal angegeben, dass Jungtiere mit Halsdeformationen geboren wurden, die aufgrund der Trinkunfähigkeit starben. Weitere drei

Landwirte berichteten von Neugeborenen, die neben Hypognathie Abnormitäten in der Länge der Gliedmaßen besaßen. In einem Betrieb wurden 2006 zwei Lämmer ohne Augäpfel geboren, der Besitzer vermutete ein bestimmtes Wurmmittel als Ursache. Ein Schafhalter gab an, dass bei ihm Jungtiere mit Kiefermissbildungen geboren wurden, ein weiterer erwähnte, dass bei ihm etwa 5% der Lämmer mit verkürzten Hinterbeinen auf die Welt gekommen waren. Ein Schafzüchter mit 200 Schafen berichtete, dass er durchschnittlich fünf Lämmer pro Jahr bekäme, die Hypognathie, vorgewölbte Stirn, Skoliose und verkürzte Hinterbeine besäßen. Dies war derselbe Betrieb, der von einem Lamm berichtet hatte, das Border Disease-ähnliche Symptome zeigte.

Bei den Rindern wurden unterschiedliche Missbildungen angegeben: Je ein Fall von Arachnomelie, Hydrocephalus und ein totgeborenes Kalb mit Missbildungen, bei dem diese allerdings nicht genauer differenziert wurden. Bei dem einzigen Ziegenhalter, der angab, dass Missbildungen bei ihm vorkamen, wurde ein Ziegenlamm mit verkürztem Unterkiefer geboren.

Tabelle 17: Anzahl der Betriebe mit Missbildungen bei Neugeborenen, Aufschlüsselung nach betroffener Tierart

Symptom	R	S	Z
Missbildungen	3	10	1

3.3.7 IMPFUNG

Jeder Betrieb wurde weiterhin nach durchgeführten BVD- bzw. BD-Impfungen befragt. Bei erfolgter Impfung wurde das Datum bzw. in Fällen, in dem dies nicht mehr zu eruieren war, das Jahr vermerkt, in dem die Impfung durchgeführt wurde. Unter den reinen Schaf- und Ziegenbetrieben war keine Herde, die geimpft worden war. In den Mischbetrieben mit Rindern war in insgesamt acht Beständen (16%) geimpft worden, allerdings war hier nur ein Betrieb dabei, der innerhalb der letzten Jahre geimpft (2008) hatte, bei allen anderen Betrieben lag die Impfung mehr als sechs Jahre zurück.

3.4 PROBENMATERIAL

3.4.1 ANZAHL DER PROBEN PRO BETRIEB

Von jedem Betrieb wurden von jeder Tierart durchschnittlich zehn Tiere- bei kleineren Herden mindestens drei Tiere- geblutet. Die Tiere wurden zufällig aus dem Bestand ausgewählt, wobei darauf geachtet wurde, möglichst alle Altersgruppen eines Bestandes zu beproben. Ausgespart wurden Tiere jünger als 6 Monate, da möglicherweise vorhandene maternale Antikörper eine Zuordnung des Infektionszeitpunktes nicht erlauben.

Da in jedem Betrieb mehrere Tiere unterschiedlichen Alters serologisch untersucht wurden, konnten anhand der Ergebnisse Rückschlüsse auf eine aktuell bestehende bzw. früher stattgefundene Infektion gezogen werden. Sollten sich Hinweise auf eine aktuelle Pestivirusinfektion bzw. ein persistent infiziertes Tier ergeben haben, wurde nach Möglichkeit der gesamte Rinderbestand geblutet. Außerdem wurden bei einer aktuellen BVDV-Infektion der Rinder nochmals alle kleinen Wiederkäuer des Betriebes geblutet, um eventuelle sporadische Infektionen nachzuweisen. Lag die BVDV-Infektion längere Zeit zurück, wurden für diesen Zweck Proben von kleinen Wiederkäuern untersucht, die zu dem damaligen Zeitpunkt im Betrieb waren.

In einem Mischbetrieb, der mehrere persistent infizierte Kälber hielt, wurden über 16 Wochen alle Schafe im zweiwöchigen Rhythmus geblutet, die direkten Kontakt zu den Kälbern hatten. Die anderen Schafe dieses Betriebes, die keinen direkten Kontakt hatten, wurden alle acht Wochen geblutet. In zwei weiteren Betrieben wurden bei den Schafen ebenfalls Verlaufsuntersuchungen über einen längeren Zeitraum durchgeführt.

3.4.2 BLUTENTNAHME

Beim Rind erfolgte die Blutentnahme aus der V. coccygea oder in Ausnahmefällen aus der V. jugularis. Bei den Schafen und Ziegen wurden alle Proben aus der V. jugularis gezogen. Als Blutentnahmesystem für die Serologie wurden 10 ml-Serum-Röhrchen des Vacutainersystems der Firma Becton Dickinson mit Kanülen der Stärke 20g x 1 ½ benutzt. Weiterhin wurden 10 ml-Serum-Monovetten der Firma Sarstedt verwendet.

Für den Antigennachweis mittels FACS-Analyse und die PCR wurden ebenfalls Vacutainer-EDTA-Röhrchen der Firma Becton Dickinson und Sarstedt-EDTA-Monovetten verwendet. Pro Tier wurde ein mit der Betriebs- und Blutentnahmenummer beschriftetes Röhrchen befüllt. Parallel zur Entnahme wurde auf einer Liste die Blutentnahmenummer und die Ohrmarke des dazugehörigen Tieres vermerkt, so dass eine eindeutige Zuordnung der Blutproben gewährleistet war.

3.4.3 BEHANDLUNG UND ASSERVIERUNG DER BLUTPROBEN

Nach der Blutentnahme wurden die Proben in einer elektrischen Kühlbox transportiert und anschließend im Kühlschrank gelagert. Nach Abschluß der Gerinnung wurden die verschlossenen Blutentnahmegeräte 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und das Serum mit einer 1000 µl-Pipette unter sterilen Bedingungen in jeweils zwei sterile, mit der laufenden Labornummer beschriftete 1,5 ml Sarstedt-Röhrchen abgefüllt. Danach wurde die Qualität des Serums in vier Kategorien eingeteilt. Die Qualität wurde nach folgenden Kriterien festgelegt: Serumqualität gut (hellgelbe bis gelbe Farbe, klar), schwach hämolytisch (hellrote bis rote Farbe, transparent), hämolytisch (dunkelrot bis braun, flüssig), schlecht (dunkelbraun, flüssig bis zähflüssig).

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Seren bei -20 °C gelagert.

3.5 LABORUNTERSUCHUNGEN

Als *Screening*-Untersuchung wurde zunächst ein Antikörper-ELISA laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Schaf- und Ziegenproben wurde hierfür der BDV-Ak-Elisa der Firma Svanova verwendet, die Rinderproben wurden mit dem BVDV-Ak-ELISA der gleichen Firma untersucht. Außerdem wurde ein Teil der Proben zur Verifizierung des Svanova-ELISAs mit einem *Blocking*-ELISA der Firma Prionics untersucht. Bei Seren, bei denen Antikörper gefunden wurden, wurde zur Differenzierung ein Serumneutralisationstest mit drei verschiedenen Pestiviren durchgeführt. In einigen Mischbetrieben, bei denen aufgrund des ELISA-Ergebnisses der Rinder eine aktuelle BVDV-Infektion vermutet wurde, wurden alle

Rinder geblutet und diese Blutproben mit der FACS-Analyse auf das Vorhandensein von Antigen untersucht. Weiterhin wurde als direkter BVDV- bzw. BDV-Genomnachweis eine PCR durchgeführt, die unterschiedliche Sonden für BVDV-1, -2 und BDV enthielt und somit zur Genotypisierung vorhandener Pestiviren herangezogen werden konnte.

3.5.1 INDIREKTER BVDV-AB-ELISA

Für die Untersuchung der Rinderseren wurde der BVDV-Ab-ELISA der Firma Svanova verwendet. Bei diesem Test handelt es sich um einen indirekten, biphasischen ELISA, die 96-Loch-Mikrotiterplatten sind mit inaktiviertem BVDV-1-Antigen (Stamm: Osloss) beschichtet, an welches vorhandene Proben-Antikörper im Serum binden. Als Peroxidase-Konjugat wird anti-Rinder-IgG (monoklonale Antikörper) verwendet.

Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Nachdem alle Testreagenzien auf Zimmertemperatur gebracht worden waren wurde die *PBS-Tween*-Waschlösung (25 ml Konzentrat in 475 ml destilliertem Wasser gelöst) hergestellt und davon 90 µl in jedes *well* gegeben. Da es sich um einen biphasischen Test handelt, wurden jeweils 10 µl Probe in zwei *wells*- Testwell und Kontrolle- einpipettiert. Die mitlaufenden Positiv- und Negativkontrollseren wurden, ebenfalls im Doppelansatz, am Beginn und Ende des Probenauftrages aufpipettiert. Nach dem Probenauftrag wurde der Test eine Stunde bei 37° inkubiert werden. Anschließend wurde manuell gewaschen. Die gesamte Platte wurde hierzu entleert, mit jeweils 200 µl per *well* Waschlösung befüllt und die Flüssigkeit danach durch Ausklopfen gründlich entfernt; dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt. Anschließend wurde jeweils 100 µl Konjugat zugegeben. Dieses Konjugat bildete mit den gebundenen Rinder-Antikörpern einen Komplex, der nach einer weiteren Inkubationszeit von 60 min bei 37°C und einem dreimaligen Waschschritt mit dem zugegebenen Substrat reagiert. Von dem Substrat (Tetramethylbenzidin (TMB)/ Wasserstoffperoxid-Lösung) wurden pro Vertiefung 100 µl zugegeben und 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Stopplösung konnte eine auftretende Farbreaktion mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen werden. Von den gemessenen Werten der antigenbeschichteten *wells* werden die Werte der Kontroll*wells* abgezogen werden (=OD korrigiert). Die Validität des Tests berechnet sich aus den Mittelwerten der Kontrollseren: Das negative Kontrollserum darf einen Mittelwert von 0,15 nicht überschreiten während die Positivkontrollen einen Mittelwert über 1,00 erreichen müssen. Für die Auswertung werden die korrigierten Proben-OD-Werte durch den Mittelwert der korrigierten OD-Werte der

Positivkontrollen dividiert und mit 100 multipliziert werden. Die so erhaltenen Prozentwerte werden für die Auswertung herangezogen: Werte unter 10 sind negativ, zwischen 10 und 25 schwach positiv und über 25 positiv zu bewerten.

3.5.2 INDIREKTER BDV-AB-ELISA

Der verwendete BDV-Ab-ELISA ist ebenso wie der BVDV-Ab-ELISA ein indirekter, biphasischer ELISA. Der Test kann sowohl für Schaf- als auch für Ziegenseren verwendet werden. Für diesen ELISA werden die gleichen Platten verwendet wie für den BVDV-Ab-ELISA. Die Sensitivität beträgt laut Herstellerangaben für ovine Proben 94,3%, bei caprinen Seren wird die Sensitivität mit 100% angegeben. Die Spezifität liegt bei 93,7% (Schafproben) bzw. 100% (Ziege).

Die Durchführung des BDV-Ab-ELISAs erfolgte ebenfalls gemäß Herstellerangaben und verläuft analog zum BVDV-Ab-ELISA. Allerdings schreibt der Hersteller bei diesem Test vor, dass die Platte vor dem Probenauftrag dreimalig mit 200 µl Waschlösung gewaschen werden soll. Auch wird für diesen ELISA eine geringere Probenmenge von 4 µl pro well benötigt. Dazu werden 100 µl von der Waschlösung der Probeninkubation zugegeben. Die restlichen Schritte verliefen analog zum BVDV-Ab-ELISA.

Im Gegensatz zum BVDV-Ab-ELISA ist bei diesem ELISA kein Bereich definiert, in dem die Werte als schwach positiv angesehen werden: Werte unter 0,25 sind negativ, über 0,25 positiv bewertet.

3.5.3 BLOCKING-ELISA ZUM NACHWEIS VON PESTIVIRUS-NS3-ANTIKÖRPERN

In der Studie kam mit dem PrioCHeck BVDV-Ab-ELISA der Firma Prionics ein weiterer kommerziell erhältlicher ELISA zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um einen *Blocking*-ELISA, der derzeit für die Untersuchung von Rinderseren, nicht jedoch für Seren kleiner Wiederkäuer zugelassen ist. Laut Aussagen des Herstellers wurden bereits Untersuchungen von Schafseren durchgeführt und der Test ergab zufriedenstellende Ergebnisse. Der Test

eignet sich zum Nachweis von Pestivirus-Antikörpern im Serum, aber auch in Milchproben, wobei in diesem Projekt ausschließlich Serumproben untersucht wurden. Dieser Test erkennt Panpestivirus-Antikörper gegen das hoch konservierte NS3. In dem Test wird mit zwei monoklonalen Antikörpern gearbeitet, von denen einer als Beschichtung auf die Testplatte aufgebracht wurde. Nach der Zugabe von den Probenserien und Antigen wird ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper zugegeben, welcher an das im ersten Schritt gebundene Antigen bindet. Waren in der zu testenden Probe spezifische Antikörper vorhanden, konnten diese an das Antigen binden. Durch einen Waschschritt werden die Antikörper-Antigen-Komplexe entfernt, weshalb das Konjugat gegebenenfalls an verbleibendes, plattengebundenes Antigen bindet. Nach der Substratzugabe und der abschließenden Zugabe der Stopplösung werden auftretende Farbreaktionen mit einem Photometer gemessen. Bei Proben, in denen keine spezifischen Antikörper vorhanden sind, findet eine sehr starke Farbentwicklung statt, wohingegen seropositive Proben keine Verfärbung zeigen. Eine Titerbestimmung erfolgte mittels log4-Verdünnungsstufen. Diese gemessenen *Blocking*-Werte wurden gegen die jeweilige Verdünnung in ein Diagramm zur Plausibilitätsprüfung aufgetragen. Durch Interpolation der beiden Verdünnungswerte um den *cut off* von 50% *Blocking* wurde der Antikörpertiter errechnet.

Der Test wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Vor Beginn der Durchführung des ELISAs wurden alle Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht werden. Neben einer Waschlösung (Waschpuffer, Verdünnung 1:200 mit Aqua demin.) wurde eine Verdünnungslösung hergestellt (ein Teil Verdünnungspuffer mit vier Teilen Aqua demin.). Von dieser Verdünnungslösung wurden je 100 µl in die zwei Negativkontrollenwellen pipettiert, während von den drei Positivkontrollenserien im Doppelansatz jeweils 50 µl aufgetragen wurden. Anschließend wurden je 50 µl Probenserum und, mit Ausnahme der Negativkontrollen, überall 50 µl inaktiviertes Antigen zugegeben. Danach wurde die Platte eine Stunde lang abgedeckt bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Inkubat wurde abgeschüttet und die Platte insgesamt sechs Mal mit jeweils 200 µl Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Flüssigkeit durch Ausklopfen gründlich entfernt. Anschließend wurde der mit Meerrettichperoxidase konjugierte zweite mAK zugegeben und wiederum unter den gleichen Bedingungen wie im vorherigen Schritt inkubiert. Das Konjugat wird bei diesem Test jeweils frisch mit rekonstituiertem Pferdeserum adsorbiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde wiederum sechs Mal gewaschen, bevor jeweils 100 µl Substrat (Tetramethylbenzidin (TMB)/ Wasserstoffperoxid-Lösung) aufgetragen und 15 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung (einmolare Salzsäure) beendet und die Platte innerhalb von max. 15 Minuten in einem *Sunrise Touchscreen* (Tecan) Photometer mit der Magellan (Tecan) Software gemessen. Die Auswertung wurde mit Microsoft Excel durchgeführt.

3.5.4 PCR

Eine differenzierende *Real time* RT-PCR wurde im Rahmen der Studie hauptsächlich für die Genotypisierung der Pestiviren in Blutproben bekannt virämischer Rinder verwendet. In einem Schafbetrieb, in dem die ELISA-Untersuchung Hinweise auf eine BDV-Infektion ergeben hatte, wurden alle vorhandenen Schafblutproben ebenfalls mittels PCR untersucht. Es wurde eine kommerzielle Multiplex-PCR (cador BVDV Type 1/2 RT-PCR, Qiagen) verwendet, die die hochkonservierte Sequenz der 5' UTR (untranslated region) amplifiziert und aufgrund verschiedener Sonden zwischen dem BVDV-Genotyp1 bzw. 2 und dem BDV unterscheiden kann.

Die RNA-Extraktion erfolgte aus isolierten Blutleukozyten. Diese wurden durch Ammoniumchloridlyse gewonnen. 1 ml Vollblut wurde mit 5ml 4°C kaltem Lysepuffer (8,29 g/l NH₄Cl, 1,0 g KHCO₃ und 1mM EDTA in A. demin.) vermischt, nach der Lyse der Erythrozyten für 5 min bei 1700 *rpm* (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 5ml Lysepuffer resuspendiert, nochmals zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Leukozyten wurden mit 5ml PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und bei 1700 *rpm* 3min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde sofort getestet bzw. bis zur Testung bei -80 °C tiefgefroren.

Zur Aufreinigung der viralen RNA wurde das High Pure Viral RNA Kit (Roche) bzw. NucleoSpin Virus Kit (Macherey-Nagel) entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt. Das High Pure Viral RNA Kit wurde manuell bearbeitet, das NucleoSpin Kit wurde auf einem Starlet-Pipettierroboter (Hamilton) prozessiert. Das Elutionsvolumen betrug 50µl (manuell) bzw. 100µl (Roboter). In die PCR wurden jeweils 5µl als *Template* eingesetzt. Reaktionsansatz und Temperaturprofil wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In jedem Lauf wurden drei Positivkontrollen (BVDV-1, BVDV-2 und BDV) sowie eine *Non-template*-Kontrolle mitgeführt.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Arbeitsschritte der Leukozytenisolierung, der RNA-Aufreinigung, der Herstellung des PCR-*Mastermix* und das Ansetzen der PCR-Reaktion räumlich und arbeitstechnisch getrennt durchgeführt. Die *real time* PCR wurde mit einem Mx3005P™ QPCR System (Stratagene) durchgeführt und die Ergebnisse mittels Mx Pro™ QPCR Software (Stratagene) bei manueller Festlegung des *Threshold* ausgewertet.

3.5.5 PESTIVIRUS-NS3-ANTIGENNACHWEIS MITTELS FACS-ANALYSE

Der Nachweis einer Leukozyten-assoziierten Virämie erfolgte mit Vollblutproben, die mit EDTA stabilisiert waren. Zur Detektion wurden die Panpestivirus-reaktiven monoklonalen Antikörper WB103 und WB105 verwendet. Die Messung erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie.

Zu Beginn des Tests wurden jeweils 50 µl Positivkontrolle und zu testende Proben im Doppelansatz in eine 96-Loch-Platte pipettiert und die Erythrozyten mit 150µl Hämolysepuffer lysiert. Die Platte wurde im Kühlschrank zwei Minuten lang inkubiert, bevor sie eine Minute bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurde. Als Zentrifuge wurde die Sepatech Megafuge von Heraeus verwendet. Nach Abkippen des Überstandes und einem Waschschritt mit 200 µl PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺ wurde erneut eine Minute bei 2000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Leukozyten durch Zugabe von 100µl 1%iger Paraformaldehydlösung fixiert und nach einer zehnminütigen Einwirkzeit im Kühlschrank erneut mit 100 µl PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden 100µl Digitoninlösung (0,0025%ig in PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺) zugegeben und die Platte für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nach einem Waschschritt mit 100 µl PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺ 50 µl des primären Antikörpers (WB 103/105, CVL Weybridge; Verdünnung 1:500 in PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺) aufpipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 150 µl FACS-Puffer zugegeben, die Platte bei 2000 U/min eine Minute lang zentrifugiert, der Überstand dekandiert und nochmals mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Nach diesem Schritt wurden 50 µl des sekundären Antikörpers (AlexaTM 488-markiertes anti-Maus-Konjugat) in einer 1:1000 Verdünnung in PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺ zugegeben, die Inkubationszeit betrug bei diesem Schritt 20 Minuten. Nach einem weiteren Waschschritt mit 150 µl FACS-Puffer wurde die Platte zentrifugiert, der Überstand verworfen und nochmals mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Propidiumjodidlösung (P4170, Sigma) in einer Verdünnung von 0,005% in PBS ohne Mg²⁺ / Ca²⁺ zugegeben. Die Leukozyten wurden mit einem Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson) gemessen. Dazu wurden mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht und Zellkernfluoreszenz (Propidiumjodid) jeweils Kluster der Lymphozyten und der Monozyten plus neutrophile Granulozyten gebildet. Für beide Kluster wurden Histogrammauswertungen der indirekten NS3-Immunfluoreszenz und der Konjugat-Kontrollansätze durchgeführt. Zeigte

sich in mindestens einem der beiden Kluster bei mehr als 1% der Zellen eine spezifische Pestivirus-NS3-Fluoreszenz, so wurde die Probe als positiv bewertet.

3.5.6 ZELLKULTUR

Für die Serumneutralisationsteste wurden fetale bovine pharyngeale Zellen der Linie KOP-R (Friedrich Löffler Institut, Insel Riems) verwendet. Die Zellen wurden in *Minimum Essential Medium* (mit Zusatz von nicht-essentiellen Aminosäuren, NaHCO_3 8,8%, 300000 E/l Penicillin, 200 mg/l Streptomycin) mit dem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert und regelmäßig im Verhältnis 1:2 geteilt. Die Zellen wurden in 80 ml-Zellkulturflaschen bei 37°C im Brutschrank gehalten. Sie wurden regelmäßig makroskopisch beurteilt, nach Bildung eines konfluenten Zellrasens wurden sie mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und mit Hilfe von Saline-Trypsin-Versene-Lösung (STV) abgelöst. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die abgelösten Zellen in frisches Medium suspendiert und mit 70 ml Medium in die Zellkulturflaschen gegeben. Für die Neutralisationsteste wurde die 33. Passage genommen und aus dieser Ausgangspassage Zellen bis zur maximal 43. Passage für den SNT verwendet.

3.5.7 SERUMNEUTRALISATIONSTEST (SNT)

Der Serumneutralisationstest wurde zur Bestätigung der Kreuzneutralisation und zur Überprüfung der ELISA-Ergebnisse eingesetzt. Er gilt als der Goldstandard für den Antikörpernachweis. Für die Durchführung der Serumneutralisationsteste wurden verschiedene Virusstämme verwendet: BVDV-Typ1c (Stamm: PT 810), BVDV-Typ2 (Stamm: CS 8644) und BDV-Typ2 (Chemnitz 27/99). Außerdem wurde aus einem persistent infizierten Rind eines Mischbetriebes Virus isoliert und für homologe Neutralisationsteste mit Schafseren aus diesem Bestand verwendet. Das Isolat wurde mit BVDV-1-Wilma benannt.

Für alle Virusstämme wurde die Rinderzelllinie KOP-R verwendet. Dem Medium (MEM mit 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, NaHCO_3 8,8%, 300000 E/l Penicillin, 200 mg/l Streptomycin) wurden 10% Serum eines geprüft Pestivirus-naiven Bullen der Besamungsstation München-Grub zugesetzt. Das Bullenserum und alle verwendeten Proben wurde bei 56°C 30 Minuten lang inaktiviert. Die Seren wurden im Dreifachansatz in log2-Verdünnungsstufen getestet.

Dazu wurden 96-well-Platten bis auf die erste Reihe komplett mit jeweils 50 µl Medium beschickt. In die freibleibende erste Reihe wurde jeweils 100 µl Probenserum im Dreifachansatz pipettiert. Anschließend erfolgte ein Verdünnungsschritt mit einer Mehrkanalpipette; es wurden in jeder Reihe 50 µl Flüssigkeit aufgenommen und in der nächsten Reihe 6-mal suspendiert. Nach der letzten Reihe wurden 50 µl verworfen. Nach dem Verdünnen wurden 50 µl Virus in der Gebrauchsverdünnung von 10^2 KID₅₀ in jedes well zugegeben, bevor der Test eine Stunde bei 38 °C und 5% CO₂ inkubiert wurde. Nach Ablauf der Stunde wurden jeweils 100 µl Zellsuspension zugegeben und die Platten anschließend für 4 Tage im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Bei jedem durchgeführten Test lief für jedes verwendete Virus eine Kontrolle mit, die neben einem bekannten Positiv- und Negativkontrollserum auch eine Rücktitration der Virus-Gebrauchsverdünnung enthielt. Ferner enthielt diese Platte eine Zellkontrolle. Die Rücktitration wurde in sieben log4-Verdünnungsstufen in jeweils 6 wells angelegt, weitere 6 wells enthielten die Zellkontrolle. Als Kontrollen wurden laborinterne Positiv- und Negativseren im Dreifachansatz titriert.

Nach vier Tagen wurden die Zellkulturen mit indirekter Immunfluoreszenz analog zur Leukozytenfärbung wie oben beschrieben gefärbt (Kapitel 3.5.5). Die gefärbten Zellkulturen wurden innerhalb von drei Tagen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena) ausgewertet. Die Neutralisationstiter der Seren wurden in Anlehnung an die Methode nach Behrens und Kaerber berechnet:

Neutralisationstiter (-log 2) = b/a+ c

a = negative Reagenzien des Testserums

b = Anzahl der Reagenzien pro Verdünnungsstufe

c = -log2 einer evtl. Vorverdünnung des Testserums

Zur besseren Vergleichbarkeit von Neutralisationstitern individueller Teste wurde eine Anpassung an die Infektionsdosis vorgenommen: Bei Verdoppelung der KID₅₀ wurde der SNT-Titer um eine halbe log2-Stufe nach oben korrigiert. Hierzu wurde das Ergebnis der Rücktitration des Testvirus mit 10^{2+x} dargestellt und der Korrekturfaktor $k = x/0,6021$ errechnet. Der korrigierte Titer wurde mit $1:2^{a+k}$ angegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 VIRUSNACHWEISE

4.1.1 TYPISIERUNG VON PESTIVIREN AUS BAYERISCHEN RINDERN MITTELS *REAL TIME RT-PCR*-SONDEN

Insgesamt wurden 325 von Rindern stammende Isolate typisiert. Es wurden überwiegend Vollblutproben zur Untersuchung herangezogen, in drei Fällen erfolgte die Untersuchung aus isolierten Leukozyten, in zwei weiteren Fällen standen Zellkulturüberstände als Probenmaterial zur Verfügung. Zur Überprüfung der PCR wurde ein Kontrolllauf mit bekannten Virusstämmen durchgeführt. Für den Kontrolllauf wurde Zellkulturmateriel von BVDV-1, BVDV-2, BDV-1, -2 und -3 verwendet. Folgende Stämme wurden getestet:

- BVDV-1: CR4043^{*}, NADL (Mendez et al., 1998), OregonC24V, PT810*, SE1015*
- BVDV-2: CS8644*, US890
- BDV-1 (6/87)**, BDV-2 (Chemnitz 27/99)**, BDV-3 (Gifhorn)**

* hierbei handelt es sich um Isolate des Institutes (Wolfmeyer et al., 1997)

** Stämme, die vom Friedrich Löffler Institut, Insel Riems bezogen wurden

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 18 zusammengefasst, bei den bovinen Genotypen 1 und 2 wurden die Mittelwerte der CT-Werte der untersuchten Virusstämme angegeben.

Tabelle 18: Übersicht über die CT-Werte der Kontrollstämme,
bei BVDV-1 und BVDV-2 Angabe der Mittelwerte

Genotyp	Panpesti	BVDV-2	BDV
BVDV-1	16,16	Kein CT	Kein CT
BVDV-2	19,25	18,85	Kein CT
BDV1	25,0	Kein CT	23,8
BDV2	30,6	Kein CT	30,1
BDV3	18,3	Kein CT	18,9

In den 325 untersuchten Proben wurde 297-mal (91,4%) der BVDV-Genotyp-1 und 28-mal (8,6%) der BVDV-Genotyp-2 nachgewiesen. Das Border Disease Virus konnte in keiner Probe detektiert werden, somit liegt die Vorkommenshäufigkeit von BDV statistisch betrachtet bei Rindern unter 1% (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=5\%$).

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte aller CT-Werte der 325 Rinderisolaten aufgelistet, weiterhin ist der minimal und der maximal erreichte Wert angegeben. Der Mittelwert aller Genotyp 1-Isolate lag bei 27,5, bei den Genotyp 2-Isolaten lag dieser Wert bei 27,58. Die Minima und Maxima lagen bei 21,5 (BVDV-1) und 17,63 (BVDV-2), bzw. bei 40,28 (BVDV-1) und 33,9 (BVDV-2).

Tabelle 19: Ergebnisse der Genotypisierung

CT-Werte Panpesti-, BVDV-2- und BDV, Angabe des Mittelwertes aller CT-Werte, Minimum und Maximum

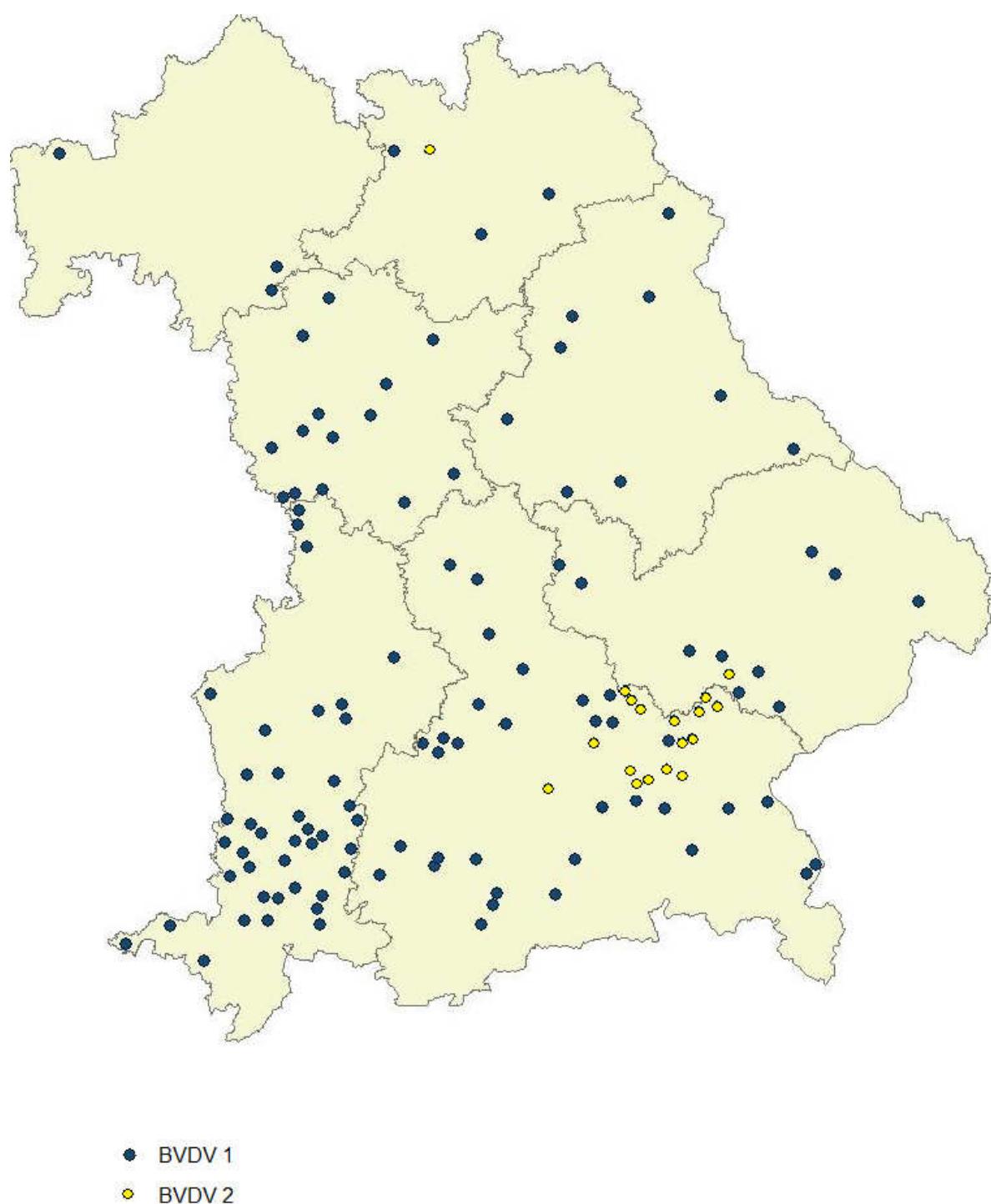
Genotyp	N	Panpesti-Sonde			BVDV-2-Sonde			BDV-Sonde
		MW	Min	Max	MW	Min	Max	
BVDV-1	297 (91,4%)	27,5	21,5	40,28	-	-	-	-
BVDV-2	28 (8,6%)	28,47	18,36	35,15	27,58	17,63	33,9	-

4.1.2 ÜBERSICHT ÜBER DIE VERTEILUNG DER BVDV-GENOTYPEN 1 UND 2 IN BAYERN

Die geografische Herkunft der genotypisierten Rinderisolaten ist in Abbildung 7 dargestellt. Wie aus der Verteilung ersichtlich wird, stammt der überwiegende Teil der Proben aus dem südlichen Schwaben sowie den nördlich und östlich von München liegenden Landkreisen. Aus dem Norden Bayerns konnten nur sehr geringe Probenzahlen untersucht werden. Aussagen über die Verteilung der beiden BVDV-Genotypen lassen sich daher nicht für Gesamtbayern machen, sondern vornehmlich für die beiden Regionen mit hoher Probendichte. In Abbildung 7 sind die Isolate anhand der Postleitzahlen der Betriebe der Herkunftsregion zugeordnet worden. Bei Vorliegen von mehreren Fällen in einem Postleitzahlbereich wurden diese in der Grafik in einem Punkt zusammengefasst.

Abbildung 7: Übersicht über Ergebnisse der Genotypisierung der Rinderisolale

Verbreitung BVDV-1 (n=297), BVDV-2 (n=28) und BDV (n=0) in ausgewählten Betrieben in Bayern,



Aus fünf Betrieben, in denen ein BVDV-2 nachgewiesen wurde, wurden mehrfach Proben von verschiedenen persistent infizierten Tieren eingeschickt. Somit wurden insgesamt 21 Betriebe ermittelt, in denen der Genotyp 2 vorhanden war. Die regionale Zuordnung der BVDV-2-Isolate ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Betriebe mit BVDV-Genotyp-2, Zuordnung zum Landkreis

Landkreis	Anzahl der Betriebe mit BVDV-Genotyp-2
Dachau	2
Freising	1
Erding	4
Mühldorf am Inn	11
Rosenheim	1
Rottal-Inn	1
Bayreuth	1

Auffällig sind die verhältnismäßig vielen Genotyp-2-positiven Proben aus dem Landkreis Mühldorf am Inn. Insgesamt wurden Proben von 18 Betrieben aus elf Gemeinden, Märkten bzw. Städten untersucht. In sieben Betrieben wurde der Genotyp-1 und in elf der Genotyp-2 nachgewiesen. Dies entspricht einem regionalen Anteil des Genotyp-2 von 61%. Aus dem Nachbarlandkreis Erding wurden ebenfalls aus 18 Betrieben Stämme genotypisiert: 14 Betriebe waren mit Genotyp-1, vier mit Genotyp-2 (22%) belastet. Die beiden im Landkreis Rosenheim und Rottal-Inn gefundenen Genotyp-2-Stämme stammen aus Betrieben, die in unmittelbarer Nähe (Entfernung unter 5 bzw. 10km Luftlinie) zu Genotyp-2-positiven Betrieben im Landkreis Mühldorf am Inn liegen. Aus den weiteren benachbarten ober- und niederbayrischen Landkreisen standen nur wenige Proben zur Verfügung, so dass sich hier keine Aussage über eine mögliche Prävalenz des BVDV-2 machen lässt.

Der Großteil der untersuchten Blutproben stammte aus den Allgäuer Landkreisen. Es konnte in keiner Probe ein BVD-Virus des Genotyps 2 nachgewiesen werden, so dass man in dieser

Region von einer sehr geringen Verbreitung oder der Abwesenheit dieses Genotyps ausgehen kann.

4.1.3 AUSSCHLUSS VON PESTIVIREN BEI KLEINEN WIEDERKÄUERN IN VERDACHTSBETRIEBEN MITTELS PCR

Im Rahmen des Projektes wurden Blute von 50 Schafen aus einem Schafbetrieb (Nr. 15) virologisch untersucht; bei den übrigen Betrieben lagen aufgrund der serologischen Ergebnisse keine Hinweise vor, dass eine persistente Virusinfektion bei den kleinen Wiederkäuern vorliegen könnte. Die Proben wurden in Zehnerpools zusammengefasst und mit der differenzierenden Cador-PCR untersucht. In keinem Pool wurden Pestiviren nachgewiesen.

4.1.4 NACHWEIS PERSISTENT INFIZIERTER RINDER IN VERDACHTSBETRIEBEN MITTELS LEUKOZYTEN-IMMUNFLUORESZENZ

In vier Betrieben konnten Antigenteste zur Findung persistent infizierter Rinder vorgenommen werden. Von einem Betrieb (Nr. 73) wurden alle Jungrinder bis zum Alter von 24 Monaten geblutet und die Leukozyten auf Pestivirus NS3 untersucht. Des Weiteren wurde über den Zeitraum von einem Jahr von jedem neugeborenen Kalb (n=37) innerhalb der ersten drei Lebenstage Vollblut entnommen und zur Untersuchung eingesandt. Hierbei wurde bei fünf Tieren ein positives Ergebnis des Antigentestes ermittelt. In einer weiteren Antigen-Untersuchung im Abstand von drei Wochen konnten alle fünf Tiere als persistent infiziert identifiziert werden.

In einem weiteren Betrieb (Nr. 10) mit 101 Rindern wurden ebenfalls komplett alle Rinder geblutet und die Seren zuerst mit dem Svanovir BVDV-Ab-ELISA untersucht. Alle Jungrinder

bis zum Alter von 24 Monaten, die seronegativ waren, wurden mit der FACS-Analyse untersucht. Im Zuge dieser ersten Bestandsuntersuchung wurden keine virämischen Tiere gefunden, allerdings wurden auch von diesem Betrieb über den Zeitraum von einem Jahr alle Kälber (n=49) innerhalb der ersten drei Tage geblutet. Im Verlauf des Jahres wurden in diesem Betrieb acht Antigen-positive Kälber identifiziert, alle wurden durch eine zweite Untersuchung im Abstand von mehr als drei Wochen als persistent infiziert diagnostiziert.

Von den Betrieben 21 und 61 wurden jeweils zwei bzw. eine Probe von Rindern untersucht, die den Landwirten als persistent infizierte Tiere bekannt waren. Nach der Bestätigung des positiven Ergebnisses in allen drei Fällen wurden Blutproben dieser Tiere für die Genotypisierung herangezogen. Es handelte sich um BVDV-1.

4.2 NACHWEIS VON PESTIVIRUS-ANTIKÖRPERN BEI KLEINEN WIEDERKÄUERN

4.2.1 ERGEBNISSE ZUR BEURTEILUNG DER EIGNUNG DER ELISAS FÜR BLUTE VON KLEINEN WIEDERKÄUERN

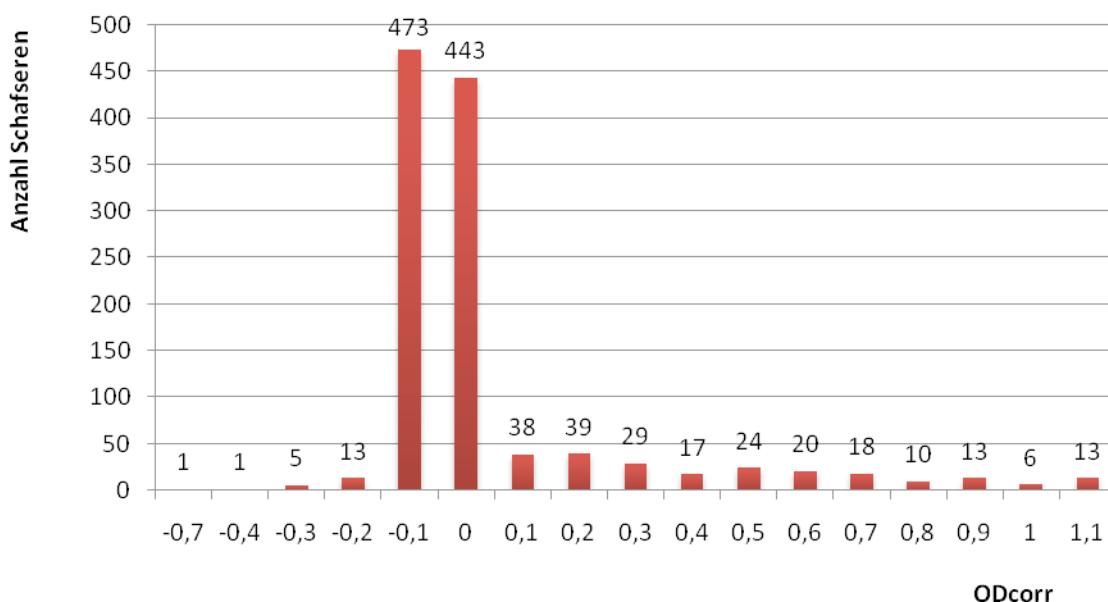
4.2.1.1 Indirekter ELISA

Mit dem indirekten ELISA (Svanovir BDV-Ab-ELISA) wurden insgesamt 1666 Seren kleiner Wiederkäuer untersucht, darunter waren 1163 Schaf- und 503 Ziegenserien. In den folgenden Abbildungen werden die Schaf- und Ziegenergebnisse separat vorgestellt. Abbildung 8 zeigt die Gesamtheit aller getesteten Schafserien. Bei Seren, die im Doppelansatz getestet wurden, wurden die Mittelwerte für die Auswertung herangezogen. Einige Schafe wurden im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen mehrfach in bestimmten Zeitabständen beprobt, in diesen Fällen wurden alle Einzelergebnisse in die Grafik mit einbezogen. Gemäß den Herstellerangaben liegt der *cut off* dieses Testes bei einer *ODcorr* von 0,25. Bei diesem Test ist, anders als bei dem BVDV-Ab-ELISA, kein schwach positiver Bereich definiert worden. Bei den *ODcorr*-Werten der Schafserien fällt auf, dass die negativen Werte hauptsächlich im Bereich zwischen -0,1 und 0,1 liegen; rund 79% (n=916) der Seren fallen in diese Kategorie. Bei 20 Seren wurde vermutlich aufgrund einer unspezifischen Bindung im Ansatz mit dem Kontrollantigen ein *ODcorr*-Wert von kleiner -0,1

erzielt. Insgesamt 77 Werte liegen zwischen 0,1 und 0,2, 150 Seren (12,9%) sind als Antikörper positiv identifiziert worden. Bei diesen Werten ist kein bestimmtes Verteilungsmuster erkennbar. Für die oberhalb des *cut off* liegenden ELISA-Daten der Schafproben wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Die Annahme der Normalverteilung auf einem Signifikanzniveau von 5% kann nicht verworfen werden ($p=0,1429$).

Abbildung 8: Indirekter ELISA (Svanovir BDV-Ab-ELISA)

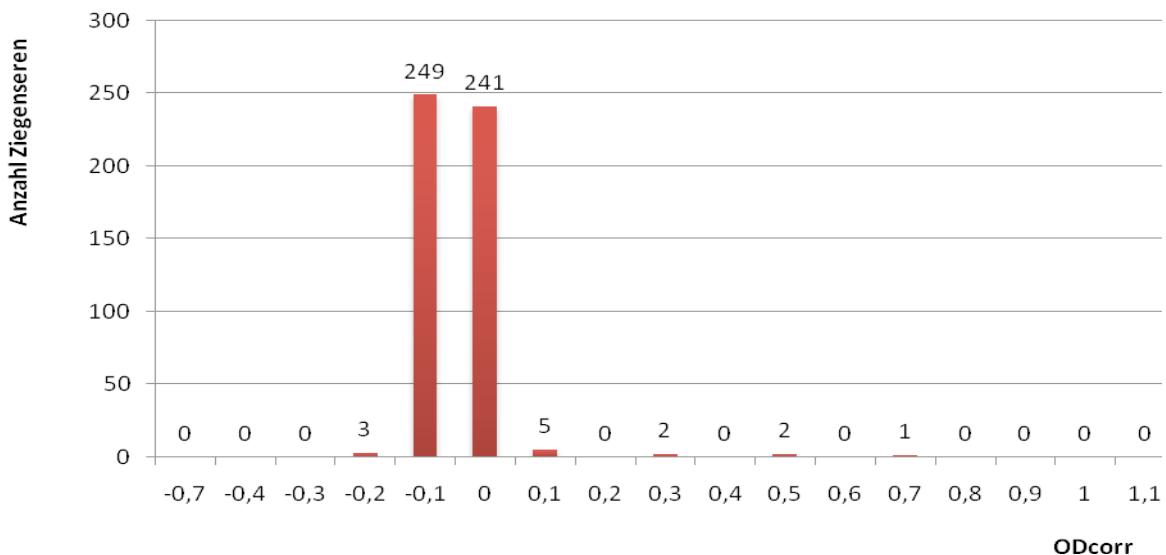
ODcorr-Werte der Schafseren (n=1165)



Bei den OD-Werten der Ziegenserien zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Ergebnissen der Schafserien. Der überwiegende Teil (79%) der untersuchten Seren liegt im negativen Bereich zwischen -0,1 und 0. Weiterhin liegen drei Seren im Wertebereich zwischen -0,1 und -0,2, fünf weitere liegen zwischen 0 und 0,1. Insgesamt wurden nur fünf positive Seren gefunden, der höchste Wert liegt hier bei 0,7.

Abbildung 9: Indirekter ELISA (Svanovir BDV-Ab-ELISA)

ODcorr-Werte der Ziegenserien (n=503)



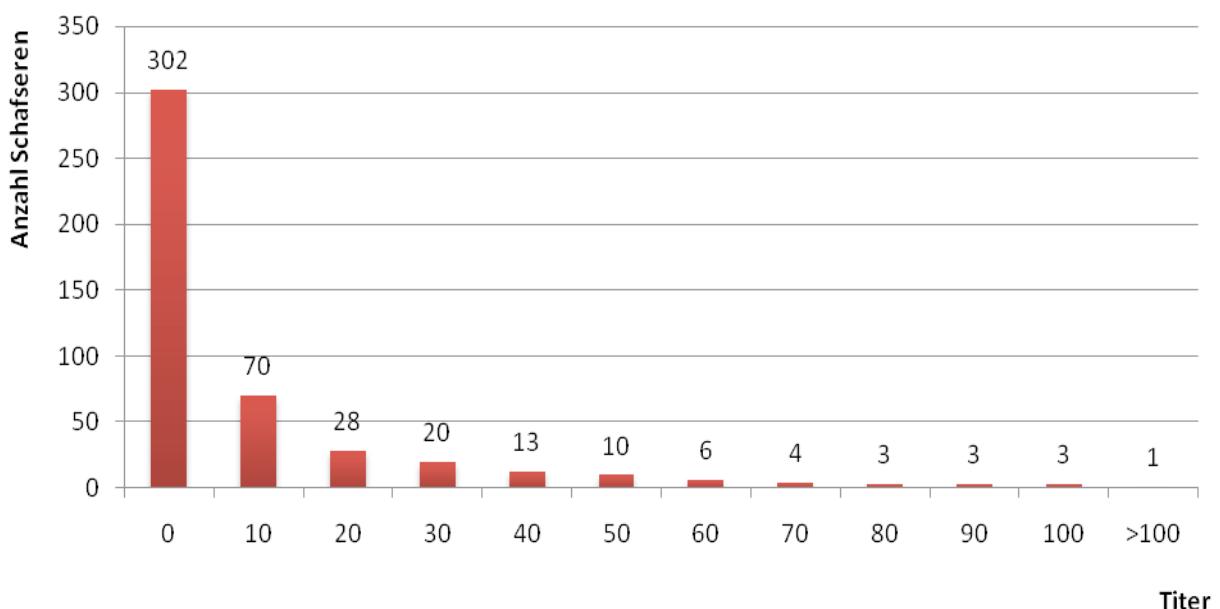
4.2.1.2 *Blocking*-ELISA

Mit dem *Blocking*-ELISA (Priocheck BVDV-Ab-ELISA) wurden 463 der insgesamt 1663 Schafseren und 401 der 503 Ziegenserien untersucht. Bei diesem Test wurden die Seren titriert und die erhaltenen *Blocking*-Ergebnisse in Titer umgerechnet. Alle negativen Ergebnisse sind in den folgenden beiden Abbildungen unter dem Titer „0“ zusammengefasst worden, bei den positiven Seren ist der errechnete Grenztiter für 50% *Blocking* angegeben. Analog zum Svanovir BDV-ELISA ist mit 65% bei den Schafen (n=302) bzw. 98,5% bei den Ziegen (n=395) der Anteil der seronegativen Tiere höher als der Anteil positiver Tiere.

Wie aus Abbildung 10 ersichtlich ist, liegen die Titer der positiven Schafseren hauptsächlich im niederen Bereich, der höchste Titer lag bei 127. In dieser Darstellung sind ebenso wie im vorigen Kapitel bei Verlaufsuntersuchungen die Einzelwerte der unterschiedlichen Probennahmen mit aufgeführt.

Abbildung 10: Priocheck BVDV-Ab-ELISA

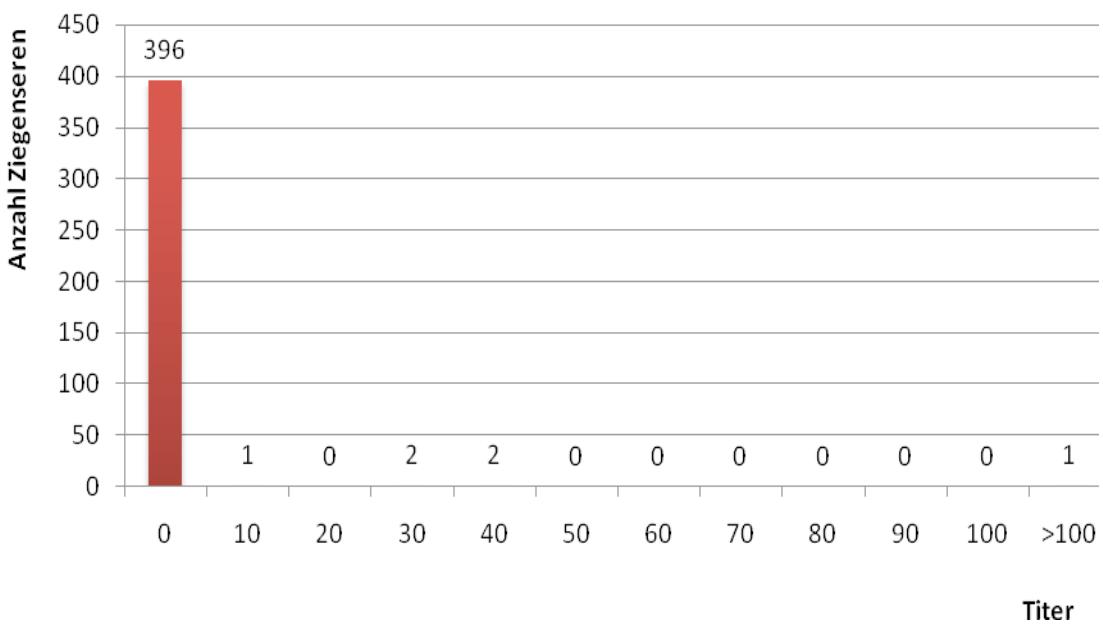
Titer Schafseren (n=463)



Insgesamt wurden 401 Ziegenserien mit dem *Blocking*-ELISA untersucht. Hier wurden sechs seropositive Tiere gefunden, die negativen Ergebnisse wurden in Abbildung 11 analog zu den Schafwerten unter dem Wert 0 zusammengefasst.

Abbildung 11: Priocheck BVDV-Ab-ELISA

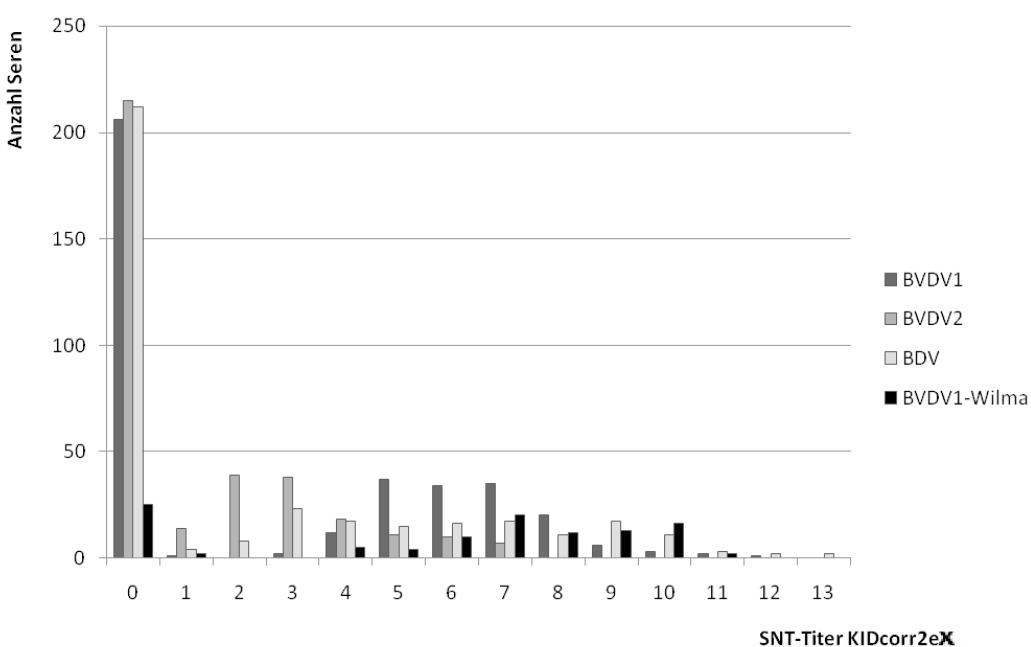
Titer Ziegenserien (n=401)



4.2.1.3 Serumneutralisationstest

Alle Schaf- und Ziegenserien, die in den ELISAs als positiv eingestuft wurden, wurden mit Neutralisationstesten differenziert bzw. die Ergebnisse validiert. Außerdem wurden mit den SNTs Seren aus Mischbetrieben untersucht, in denen bei den Rindern Pestivirus-Antikörper oder Pestivirus nachgewiesen wurden. Im BVDV-1-SNT wurden insgesamt 359, im BVDV-2-SNT 352 und im BDV-SNT 358 Schafserien untersucht. Von den Ziegenserien wurden 401 Seren ebenfalls in den drei SNTs untersucht. Weiterhin wurden im Rahmen der Verlaufsuntersuchungen in einem Betrieb 109 Schafserien im SNT untersucht, der mit dem aus dem Betrieb isolierten BVDV-1 „Wilma“ angesetzt wurde. Die Ergebnisse sämtlicher SNT-Untersuchungen der Schafserien sind in Abbildung 12 dargestellt. Bei wiederholten Untersuchungen eines Serums wurde der geometrische Mittelwert für die grafische Darstellung herangezogen, alle Einzelwerte der Verlaufsuntersuchungen sind ebenfalls mit einbezogen worden. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, liegen die Titer der BVDV-1-SNTs hauptsächlich im Bereich von 2^5 bis 2^8 , die des BVDV-2-SNTs dagegen gehäuft im Wertebereich 2^2 und 2^3 . Die Titer des BDV-SNTs verteilen sich annähernd gleichmäßig über die Wertebereiche 2^3 bis 2^{10} .

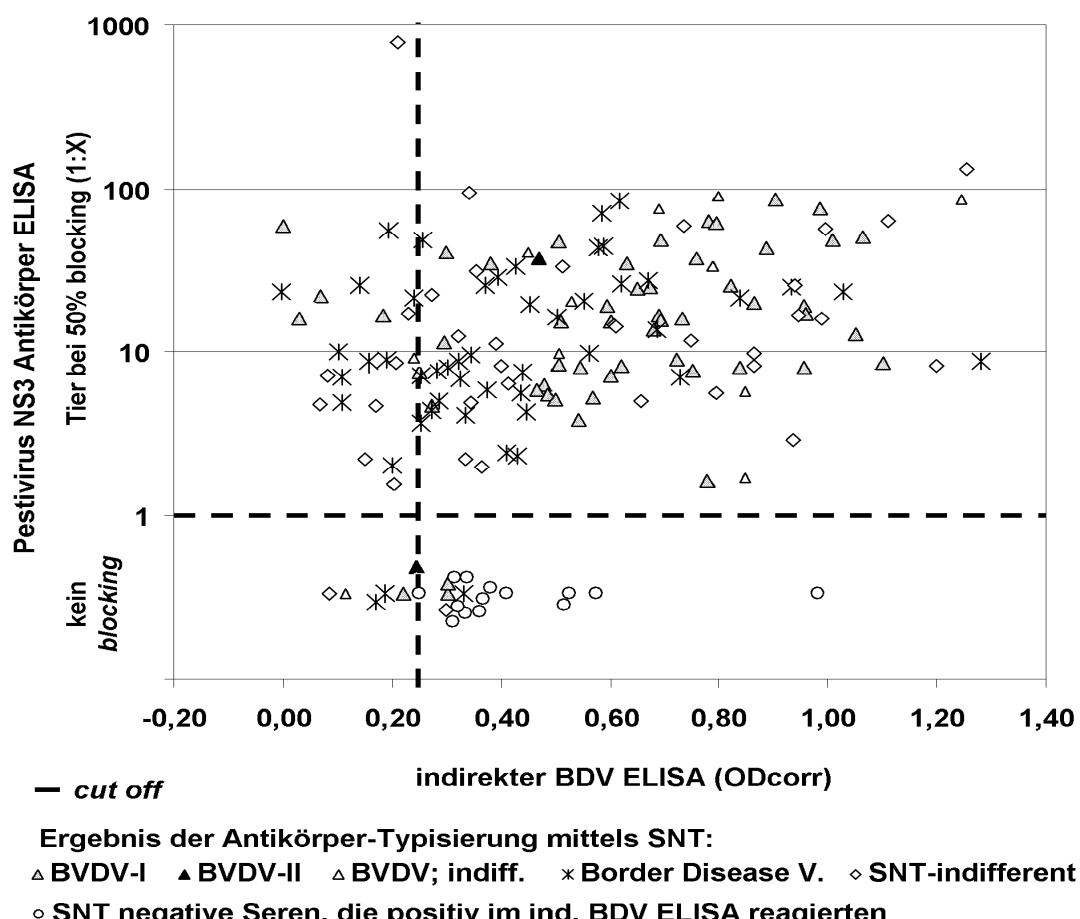
Abbildung 12: Übersicht über alle SNT-Ergebnisse (Schafserien),
Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit des verwendeten Virus (BVDV-1, BVDV-2, BDV,
BVDV-1-Wilma)



4.2.2 VERGLEICH DER DREI TESTPRINZIPIEN, DIE FÜR ANTIKÖRPERNACHWEISE IN SEREN KLEINER WIEDERKÄUER VERWENDET WURDEN

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der SNTs als Goldstandardmethode mit den beiden ELISAs näher betrachtet. In Abbildung 13 sind die Werte der aller Schafseren zusammengestellt, die in mindestens einem Test ein positives Resultat erzielten.

Abbildung 13: Abbildung aller Schafseren, die in mindestens einem Test positiv reagierten
 Zuordnung der Datenpunkte zu SNT-Ergebnissen durch verschiedene Symbole: BVDV-1, BVDV-2, BVDV(n. näher differenziert/ kein BDV), BDV, indifferent, SNT-negative Seren,



Aus Abbildung 13 wird deutlich, dass 11 SNT-positive BDV-Seren im indirekten ELISA als falsch negativ gemessen wurden, ebenso fünf BVDV-1-, ein BVDV- und acht indifferente Pestivirus-Antikörper-haltige Proben. Insgesamt fünf Seren wurden sowohl vom indirekten als auch vom *Blocking*-ELISA als falsch-negativ ausgegeben, darunter ein BVDV-1- und jeweils zwei BDV- bzw. indifferente Proben.

Der indirekte ELISA qualifizierte 14 Schafseren der insgesamt 200 im SNT negativen Seren als falsch positiv, während 25 der 128 positiven Seren als falsch negative Ergebnisse ausgegeben wurden. Somit sind vom indirekten ELISA 103 Schafseren als richtig seropositiv erkannt worden, ebenso wurden 93,0% aller negativen Seren als solche erkannt.

Auch im Priocheck BVDV-Ab-ELISA wurden falsch positive Ergebnisse erzielt. Jeweils zwei negative Schaf- und Ziegenserien ergaben *Blocking*-Werte knapp über dem *cut off*. Anzumerken ist allerdings, dass alle falsch positiven Ergebnisse nicht reproduzierbar waren; in einer zweiten Untersuchung waren alle Werte eindeutig unter dem *cut off*. Somit stimmte das Ergebnis des *Blocking*-Testes mit dem SNT bei den 200 getesteten seronegativen Schafen zu 100% überein. Von den 128 positiven Seren, die im *Blocking*-ELISA getestet wurden, wurden 120 als positiv erkannt.

Bei den Ziegenserien wurden insgesamt 401 Seren mit den beiden ELISAs und SNTs untersucht. Im indirekten ELISA wurde ein Serum falsch positiv bewertet, zwei antikörperpositive Seren wurden falsch negativ deklariert. Insgesamt sind von den 395 negativen Fällen 394 erkannt worden, von den sechs seropositiven Ziegenserien wurden vier als solche erkannt. Die Ergebnisse der Ziegenserien des *Blocking*-ELISA und der SNTs stimmten zu 100% überein.

Für beide ELISAs wurde die Sensitivität und die Spezifität bezüglich der Schafserien berechnet. Insgesamt betrachtet ergeben sich folgende Bewertungen für die verwendeten ELISAs: Sensitivität/ Spezifität indirekter ELISA (Svanovir BDV-Ab-ELISA) 81%/ 93%; Sensitivität/ Spezifität *Blocking*-ELISA (Priocheck BVDV-Ab- ELISA) 94%/ 100%.

Aufgrund der zu geringen Anzahl seropositiver Ziegen wurde keine Sensitivität bestimmt; die Spezifität für Ziegenserien liegt bei 99,5% (Svanovir BDV-Ab-ELISA) bzw. 100% (Priocheck BVDV-Ab-ELISA).

Tabelle 21: Vergleich der Teste: Sensitivität, Spezifität
mit Anzahl der Seren, die für die Berechnung herangezogen wurden

Test	Indir. ELISA	N	Blocking-ELISA	N
Sensitivität:	0,81	128	0,94	128
Spezifität:	0,93	200	1	200

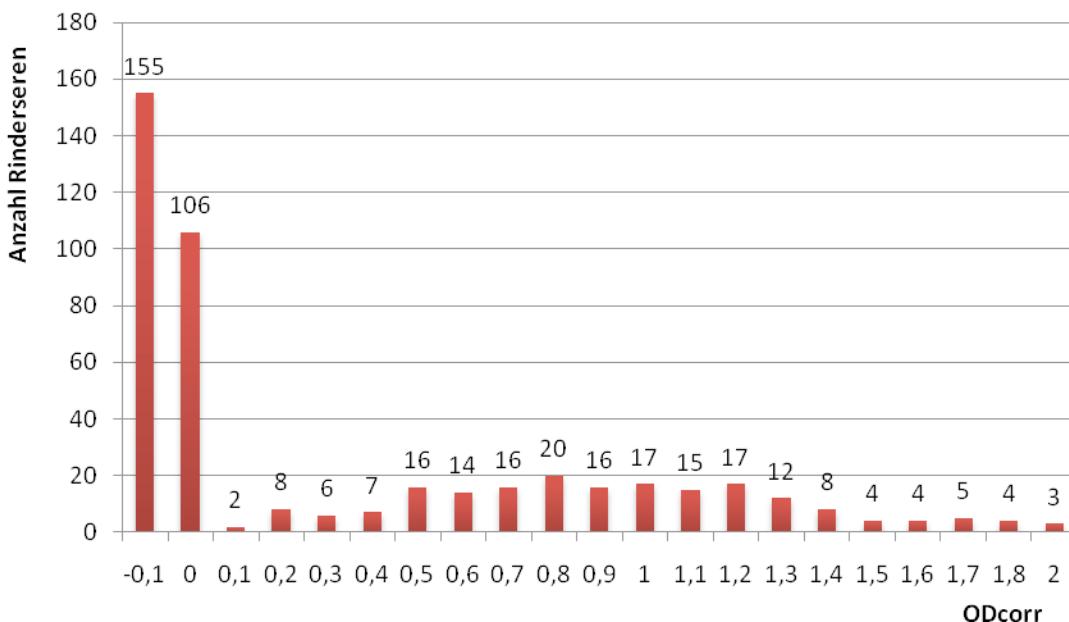
4.3 BVDV-STATUS DER RINDER IN MISCHBETRIEBEN MIT KLEINEN WIEDERKÄUERN

Von den 49 Mischbetrieben mit Rindern und kleinen Wiederkäuern konnte bei 40 Betrieben der BVDV-Status der Rinder eruiert werden. Für die Festlegung des Status wurden in Betrieben mit mehr als 10 Rindern 8-10 Rinder aus unterschiedlichen Altersklassen zufällig ausgewählt und deren Blutproben serologisch untersucht. In Betrieben, in denen weniger beprobbare Rinder zur Verfügung standen wurde eine geringere Probenzahl genommen.

Mit dem indirekten ELISA (Svanovir BVDV-Ab-ELISA) wurden insgesamt 455 Rinderseren untersucht. Davon wurden sieben Seren als schwach positiv eingestuft, da ihre prozentualen Werte zwischen 10 und 25% Reaktivität im Vergleich zur Positivkontrolle lag. 187 Seren reagierten in diesem Test positiv, die restlichen 261 Seren negativ. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, liegen die korrigierten OD-Werte der Proben hauptsächlich im Bereich -0,1 bis 0.

Da es sich bei den ELISA-Werten der Rinder um metrisch skalierte Daten handelt, wurde zur Prüfung der Normalverteilung der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet werden. Bei diesem Test kommt es für die ELISA-Daten der Rinder, die oberhalb des *cut off* liegen, zu folgendem Ergebnis: Die Annahme der Normalverteilung kann bei positiven Seren auf einem Signifikanzniveau von 5% nicht verworfen werden ($p=0,8566$).

Abbildung 14: Svanovir BVDV-Ab-ELISA ODcorr-Werte aller Rinderseren (n=455)



In Betrieben, bei denen im Rahmen der Stichprobenuntersuchung kein oder nur ein seropositives Rind gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass keine längergehende Persistenz einer BVDV-Infektion in der Herde vorlag. 23 Betriebe, davon 4 Betriebe mit jeweils einem Einzelreagenz, erhielten den Status „BVDV-negativ“.

In den Fällen, in denen die serologische Untersuchung der Stichproben positiv ausfiel, wurde zwischen aktuellen und zurückliegenden Fällen unterschieden. Als aktuelle BVDV-Fälle wurden Betriebe gezählt, bei denen alle Stichprobenteilnehmer Pestivirus-Antikörper aufwiesen (n=6). Weiterhin fielen in diese Kategorie fünf Betriebe, bei denen Befunde über bestätigte PI-Rinder vorlagen.

In Fällen, in denen nur ein Teil der Probanden Antikörper aufwies, wurde anhand der Altersverteilung der Seroreagenzien eine zurückliegende Infektion datiert. Bei Vorliegen einer länger zurückliegenden Infektion werden nur bei Tieren Antikörper gefunden, die zum Zeitpunkt der Infektion bereits im Bestand waren.

Bei den Betrieben der vierten Kategorie „Unbekannter Status“ (n=9) konnten aus unterschiedlichen Gründen keine Rinder beprobt werden. In fünf Betrieben waren die Rinder zum Zeitpunkt des Bestandsbesuches auf der Alm und konnten deswegen nicht geblutet werden. In drei weiteren Betrieben wurden die Kühe in Mutterkuhhaltung gehalten und

konnten nicht ausreichend sicher fixiert werden. In einem weiteren Betrieb mit Rindermast konnten die Tiere ebenfalls nicht fixiert werden.

Tabelle 22: Einteilung der Mischbetriebe in 4 Kategorien

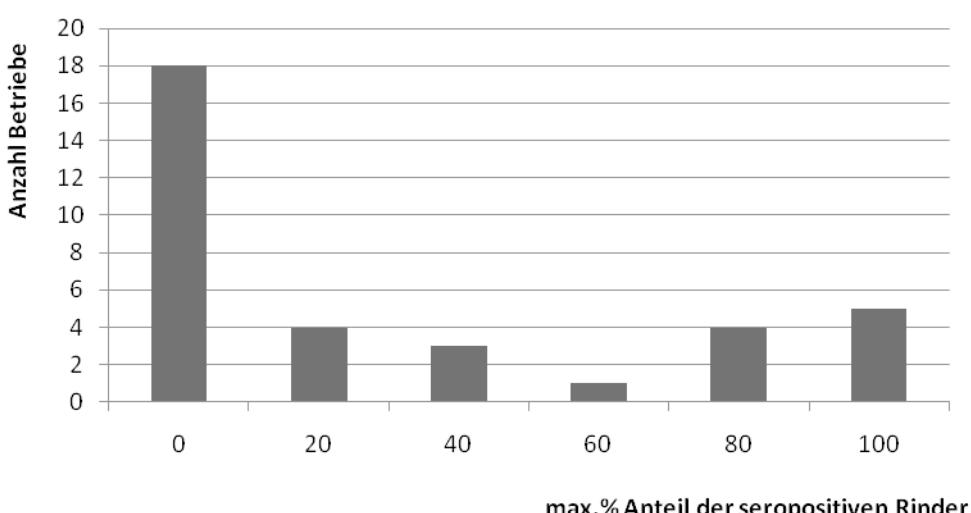
in Abhängigkeit von den Ergebnissen der viro- und serologischen Untersuchung der Rinder

Kategorie	Anzahl d. Betriebe
BVDV-Negativ	23
Aktuelle BVDV-Infektion	11
Altserologie	6
Unbekannter Status	9
Gesamt	49

In Abbildung 15 sind alle Mischbetriebe mit Rindern bezüglich der Häufigkeit von Seroreagenten klassifiziert. Die Betriebe wurden in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil der seropositiven Reagenten in sechs Klassen eingeteilt. Klasse 1 umfasst alle Betriebe ohne Seroreagenten (n=19), in Klasse 2 befinden sich Betriebe (n=4), bei denen maximal 20% der untersuchten Rinder seropositiv waren. In drei Betrieben wurden maximal 40% der beprobten Rinder als seropositiv identifiziert, während in den letzten beiden Kategorien der Anteil der Seroreagenten mit bis zu 80% (n=4) bzw. 100% (n=5) überwog.

Abbildung 15: Einteilung der Mischbetriebe mit Rindern in sechs Klassen

in Abhängigkeit des prozentualen Anteiles seropositiver Rinder in der Stichprobe



4.4 VORKOMMEN VON PESTIVIRUSINFEKTIONEN BEI KLEINEN WIEDERKÄUERN

4.4.1 FESTLEGUNG DES PESTIVIRUS-STATUS DER KLEINEN WIEDERKÄUER

Bei den kleinen Wiederkäuern wurde ebenso wie bei den Rindern ein Pestivirus-Status für den Betrieb festgelegt. Dazu wurden aus jeder Herde zufällig Tiere ausgewählt, deren Blutproben mittels ELISAs (Svanovir BDV-Ab-ELISA, Priocheck BVDV-Ab-ELISA) und SNTs untersucht wurden. In Betrieben, die mehr als 10 Schafe hielten wurden 10 oder mehr Tiere beprobt, in kleineren Betrieben wurden beim Entnahmetermin alle verfügbaren Tiere geblutet. Die Kategorisierung der Betriebe erfolgte anhand des Ergebnisses der Serologie dieser Stichprobe. In die Kategorie „Negative Betriebe“ wurden alle Betriebe eingeordnet, in denen ausschließlich seronegative Ergebnisse in den Stichproben erzielt wurden und somit persistierende Pestivirusinfektionen innerhalb der Herde ausgeschlossen werden können. In die zweite Kategorie fielen alle Betriebe mit mindestens einem seropositiven Schaf bzw. Ziege. Wie aus Tabelle 23 ersichtlich ist, überwiegt bei den Schaf- und Ziegenbetrieben der Anteil der negativen Betriebe mit n=80 (Schafbetriebe) bzw. n=16 (Ziegenbetriebe). In den negativen Schafbetrieben wurden insgesamt 854, in den negativen Ziegenbetrieben 96 Blutproben genommen. In 11 der untersuchten Betriebe mit Schafhaltung bzw. einem der untersuchten Ziegenbetriebe wurde mindestens ein seropositives Schaf bzw. eine Ziege identifiziert.

Tabelle 23: Festlegung des Pestiviren-Status der Betriebe mit kleinen Wiederkäuern anhand der Stichprobenuntersuchung

Kategorie	Anzahl der Betriebe	
	Schaf	Ziege
Negative Betriebe (kein Pestivirus-Ak-positives Tier)	80	16
Positive Betriebe (mindestens ein Reagent)	11	1

In den 11 Herden mit seropositiven Schafen wurde in sechs Fällen ein positives Tier gefunden. In Betrieb 36 wiesen 3 von 6 (50%) und in Betrieb 76 4 von 43 (9,3%), untersuchten Proben spezifische Antikörper auf. In Betrieb Nr. 91 werden zwei Schafe gehalten, die beide seropositiv waren. In einem reinen Schafbetrieb (Nr. 15) waren alle untersuchten Schafproben seropositiv, in dem Mischbetrieb 28 konnten in 20 (76,9%) der 26 Schafproben spezifische Pestivirus-Antikörper nachgewiesen werden.

Tabelle 24: Übersicht über die Schafherden mit seropositiven Schafen

Anzahl der untersuchten Schafe/ davon seropositive Tiere

Betrnr.	Betriebsart	Anzahl Schafe	Anzahl untersuchter Schafe	davon seropositiv
15	S	1000	49	49
20	S	19	14	1
28	R+S	26	26	20
36	R+S	9	6	3
51	R+S	8	6	1
70	R+S	25	14	1
73	R+S	1	1	1
76	R+S	70	43	4
91	R+S	2	2	2
93	R+S	23	23	1
101	R+S	16	14	1

Wie in Tabelle 24 dargestellt ist, handelte es sich in 9 der 11 Bestände, in denen seropositive Schafe gefunden wurden, um Mischbetriebe mit Rinderhaltung.

In einem Ziegenbetrieb wurden sechs von 398 untersuchten Ziegen als seropositiv identifiziert, auch hier wurden neben kleinen Wiederkäuern Rinder gehalten.

4.4.2 DIFFERENZIERUNG DER POSITIVEN SEREN KLEINER WIEDERKÄUER MITTELS SNT

Die Zuordnung der positiven Seren zu dem ursächlichen Pestivirus erfolgt anhand der neutralisierenden Aktivität der Seren in den BVDV- bzw. BDV-SNTs. Es wurde festgelegt, dass mindestens eine Differenz von zwei Titerstufen eine eindeutige Zuordnung ermöglicht.

In Tabelle 25 sind die SNT-Ergebnisse der 12 Betriebe zusammengestellt, in denen seropositive kleine Wiederkäuer identifiziert wurden. In einem dreizehnten Betrieb wurden ebenfalls Antikörper bei einem Schaf festgestellt, allerdings konnte dieses Serum nicht im SNT getestet werden.

In der Tabelle sind neben der Anzahl der Proben des Betriebes, die dem jeweiligen Genotyp zugeordnet wurden, die Mittelwerte der SNT-Titer dieser Seren angegeben. Bei einigen Seren gelang die eindeutige Zuordnung zu einem Genotyp nicht aufgrund zu geringer Titerunterschiede, diese Seren sind als indifferent eingestuft worden. Ein Teil der Seren wies höhere Titer gegen die beiden bovinen Pestivirusstämme auf, eine genauere Differenzierung war ebenfalls nicht möglich, diese Ergebnisse sind unter BVDV eingeordnet worden. Außerdem wurde in der Spalte „keine Antikörper“ die Anzahl der untersuchten seronegativen Tiere des Betriebes angegeben.

In Tabelle 25 sind insgesamt die Ergebnisse zu den 86 seropositiven Schafseren aufgeführt, 20 Seren zeigten die größte neutralisierende Aktivität im SNT gegen BVDV-1, vier der seropositiven Proben sind auf BVDV-2-Infektionen zurückzuführen. Allerdings lag bei drei dieser vier Seren der Fall vor, dass zwei SNTs und beide ELISAs negative Ergebnisse lieferten, während der BVDV-2-SNT einen Titer <1:8 ergab. Sehr wahrscheinlich handelte es sich um unspezifische Virusneutralisationen, deswegen werden diese Seren in den weiteren Ausführungen der vorliegenden Arbeit als negativ gewertet. Vier Seren ergaben in den BVDV-1- und -2-SNTs ähnlich hohe Titer, die mindestens zwei Titerstufen über denen der BDV-SNTs lagen. Eine Zuordnung zu einer zugrunde liegenden BVDV-Infektion war somit möglich, wenngleich nicht der Genotyp bestimmt werden konnte. Diese Seren wurden als „BVDV“ ohne Zusatz der Genotypbezeichnung angegeben. 40 der Seren weisen im BDV-SNT die höchsten Titer auf. Wie aus Tabelle 25 ersichtlich ist, stammen alle 40 Seren aus dem gleichen Betrieb (Nr. 15). In diesem Betrieb wies ein Serum eines weiteren Schafes die höchsten Titer gegen BVDV-1 auf, ferner wiesen neun Schafe dieses Bestandes nicht differenzierbare Pestivirus-Antikörper auf. Insgesamt 18 der Schafseren konnten anhand der gemessenen Titer nicht eindeutig zugeordnet werden, sie sind in die Kategorie „indifferente Ergebnisse“ (Indiff.) eingestuft worden.

Alle sechs seropositiven Ziegen stammen aus dem Betrieb 75, zwei der Proben zeigten die größte Neutralisation im BVDV-2-SNT, bei den restlichen vier Seren waren die Titerunterschiede zwischen BVDV-1- und BVDV-2-SNT zu gering, sie wurden als indifferent ausgegeben.

Tabelle 25: Betriebe mit seropositiven kleinen Wiederkäuern mit Anzahl der seropositiven und seronegativen Tiere des Betriebes

Zuordnung der Ergebnisse anhand SNT-Titer zu wahrscheinlicher Pestivirusinfektion; unter „SNT-Titer“ sind die Mittelwerte aller positiven Seren eines Betriebes angegeben

Betr.nr.	Spezies	Genotyp	N	Geometr. Mittelwerte SNT-Titer KIDcorr2eX		
				BVDV-1	BVDV-2	BDV
15	S	BVDV-1	1	9,7	3,2	7,2
		BDV	40	6,4	2,8	9,8
		Indiff.	8	5,4	2,7	6,8
		keine Ak	0	-	-	-
20	S	Indiff.	1	5,2	5,2	6,8
		keine Ak	13	0,0	0,0	0,0
28	S	BVDV-1	16	6,8	3,4	4,6
		Indiff.	4	7,0	3,8	6,4
		keine Ak	6	-	-	-
36	S	BVDV-1	1	7,5	5,3	4,5
		BVDV	2	5,3	5,2	4,1
		keine Ak	3	-	-	-
51	S	BVDV	1	5,8	5,0	<1:2
		keine Ak	5	-	-	-
70	S	Indiff.	1	6,2	5,3	5,2
		keine Ak	4	-	-	-
73	S	BVDV-1	1	8,2	6	4,4
		keine Ak	0	-	-	-
75	Z	BVDV-2	2	8,7	11,6	5,7
		Indiff.	4	8,1	9,6	6,8
		keine Ak	392	-	-	-
76	S	BVDV-2	1	4,8	7,7	2,8
		indiff.	3	5,6	4,1	5,0
		keine Ak	39	-	-	-
91	S	BVDV	1	9,5	7,7	5,8
		Indiff.	1	7,2	6,3	6,3
		keine Ak	0	-	-	-
93	S	BVDV-1	1	10,2	7,2	7,2
		keine Ak	22	-	-	-
101	S	Pestivirus-Ak	1		Nicht differenziert	
		keine Ak	13	-	-	-

Tabelle 26 gibt einen Überblick über die Anzahl und Zuordnung der 83 seropositiven Schafseren bzw. ihren prozentualen Anteil an der Gesamtheit der Seroreagenter. Bei den Schafseren wurde folgende Verteilung festgestellt: 24,1% BVDV-1, 1,2% BVDV-2, 4,8% BVDV(nicht näher differenzierbar), 48,2% BDV und 21,7% Indifferent.

Tabelle 26: Zuordnung der seropositiven Schafseren

zu den Pestiviren BVDV-1, BVDV-2, BVDV(nicht näher differenzierbar), BDV und indifferenten Ergebnissen

	BVDV-1	BVDV-2	BVDV	BDV	Indifferent
Anzahl Seren	20	1	4	40	18
Angabe in%	24,1	1,2	4,8	48,2	21,7

In Tabelle 27 sind die gleichen Daten für die Ziegenserien aufgeführt. Es wurden insgesamt sechs positive Ziegen gefunden, von denen zwei die höchste neutralisierende Aktivität gegen BVDV-2 aufwiesen, die restlichen vier Ergebnisse waren indifferent.

Tabelle 27: Zuordnung der seropositiven Ziegenserien zu den Pestiviren BVDV-1, BVDV-2

BDV und indifferenten Ergebnisse

	BVDV-1	BVDV-2	BVDV	BDV	Indifferent
Anzahl Seren	0	2	0	0	4

4.4.3 VORKOMMENSHÄUFIGKEIT VON BORDER DISEASE

Anhand der SNT-Untersuchungen wurde festgestellt, dass nur in Betrieb 15 eine Infektion mit Border Disease vorlag, in den anderen Betrieben wurden die Antikörper auf bovine Pestivirusstämme zurückgeführt. Bei Betrieb 15 handelt es sich um einen großen Schafhalter mit ca. 1000 Schafen, diese Tiere werden in Hütehaltung gehalten. Es wurden Blutproben von 50 Tieren auf Pestivirus-Antikörper und Pestiviren untersucht. In keiner Probe konnten Pestiviren mittels PCR (Kapitel 4.1.3) detektiert werden, 40 Proben wiesen BDV-, acht Seren indifferente und ein Serum BVDV-1-Antikörper auf. Von einem Tier war zu wenig Serum für die SNT-Untersuchungen vorhanden. Aufgrund der Laborergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass in diesem Betrieb eine persistente Pestivirus-Infektion mit BDV vorlag.

Von den 80 Betrieben, in denen keine seropositiven kleinen Wiederkäuer gefunden wurden, wurden insgesamt 939 Seren mit dem indirekten ELISA und 192 Seren mit beiden ELISAs untersucht. Aufgrund der Spezifität und Sensitivität, die anhand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit berechnet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass in diesen 80 Betrieben zumindest keine persistierenden Pestivirusinfektionen vorlagen. Bei der Stichprobengröße 100 Betriebe liegt die geschätzte Häufigkeit BDV-infizierter Betriebe zwischen 0,35 und 4,7% (Binomialverteilung $\alpha=5\%$).

In einer weiteren Schafherde (Nr.20) ohne Kontakt zu Rindern wurden bei einem 5-jährigem Schaf (von 14 untersuchten Schafen) mittels SNT tendenziell BDV-spezifische Antikörper nachgewiesen, allerdings war der Titerabstand zu den beiden BVDV-Stämmen relativ gering, so dass die Zuordnung nicht vorgenommen wurde (BVDV-1-Titer:2^{5,2}, BVDV-2-Titer:2^{5,2}, BDV-Titer:2^{6,8}). Nimmt man diesen indifferenten Titer als BDV an, so errechnet sich eine Vorkommenshäufigkeit BDV-infizierter Betriebe zwischen 0,82 und 6,2%.

4.4.4 BVDV-INFektIONEN BEI KLEINEN WIEDERKÄUERN IN ABHÄNGIGKEIT DES BVDV-STATUS DER RINDER IM KONTAKTBEREICH

4.4.4.1 Mischbetriebe mit aktueller BVDV-Infektion

Insgesamt 11 Betriebe (22,5% aller Mischbetriebe) konnten der Kategorie „aktuelle BVDV-Infektion im Rinderbestand“ zugeordnet werden. In sieben Betrieben wurden aktuelle Infektionen durch Untersuchungen im Rahmen der Studie festgestellt, in vier Betrieben waren durch Untersuchungen, die der Landwirt veranlasst hatte, persistent infizierte Rinder identifiziert worden. Vier Landwirte (Betriebsnr. 30, 76, 91, 98) lehnten weitere Untersuchungen zu Studienzwecken ab. In diesen Betrieben konnten deshalb keine Angaben gemacht werden, ob ein persistent infiziertes Tier vorhanden war. In den restlichen sieben Betrieben wurden mehrere virämische Tiere identifiziert.

Tabelle 28: Anzahl der seropositiven Schafe aus Mischbetrieben mit aktueller BVD-Infektion

Betr.Nr	Arten	N Schafe	untersuchte Schafe	davon sero-positiv	PI-Rinder
9	R+S	13	8	0	1
10	R+S	13	13	0	8
21	R+S	13	5	0	2
28	R+S	24	24	13	5
30	R+S	85	20	0	unbekannt
61	R+S	2	2	0	5
73	R+S	1	1	1	5
76	R+S	70	43	4	unbekannt
91	R+S	2	2	2	unbekannt
93	R+S	23	23	1	3
98	R+S	26	20	0	unbekannt

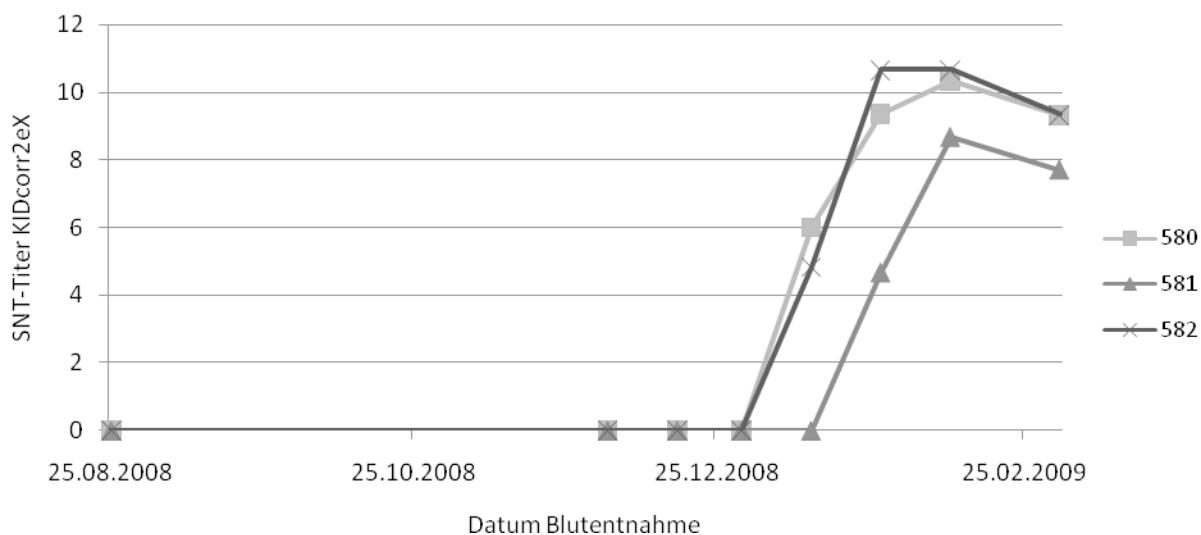
In vier von 11 Betrieben dieser Kategorie war unbekannt, ob persistent infizierte Tiere im Bestand vorhanden waren. In diesen Betrieben wurde anhand der serologischen Ergebnisse festgestellt, dass aktuell eine Infektion vorlag; weiterführende Untersuchungen wurden aus unterschiedlichen Gründen nicht durchgeführt.

In drei Betrieben (10, 28, 73) wurden Verlaufsuntersuchungen durchgeführt: Hier wurden die Schafe mehrmals beprobt, alle neugeborenen Kälber des Betriebes wurden auf BVDV-Antigen untersucht. In einem dieser Betriebe (Nr. 10) wurden im Laufe der Studie acht persistent infizierte Kälber geboren, in diesem Bestand wurden alle zehn Schafe insgesamt dreimal im Abstand von vier bzw. drei Monaten geblutet. Die Proben wurden jeweils mit den beiden ELISAs und den drei SNTs untersucht. In keinem der Teste konnten Antikörper nachgewiesen werden. Die Schafe lebten nicht im Stall mit den Rindern, aber in räumlicher Nähe auf der Weide neben dem Rinderstall.

In Betrieb 28 mit sieben Rindern konnten Verlaufsuntersuchungen über einen Zeitraum von sieben Monaten durchgeführt werden. Hier wurden nach der Erstuntersuchung insgesamt fünf persistent infizierte Kälber geboren. Aus diesem Betrieb wurde aus Kälberblut Virus isoliert und für homologe SNT-Untersuchungen verwandt. Die 24 Schafe dieses Betriebes werden in zwei Gruppen gehalten, von denen Gruppe 1 mit 11 Schafen im selben Stallbereich untergebracht ist wie die PI-Kälber. Die andere Schafgruppe ist in einem anderen Stalltrakt aufgestallt und besitzt keine direkte Kontaktmöglichkeit zu den Rindern des Betriebes. Allerdings hat diese Gruppe über den Weidezaun Kontaktmöglichkeiten zu Gruppe 1, außerdem werden die Tiere von denselben Personen versorgt. Zu Beginn der Untersuchungen wurden bei 10 der 24 Schafe seronegative Ergebnisse ermittelt. Bei den restlichen Schafen wurden zurückliegende Pestivirusinfektionen nachgewiesen, die Seren wiesen die höchste neutralisierende Aktivität gegen BVDV-1 auf. Sechs Schafe blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum seronegativ, bei einem Schaf konnte aufgrund zu geringer Probenmengen kein Titerverlauf ermittelt werden; weitere 12 Tiere zeigten während der vier Monate kaum Schwankungen im Titerverlauf. Die mittlere Titerhöhe der 12 Schafe lag bei $2^{7,9}$, der höchste Titer lag konsistent um $2^{10,0}$, die geringste um $2^{5,5}$.

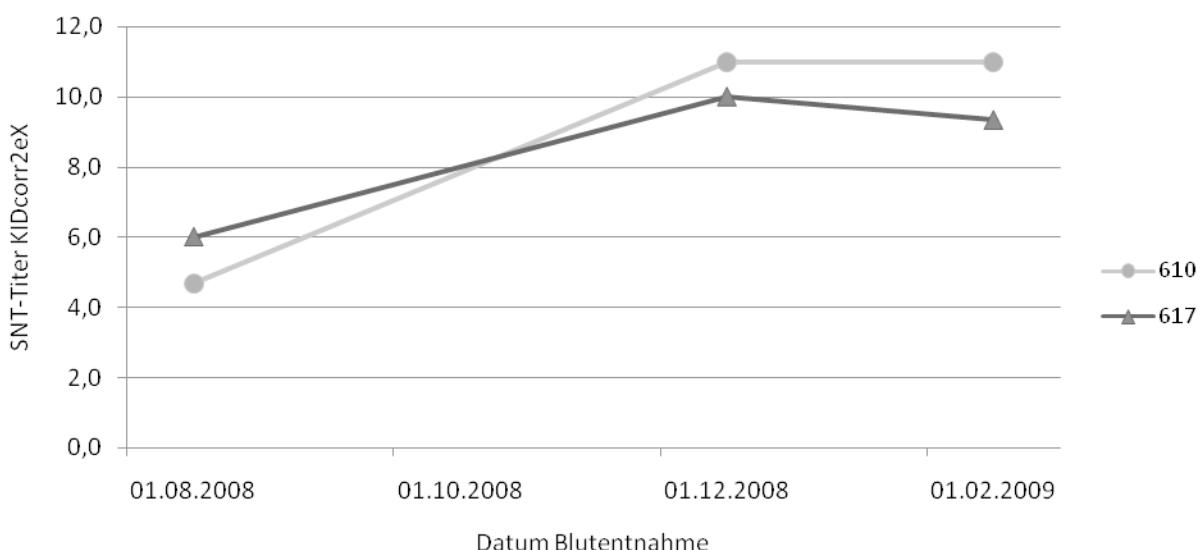
Bei insgesamt fünf Schafen war im Laufe der sieben Monate ein deutlicher Titeranstieg gegen den homologen BVDV-Stamm (SNT gegen BVDV-1 „Wilma“) zu messen. Die Schafe Nr. 580, 581 und 582 aus Gruppe 1 waren zu Beginn der Untersuchungen seronegativ. Wie aus der Abbildung 16 ersichtlich ist, steigen die Titer nach 16 (Tier 580 und 582) bzw. 18 (Tier 581) Wochen an und erreichen ein Maximum von ca. 2^{10} .

Abbildung 16: Übersicht über die BVDV-1-Wilma-SNT-Titeranstiege
der Schafe des Betriebes 28 (Gruppe 1)-mit direktem Kontakt zu PI-Kälbern



In Abbildung 17 sind die SNT-Titer (BVDV-1 „Wilma“) von zwei Schafen der Gruppe 2 dargestellt, die keinen direkten Kontakt zu den Rindern hatten. Die sekundäre Serokonversion ist nachgewiesen über die Titeranstiege von $2^{4,7}$ auf $2^{11,0}$ bei Schaf 610 und $2^{6,0}$ auf $2^{10,0}$ bei Schaf 617.

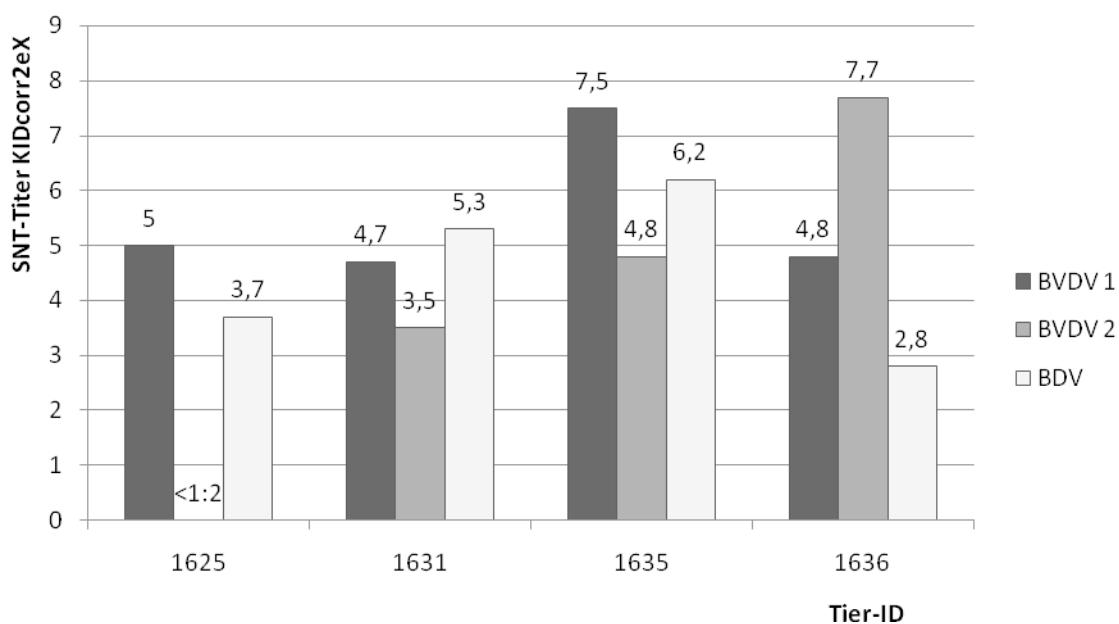
Abbildung 17: Übersicht über die BVDV-1-Wilma-SNT-Titeranstiege
der Schafe des Betriebes 28 (Gruppe 2)- ohne direkten Kontakt zu PI-Kälbern



In einem weiteren Bestand (Nr. 73) wird das einzige Schaf des Betriebes zusammen mit den Kälbern gehalten. Im Laufe eines Jahres wurden hier fünf persistent infizierte Kälber geboren, die alle direkten Kontakt zu dem Schaf hatten. Das Schaf wurde innerhalb von 10 Monaten dreimal beprobt. Die Titer des BVDV-1-SNTs bleiben über den untersuchten Zeitraum in etwa auf dem gleichen Niveau um die Titerstufe $2^{8,2}$, die Titer des BVDV-2- (geometrischer Mittelwert $2^{5,9}$) und BDV-SNTs (Mittelwert $2^{4,3}$) liegen im Schnitt mehr als zwei Titerstufen unter den BVDV-1-Titern, auch sie zeigen im Verlauf keine großen Schwankungen.

In Betrieb 76, 91 und 93 wurden bei den kleinen Wiederkäuern Antikörper nachgewiesen. Von den insgesamt 43 untersuchten Schafen des Betriebes 76 waren vier seropositiv. Die Schafe werden im Sommer in einem separaten Stall gehalten, der ca. 1 km entfernt vom Hof des Landwirts liegt. Im Winter sind die Schafe direkt am Hof untergebracht, es besteht kein Kontakt zu den Rindern. Die Titer der Neutralisationsteste sind in Abbildung 18 grafisch dargestellt worden.

Abbildung 18: Vergleich der SNT-Titer der seropositiven Schafe des Betriebes 76



Betrieb 91 hält mit den Rindern zwei Schafe im Jungtierstall, beide waren seropositiv und wiesen die in Tabelle 29 veranschaulichten SNT-Titer auf. Bei dem Tier 1934 unterscheiden sich die Titer nicht wesentlich, dieses Serum wurde als indifferent gewertet. Das zweite positive Serum des Betriebes kann dagegen einem BVDV-1- Genotyp zugeordnet werden.

Tabelle 29: Vergleich der SNT-Titer der Schafe des Betriebes 91

Labornr.	SNT-Titer KIDcorr2eX		
	BVDV-1	BVDV-2	BDV
1934	7,2	6,3	6,3
1935	9,5	7,7	5,8

Bei Betrieb 93 handelt es sich um einen Mutterkuhhalter mit einer kleinen Schafherde. Die 60 Mutterkühe werden auf Weiden gehalten, die direkt an die Schafweiden grenzen. In der Rinderherde lebte die letzten fünf Jahre eine persistent infizierte Kuh inklusive ihrer weiblichen Nachzucht. Etwa einen Monat vor dem Untersuchungszeitpunkt waren die drei Virämiker geschlachtet worden. Die 23 Schafe des Bestandes wurden mit allen zur Verfügung stehenden Testen untersucht, darunter fand sich ein seropositives Tier. Der Titer des BVDV-1-SNT ($2^{10,2}$) mehr als zwei Titerstufen über den anderen Werten (BVDV-2-SNT: $2^{7,2}$; BDV: $2^{7,2}$), weshalb diese Infektion einem BVDV-1-Genotyp zugeordnet werden konnte.

4.4.4.2 Mischbetriebe mit Altserologie

Die Kategorie „Mischbetriebe mit Altserologie“ enthält sechs Betriebe, in denen bei älteren Rindern Antikörper gefunden wurden, während jüngere Tiere eine negative Serologie aufwiesen. Da bei der Blutentnahme unterschiedliche Altersklassen ausgewählt wurden, war in diesen Betrieben eine zeitliche Einordnung zurückliegender BVDV-Infektionen möglich.

In Betrieb 29 konnte kein genauer Zeitpunkt einer Infektion festgelegt werden, da keine Jungtiere gehalten wurden und die serologischen Ergebnisse der Kühe keine zeitliche Einordnung der Infektion ermöglichen.

Tabelle 30: Anzahl der untersuchten bzw. seropositiven kleinen Wiederkäuer aus Mischbetrieben mit Altserologie bei den Rindern

Betr. Nr	Betriebsart	N untersuchte Rinder	N untersuchte S bzw. Z	davon seropositiv	BVDV-Infektion wann?
12	R+S	18	28	0	2003
17	R+S	12	12	0	2006
29	R+S	14	10	0	unbekannt
90	R+S	10	20	0	2006
44	R+S	**	9	0	2003
75	R+Z(+S)*	70	398	6	2007

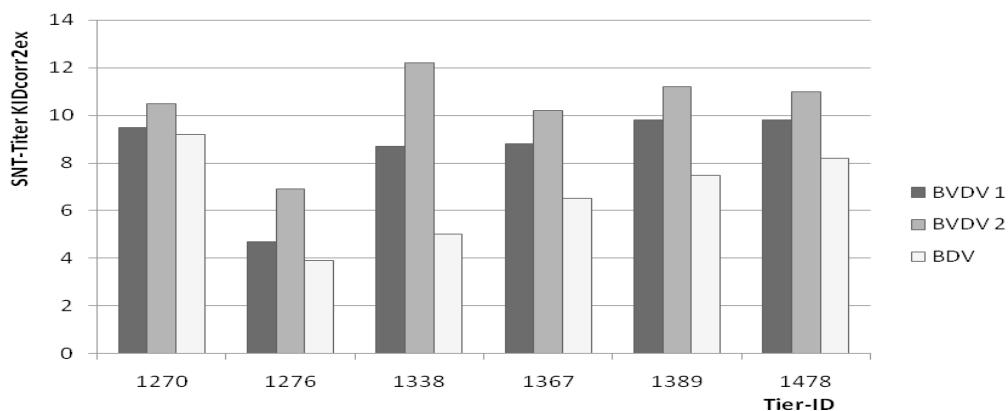
*10 Schafe des Betriebes wurden untersucht, es wurde kein seropositives Tier gefunden

** Festlegung des Status aufgrund von Angaben des Landwirts, Befund über negative Jungtierserologie vorhanden

In fünf der sechs Betriebe dieser Kategorie konnte kein Hinweis gefunden werden, dass eine Übertragung des Virus vom Rind aufs Schaf bzw. Ziege stattgefunden hat. Sowohl in den beiden ELISAs als auch in den BVDV- bzw. BDV-Neutralisationstesten wurden in keiner Probe Antikörper gefunden.

In Betrieb 75 konnte der Zeitpunkt der BVDV-Infektion aufgrund der ELISA-Ergebnisse der Rinderblute auf 2007 datiert werden. Der Betrieb hält neben Schafen und Mutterkühen 398 Milchziegen. Die Schafe haben zu den anderen Tieren des Betriebes relativ wenig Kontakt, sie werden auf einer separaten Wiese gehalten. In dem Stall, in dem die Rinder im Winter untergebracht sind, werden Jungziegen und trächtige Milchziegen gehalten, wovon ein Teil der Jungziegen aus dem gleichen Futtertrog frisst wie die Kälber. Die untersuchten Schafe waren alle seronegativ, während bei den Ziegen insgesamt sechs seropositive Tiere identifiziert wurden. Diese sechs Ziegen wurden alle vor 2007 geboren. In diesem Betrieb wurden komplett alle 398 Ziegen geblutet, insgesamt gesehen ist der Anteil der seropositiven Ziegen mit 1,5% sehr gering. Die SNT-Ergebnisse der seropositiven Ziegen sind in Abbildung 19 dargestellt. Zwei der Ziegenserien, Nr. 1276 und 1338, können eindeutig BVDV-2 zugeordnet werden, die restlichen vier Ergebnisse sind indifferent, auch wenn bei allen der BVDV-2-Titer höher lag als die anderen Pestiviren-Titer. Der Unterschied zum BDV-Titer war in allen Fällen größer als zum BVDV-1-Titer.

Abbildung 19: Vergleich der SNT-Titer der Ziegen aus Betrieb 75

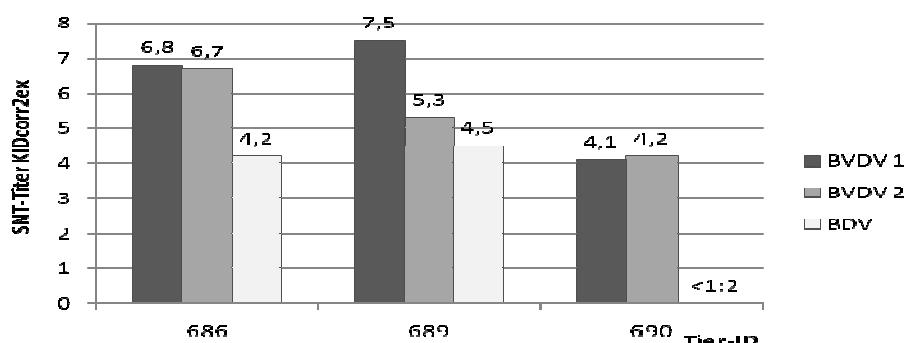


4.4.4.3 Mischbetriebe mit unbekanntem BVDV-Status

In neun Mischbetrieben war aus unterschiedlichen Gründen eine Beprobung der Rinder nicht möglich, für diese Bestände konnte folglich kein BVD-Status festgelegt werden. In drei der Betriebe dieser Kategorie wurden seropositive Schafe gefunden.

In Betrieb 36 wiesen drei der sechs untersuchten Schafe BVDV-spezifische Antikörper auf. Die Schafe und Rinder verbringen den Sommer zusammen mit Tieren der Betriebe 40, 43, 51 und 44. Bei letztgenanntem Betrieb handelt es sich, wie in Kapitel 4.4.4.2 erwähnt, um einen Bestand, in dem vor fünf Jahren ein Kalb an MD verstorben war. Die SNT-Titer der drei Schafe des Betriebes 36 werden in Abbildung 20 miteinander verglichen: Bei zwei Tieren ist die Zuordnung zu BVDV eindeutig möglich, Tier 689 wies die größte neutralisierende Aktivität gegen BVDV-1 auf.

Abbildung 20: Vergleich der SNT-Titer der seropositiven Schafe des Betriebes 36



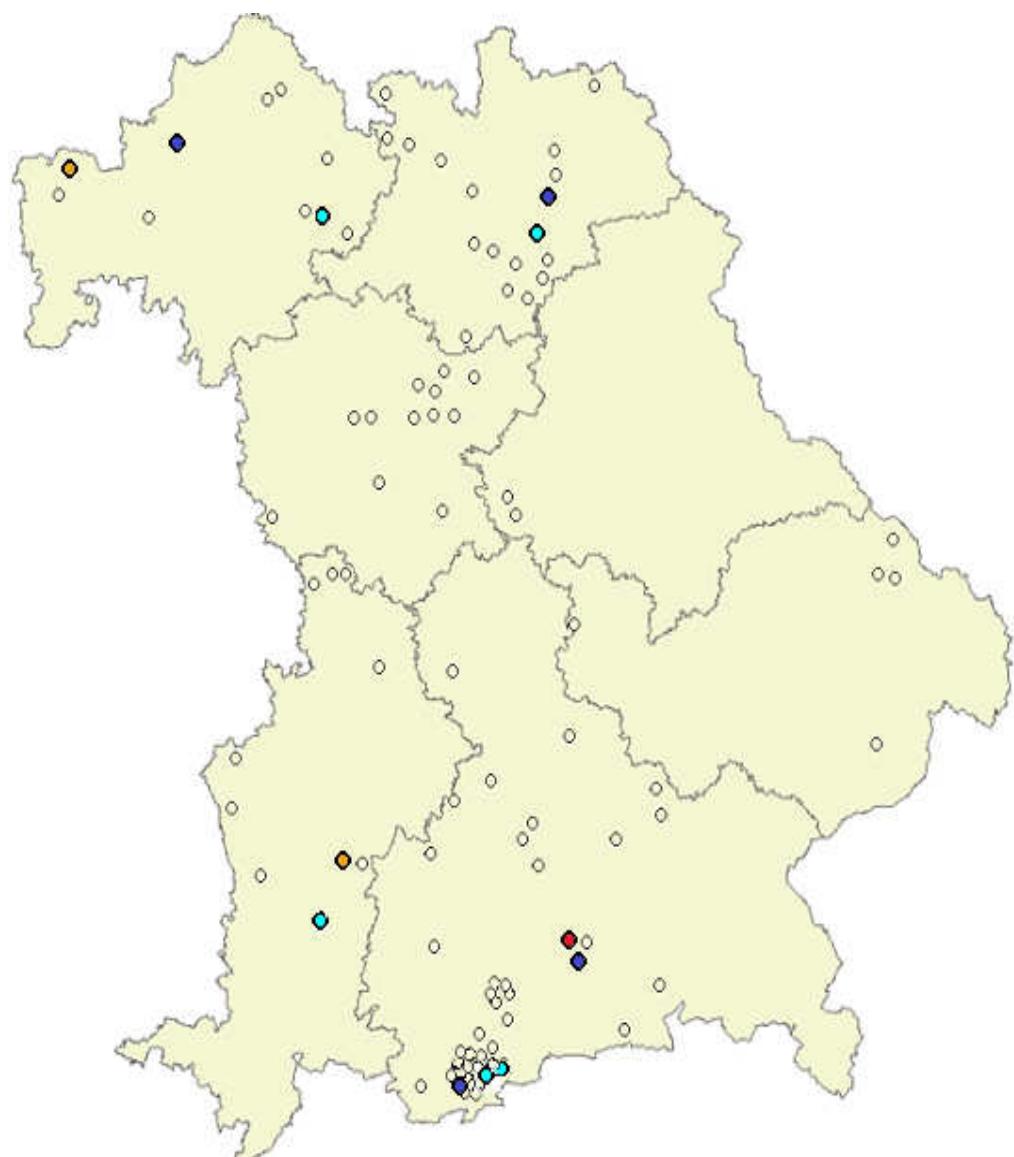
Bei Betrieb 51 ($n_{Schafe}=8$) handelt es sich ebenfalls um einen Beschicker der oben genannten Gemeinschaftsweiden. In dem Neutralisationstest, der mit BDV durchgeführt wurde, konnten keine Antikörper nachgewiesen werden. Die Titer der anderen beiden SNTs lagen bei $2^{5,8}$ bzw. $2^{5,0}$. Somit ist zwar eine Zuordnung der Infektion zu Rinderstämmen möglich, aber es lässt sich keine Aussage darüber machen, ob der BVDV-Infektion Genotyp 1 oder 2 zugrunde lag. In einem Betrieb (Nr. 70) mit neun Schafen wurde unter fünf untersuchten Schafen ein seropositives Tier gefunden; hier war keine Zuordnung anhand der SNT-Titer möglich (BVDV-1-SNT: $2^{6,2}$, BVDV-2-SNT: $2^{5,2}$, BDV-SNT: $2^{5,3}$).

4.4.5 REGIONALE VERTEILUNG DER SEROPOSITIVEN KLEINEN WIEDERKÄUER

Die bayernweite Verteilung der Betriebe mit seropositiven kleinen Wiederkäuern ist in Abbildung 21 dargestellt. Generell ist in diesem Schaubild keine Häufung bestimmter Genotypen in bestimmten Regionen erkennbar: Der einzige BDV-Betrieb liegt in Oberbayern, BVDV-1-Antikörper wurden in jeweils einem Betrieb in Unterfranken, Oberfranken und in Oberbayern gefunden, BVDV-2-Antikörper je einmal in Ober-, Unterfranken, Oberbayern und Schwaben. Allerdings ist die Anzahl der Betriebe insgesamt zu gering, um Aussagen über die bayernweite Verbreitung von Pestiviren beim kleinen Wiederkäuer machen zu können. Des Weiteren fällt eine ungleichmäßige Verteilung der Bestände auf: In Niederbayern und in der Oberpfalz wurden vier bzw. zwei Betriebe untersucht, während in Oberbayern insgesamt 43 Landwirte an dem Projekt teilnahmen. Somit können die Ergebnisse nicht auf ganz Bayern übertragen werden; sie geben eine Übersicht über die Situation in ausgewählten Betrieben

Abbildung 21: Übersicht über die bayernweite Verteilung der Betriebe

Markierung der Herkunftsbetriebe der indifferenten, BVDV-1,-2, BDV, BVDV-Antikörper-positiven Seren



- seronegative kl. Wdk.
- seropositive kl. Wdk., indifferent
- BVDV 1
- BVDV 2
- BDV

4.4.6 AUSWERTUNG DER PER FRAGEBOGEN ERFASSTEN DATEN UND BEZUG ZU DEN LABORERGEBNISSEN

4.4.6.1 Tierkontakte und Krankheitssymptome der kleinen Wiederkäuer

Die im Fragebogen erfassten Daten der Betriebe wurden mit den Ergebnissen der Laboruntersuchungen verknüpft und statistisch ausgewertet. In der folgenden Auswertung wurden die Daten der Schafe und Ziegen zusammengefasst. Ferner wurden die zwei Betriebe, bei denen ein BVDV-2-Titer <1:4 gemessen wurde, nicht berücksichtigt.

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen den verschiedenen Merkmalen wurde der exakte Fisher-Test verwendet. Als Nullhypothese wird festgelegt, dass die Merkmale unabhängig sind. Es wurde getestet, ob die gemeinsame Haltung von Schweinen und kleinen Wiederkäuern bzw. deren Nutzungsart zum vermehrten Auftreten seropositiver Schafen bzw. Ziegen führt. Beide Fragestellungen konnten mit $p=0,257$ (Haltung Schwein) bzw. $p=0,194$ (Nutzungsart) verneint werden. In einer weiteren Auswertung wurde getestet, ob zwischen der gemeinsamen Haltung von Rindern und Schafen u./o. Ziegen in einem Betrieb und dem Nachweis eines seropositiven Ergebnisses in diesem Betrieb ein Zusammenhang besteht. In Betrieben mit direkten Kontaktmöglichkeiten zwischen Schafen bzw. Ziegen und Rindern wurden signifikant häufiger positive Schafe/ Ziegen gefunden ($p=0,022$). Dagegen konnten keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen indirektem Kontakt und Pestivirus-Antikörpernachweis bei Schafen und Ziegen gefunden werden ($p=0,796$). In die Kategorie „indirekte Übertragung“ fielen Mischbetriebe, in denen Rinder, Schafe oder Ziegen keinen oder nur saisonal direkten Kontakt hatten, aber indirekte Kontaktmöglichkeiten über Personen, Gerätschaften oder gemeinsam benutzte Weiden bestand. Keine signifikanten Zusammenhänge wurden weiterhin gefunden zwischen seropositiven kleinen Wiederkäuern und Kontakten zu betriebsfremden ($p=0,667$) bzw. zugekauften ($p=0,872$) Wiederkäuern. In dieser Kategorie wurden weiterhin die Ergebnisse der kleinen Wiederkäuer separat betrachtet, die auf Gemeinschaftsalmen aufgetrieben wurden. Mit $p=0,875$ kann die Hypothese verworfen werden, dass bei Nutzung der Bergweiden signifikant höhere Seroprävalenzen bei kleinen Wiederkäuern ermittelt werden können. Jeder Betriebsleiter wurde zu Krankheitsanzeichen bei seinen Tieren befragt, die auf eine Pestivirusinfektion hindeuten könnten. 37 der 91 Schafhalter hatten keine der gefragten Symptome beobachtet, weitere 37 berichteten von Fruchtbarkeitsproblemen oder

der Geburt lebensschwacher Lämmer. 13 Tierhalter berichteten von Läsionen am Maul bzw. der Maulschleimhaut (n=3), Läsionen im Zwischenklauenbereich (n=5) und Durchfallproblematik (n=3). Von den 17 Ziegenhaltern gaben vier an, dass klinische Symptome wie Durchfall (n=1), Aborte (n=1) oder die Geburt lebensschwacher Jungtiere (n=2) aufgetreten waren. In keinem dieser Schaf- und Ziegenbetriebe wurden Antikörper gegen Pestiviren nachgewiesen, weshalb hier kein ursächlicher Zusammenhang mit einer Pestivirus-Infektion angenommen werden kann ($p=1$). Die Tierhalter wurden nach Jungtieren befragt, die *Hairy Shaker*-ähnliche Symptome zeigten. Vier der Schafhalter gaben an, in ihrer Herde mindestens ein Zitterlamm gehabt zu haben, nur in einem Fall konnten BDV-Antikörper in der Herde gefunden werden.

4.4.6.2 Nutzungsarten, Tierkontakte und Krankheitssymptome der Rinder

Bei den Rindern konnten ebenso wie bei den kleinen Wiederkäuern keine Zusammenhänge erkannt werden zwischen signifikant häufigerem Auftreten seropositiver Rinder und den folgenden Faktoren: Nutzung der Rinder als Milch- oder Masttiere ($p=0,384$), Bewirtschaftung des Betriebes im Haupt- oder Nebenerwerb ($p=0,406$), Haltung im Anbinde- oder Laufstall ($p=0,580$) oder der reinen Stall- bzw. Stall- und Weidehaltung ($p=0,924$). Ferner wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden zwischen Betrieben, in denen Schweine gehalten wurden und Betrieben ohne Schweinehaltung ($p=0,189$). Ebenso wie bei den Schafen konnten Zukäufe und Tierkontakte zu betriebsfremden Wiederkäuern ($p_{Zukauf}=0,976$ bzw. $p=0,576$) nicht in einen direkten Zusammenhang mit dem Vorkommen seropositiver Rinder gebracht werden. Bei den Rindern wurden ebenfalls keine signifikant höheren Seroprävalenzen bei der Nutzung von Almweiden festgestellt ($p=0,574$), allerdings war die Anzahl der Betriebe, die diese Weiden nutzten, mit $n=4$ gering.

In den Betrieben mit Rindern wurden die Tierhalter befragt, ob bei ihren Rindern Symptome aufgetreten waren, die für eine BVDV-Infektion sprächen. Folgende Symptome wurden darauf getestet, ob eine Abhängigkeit mit dem Vorkommen positiver Tiere bestand: Läsionen am Maul bzw. Maulschleimhaut ($p=0,112$), Durchfall ($p=0,251$), Aborte ($p=0,623$), Früh- und Totgeburten ($p=0,174$) sowie die Geburt lebensschwacher Jungtiere ($p=0,481$). Mit $p=0,012$ wurde die Hypothese bestätigt, dass ein Zusammenhang zwischen BVDV-seropositiven Rindern und dem gehäuften Auftreten von Tierverlusten besteht.

5 DISKUSSION

5.1 BEWERTUNG DER VERWENDETEN ELISAS ALS SCREENING TESTE FÜR PESTIVIRUSANTIKÖRPER BEI KLEINEN WIEDERKÄUERN

Für die Untersuchung der Schaf- und Ziegenserien wurden zwei unterschiedliche ELISA-Prinzipien angewandt: Ein indirekter Antikörpernachweis und ein *Blocking*-Test. Zunächst war als *Screening*-Methode für die Qualifizierung des Herdenstatus bei kleinen Wiederkäuern nur der in Deutschland für Schaf und Ziege zugelassene indirekte Test (Svanova BDV-Ab-ELISA) vorgesehen. Dies war nicht nur in der Zulassung begründet, sondern auch durch Daten aus Österreich: Mit 715 Schafproben wurde dort eine Sensitivität von 94,3% und eine Spezifität von 93,7% und mit 150 Ziegenproben eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% gemessen (Krametter, 2002). Nach ersten eigenen Ergebnissen wurde eine geringere Sensitivität vermutet und daher im Verlauf der Studie der *Blocking*-Test dazugenommen. Nach Auswertung aller Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit lag die Sensitivität des indirekten Testes bei ovinen Seren bei nur 80,6%, auch bei den sechs antikörperpositiven Ziegenserien wiesen zwei ein negatives Ergebnis auf. Die Spezifität betrug bei Schafserien 93,0% und bei Ziegenserien 99,8%. Verschiedene Ursachen für die vergleichsweise geringere Sensitivität sind vorstellbar:

- Unterschiede in der Herstellungsart oder Chargenimbalanzen: Nach Rückfrage beim Hersteller sind keine Änderungen im Produktionssystem vorgenommen worden. Die Chargen weisen keine auffälligen Abweichungen auf.
- Unterschiedliche Qualität der Laborbearbeitung: Die ELISA-Abarbeitung erfolgte per Hand, positive und negative Testkontrollen wurden jeweils doppelt mitgeführt. Unregelmäßigkeiten konnten nicht festgestellt werden, die Validität der Teste war in allen Fällen gegeben.
- Unterschiede bezüglich der Titerhöhen in den jeweils untersuchten Kohorten: In der vorliegenden Studie könnten vermehrt niedere Titer aus lange zurückliegenden Infektionen rechnerisch zu einer niedrigeren Sensitivität führen. Dagegen spricht, dass in der Schafherde mit hoher BDV-Antikörperprävalenz bei allen Altersgruppen

(Nr. 15) und damit nachgewiesener aktueller Infektion auch nur eine Sensitivität von 84,3 % (50 Seren) erreicht wurde.

- Regionale Unterschiede der zugrundliegenden Infektionsstämme: Die ELISA-Platten sind mit BVDV-1 Antigen (Stamm Osloss) beschichtet. Aufgrund der Kreuzreaktivität der Pestiviren ist sowohl der Nachweis von BVDV- als auch von BDV-Antikörpern prinzipiell gut möglich, wie auch mit den vorliegenden Daten bestätigt werden kann. Allerdings ist eine geringere Affinität der Antikörper gegen antigenetisch entfernte Pestiviren im Vergleich zu BVDV-Osloss auf der Testplatte zu erwarten. Auch dies kann durch die vorliegenden Daten belegt werden. Vergleicht man die SNT-Titer mit den OD-Werten des indirekten ELISA, so ergibt sich für ELISA-Test homologe Infektionen mit BVDV-1 und für heterologe Infektionen mit BDV ein klares Bild: Bei 53 als BVDV-1 typisierten Seren mit einem mittleren SNT-Titer von $2^{7,6}$ (geometrisches Mittel) liegt der mittlere OD_{corr} Wert bei 0,614, bei den 47 Border Disease-Seren mit dem höheren mittleren SNT-Titer von $2^{9,5}$ liegt der mittlere OD_{corr} Wert deutlich niedriger bei 0,422. Insofern kann durchaus angenommen werden, dass die regionale Verteilung der Stämme ursächlich für die Sensitivitätsunterschiede ist. Für einen zeitnahen Vergleich der Prävalenz unterschiedlicher Pestivirusstämme in den Regionen gibt es keine hinreichend Datengrundlage.
- Unterschiede im Referenzsystem: In der Arbeit von Krametter wurden positive Seren auch mittels SNT näher differenziert und 96,2% (n=51) BVDV-1 bzw. 1,9% (n=1) BVDV-2 zugeordnet. Neutralisationsteste mit BDV wurden nicht durchgeführt, wodurch eine „BVDV-Lastigkeit“ die Sensitivitätsberechnung entstanden sein kann.
- Für Pestivirusantikörper in Ziegenserien kann mit den vorliegenden Ergebnissen nur sehr begrenzt eine Aussage zur Testsensitivität gemacht werden. Es wurden nur in einem Betrieb sechs seropositive Ziegen identifiziert, zwei dieser Seren wurden als BVDV-2-typisiert, die restlichen vier Seren wurden als indifferent gewertet, wenngleich tendenziell höhere BVDV-2-SNT-Titer gemessen wurden. Da die ELISA-Platten mit BVDV-1 beschichtet sind, ist es wahrscheinlich, dass die zwei falsch negativ getesteten Seren mit den antigenetischen Unterschieden erklärt werden können. Die 25 positiven Ziegenserien der Krametter-Studie wurden als BVDV-1 typisiert.

Trotz der Sensitivitätzmängel wurde der Test für die weiteren Untersuchungen der Studie mit angewendet. Selbst bei einer Sensitivität von nur 80% ist er als *Screening*-Test zur Findung persistent Pestivirus-infizierter Herden geeignet, da in diesen Fällen im allgemeinen Stichprobenuntersuchungen mit 5 oder mehr Probanden durchgeführt werden und eine hohe

Seroprävalenz in der Herde vorliegt, wie auch das Beispiel des Studienbetriebs Nr. 15 zeigt. Kritisch zu betrachten ist die Anwendung dieses Testes zur Beurteilung der Seroprävalenz und zur Festlegung des Einzeltierstatus bei negativem Testergebnis.

Als zusätzlicher Test wurde deshalb ein *Blocking*-ELISA eingesetzt. Mehrfach wurde zur Prävalenzermittlung von Pestivirusantikörpern bei kleinen Wiederkäuern ein *Blocking*-ELISA für Antikörper gegen Pestivirus NS3 verwendet (Alba A., 2008; Berriatua et al., 2006; Tavella A., 2007). Beim hochkonservierten NS3-Protein sind Kreuzreaktionen mit allen Pestiviren bekannt, weshalb dieser Test prinzipiell unabhängig vom Infektionsvirus eingesetzt werden kann. Außerdem bedingt das Testprinzip die Tierarten-unabhängige Verwendbarkeit, da das Konjugat gegen NS3 gerichtet ist. In dieser Arbeit erzielte der *Blocking*-ELISA eine Sensitivität von 93% (Schaf N=152) bzw. 100% (Ziege, nur N=6 SNT-positive Proben) und Spezifitäten von 100% bei beiden Tierarten. Einschränkend ist anzumerken, dass bei der Untersuchung von vier Seren mit negativem Ergebnis der SNTs bei der Erstuntersuchung *Blocking*-Werte knapp über dem *cut off* von 50% erbrachten, welche in einer Wiederholungsuntersuchung nicht bestätigt werden konnten.

Zusammenfassend ist feststellen, dass sowohl der in der vorliegenden Arbeit verwendete indirekte ELISA als auch der *Blocking*-ELISA gut als *Screening*-Teste für die Detektion von Herden mit hoher Antikörperprävalenz geeignet sind. Zur Qualifizierung des Antikörperstatus von Einzeltieren ist der *Blocking*-ELISA vorzuziehen.

5.2 BEWERTUNG DER SNT-ERGEBNISSE

Die mittels ELISA positiv bewerteten Seren wurden anhand dreier Neutralisationsteste genauer differenziert bezüglich der zugrundeliegenden Infektion. Zwei der sechs positiven Ziegenserien wurden BVDV-2 zugeschrieben, die restlichen vier Seren lieferten indifferente Ergebnisse. Bei den 83 positiven Schafserien lag folgende Verteilung vor: BVDV-1 24,1%, BVDV-2 1,2%, BVDV 4,8%, BDV 48,2%, indifferent 21,7%.

Auffällig sind die vielen indifferenten Ergebnisse. Die Neutralisationsteste wurden mit BVDV-1c (PT810) und BVDV-2 (CS8644) durchgeführt, um die bei Rindern hauptsächlich vorkommenden Pestivirusstämme abzudecken. Zur weiteren Differenzierung wurde nur ein BDV-2-Stamm verwendet. Dies könnte ein Grund für die vielen indifferenten Ergebnisse sein. Von einigen Autoren wurde konstatiert, dass die antigenetische Vielfalt der ovinen

Pestiviren ausgeprägter ist als bei anderen Pestiviren. Die "klassischen" Border Disease Viren werden laut Becher als BDV-1 klassifiziert, strukturell und antigenetisch ähnliche Viren als BDV-2 (Becher et al., 2003). Die restlichen BDV-Genotypen wie Gifhorn differieren antigenetisch deutlich von BDV-1 und -2. Deswegen hätte die Verwendung eines weiteren BDV-Stammes wie z.B. BDV-1-Moredun zu deutlicheren Titerunterschieden bei den SNT-Ergebnissen führen können, zumindest in dem Betrieb, in dem BDV nachgewiesen wurde. Hier wurden in 40 von 50 Seren BDV-spezifische Antikörper nachgewiesen, ein weiteres Serum wies den höchsten Titer gegen BVDV-1 auf, die restlichen Seren wurden als indifferent gewertet. Der BVDV-1-Titer könnte in diesem reinen schafhaltenden Betrieb durchaus auf den Kontakt zu Rindern und eine daraus resultierende BVDV-Infektion zurückzuführen sein, da diese Schafe in Hütehaltung gehalten werden und so potentiell Kontakt zu Rindern aufnehmen können. Bei den verbleibenden neun aufgrund zu geringer Titerunterschiede indifferenten Fällen wäre vielleicht eine Zuordnung zu einem antigenetisch entfernten BDV möglich. Stark gegen diese Hypothese spricht, dass mit dem verwendeten BDV-Stamm weitgehend hohe Titer bis zu 2^{13} erzielt wurden. Daher kann angenommen werden, dass bei diesem Betrieb mindestens ein Feldsstamm, der den Infektionen zugrunde lag, antigenetisch nahe zu dem im SNT verwendeten BDV-Stamm lag. Eine mehrfache Infektion mit verschiedenen Pestiviren als Ursache für die indifferenten Kreuzneutralisationstiter ist nicht ausgeschlossen, zumal ja auch bei einem Schafserum aus dieser Herde eindeutig BVDV-1-spezifische Antikörper vorlagen.

Führt man die Verteilungsberechnung bezogen auf die 25 Seren durch, bei denen Antikörper als BVDV-spezifisch typisierbar waren, erhält man folgende Vorkommenshäufigkeiten: BVDV-1 80,0%, BVDV-2 4%, BVDV 16,0%. In ähnlichen Arbeiten wurden in etwa die gleichen Werte ermittelt. In Österreich lag die Verteilung bei 85% für BVDV-1 und 1% für BVDV-2 (Krametter-Frotscher et al., 2007), in Nordirland wurden bei allen positiven Seren, die näher untersucht wurden (n=14), höhere Titer gegen BVDV-1 ermittelt (Graham et al., 2001). Auch in Indien wurden Studien zu diesem Thema durchgeführt, hier dominierte ebenfalls Genotyp 1 mit 85,2% weit vor Genotyp 2 mit 1,6%. Ferner wurden in dieser Studie 13,1% (n=8) der Seren als indifferent deklariert (Mishra et al., 2009).

Die Auswertung der Ziegenserien des einzigen seropositiven Betriebes ergab die Zuordnung zu BVDV-2 in zwei Fällen und vier indifferenten Ergebnisse, bei denen der BVDV-2-Titer ebenfalls etwas höher lag als der des Genotyp 1. In der vorliegenden Arbeit konnte somit nachgewiesen werden, dass unter natürlichen Bedingungen eine Infektion mit dem bovinen Genotyp 2 stattgefunden hat. In den oben genannten seroepidemiologischen Studien aus Österreich und Indien wurde ebenfalls ein geringer Prozentsatz an BVDV-2-Infektionen bei Ziegen beschrieben. In Österreich wurden 1,6%, in Indien 3,0% der positiven Ziegenserien

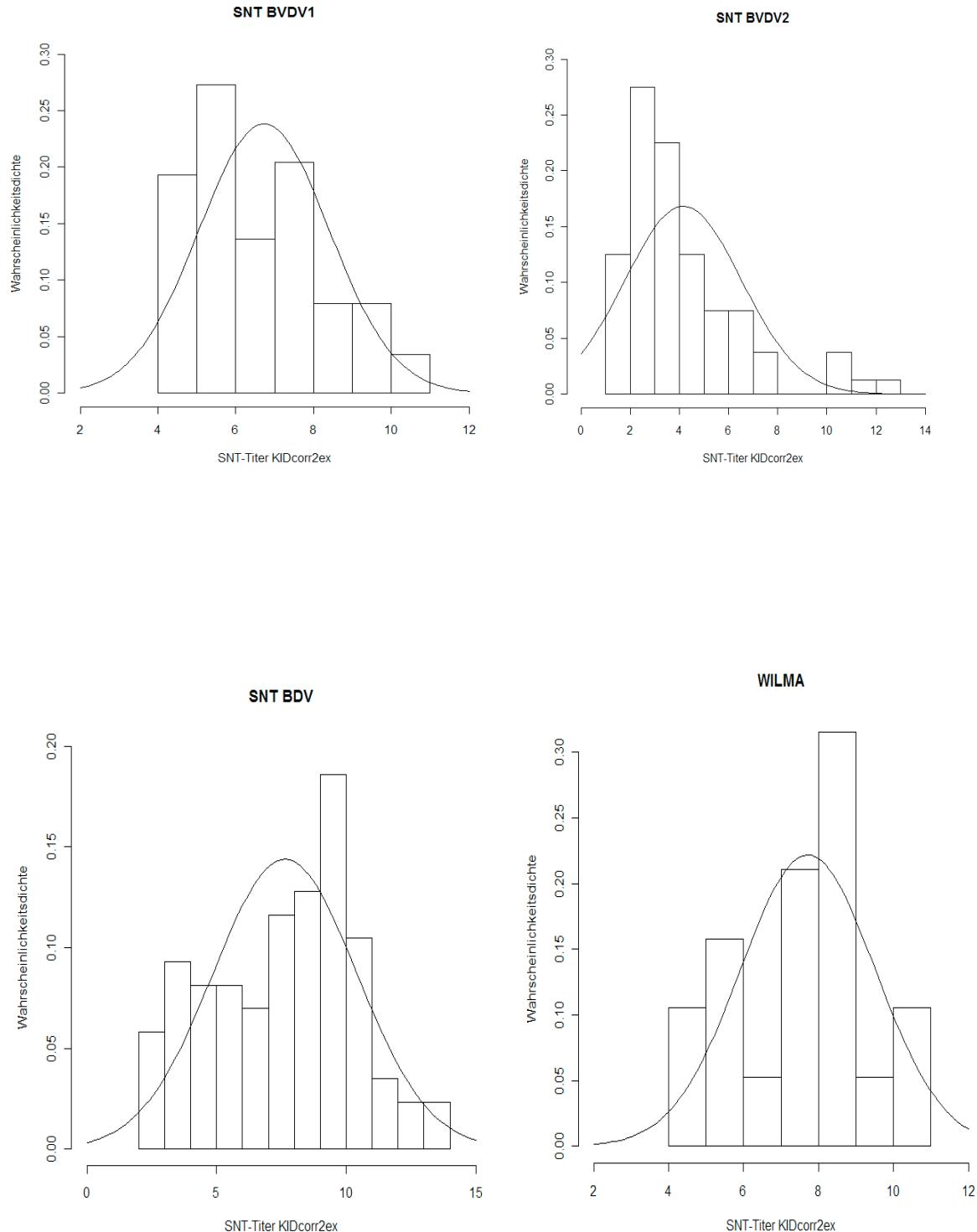
BVDV-2 zugeordnet. In diesem bayerischen Betrieb wurden insgesamt 398 Ziegen gehalten, die alle geblutet wurden. Auf diese Herde bezogen waren 1,5% der Tiere positiv. Dieser Wert lässt allerdings keinen Rückschluss zu, wie viele Ziegen tatsächlich infiziert wurden, da die BVDV-2-Infektion der Rinder zwei Jahre zurücklag. 91 der untersuchten Ziegen waren zum Zeitpunkt der Infektion noch nicht im Bestand, während ein Teil der Ziegen, die eventuell Kontakt zu PI-Rindern hatte, bereits aus dem Bestand ausgeschieden waren.

5.3 STATISTISCHE BETRACHTUNG ZU DEN NEUTRALISATIONSTESTEN

Die Neutralisationsteste wurden mit BVDV-1, -2 und BDV durchgeführt. Ferner wurde in einem Betrieb zusätzlich das im Bestand zirkulierende homologe Virus für den SNT verwendet. Da es sich bei den SNT-Titern ebenso wie bei den ELISA-Daten um metrisch skalierte Daten handelt, kann zur Prüfung der Normalverteilung wieder der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet werden. Bei diesem Test kommt es zu folgenden Ergebnissen: Die Annahme der Normalverteilung kann bei den SNTs von BVDV-1 und BVDV-2 auf einem Signifikanzniveau von 5% verworfen werden, die Werte des BDV- und BVDV-1 (Wilma)-STNs könnten dagegen eine Normalverteilung aufweisen. Entsprechende P-Werte lauten: $p_{BVDV-1}=0,046$, $p_{BVDV-2}=0,017$, $p_{BDV}=0,560$ und $p_{Wilma}=0,560$. Folgende Abbildungen zeigen die Histogramme der verschiedenen SNT-Titer im Vergleich mit der jeweiligen Dichtefunktion der Normalverteilung. In die Histogramme flossen die Titer aller seropositiven Proben ein; bei Schafen, bei denen Verlaufsuntersuchungen durchgeführt wurden, wurden die Mittelwerte herangezogen. Die Seren, die im SNT negativ getestet wurden, sind in die Darstellung nicht mit einbezogen worden. In den Abbildungen ist die relative Häufigkeit der positiven Ergebnisse in Bezug auf die Gesamtheit aller Ergebnisse dargestellt. Die Titer sind als reziproke Exponenten zur Basis 2 angegeben.

Abbildung 22: Häufigkeitsdichte der SNT-Titer

Titer aller seropositiven Seren ($N_{BVDV-1}=86$, $N_{BVDV-2}=83$, $N_{BDV}=85$, $N_{BVDV-1\text{ Wilma}}=20$, bei Verlaufsuntersuchungen ist nur ein Wert einbezogen worden



Bei den Werten des BVDV-1- und BVDV-2-SNTs liegt keine Normalverteilung vor, was durch die verwendeten Stämme erklärt werden kann. Aufgrund der Diskriminierbarkeit der verwendeten Stämme werden deutliche Titerunterschiede positiver Seren in den beiden SNTs erwartet. Genau diese Tatsache spiegeln die oben abgebildeten Histogramme wider: Seren, die hohe Titer im BVDV-1-SNT aufwiesen ergaben im BVDV-2-SNT niedrige Werte und umgekehrt. Im BVDV-2-Histogramm fällt die Häufung im niedrigen Bereich auf. Es wurden insgesamt nur wenige BVDV-2-Seren identifiziert. Der überwiegende Teil der positiven Seren wurde BVDV-1 und BDV zugeordnet und wies niedrigere Titer gegen BVDV-2 auf. Diese Seren stellen in diesem Histogramm die Häufung im linken Bereich dar. Die Ausreißer im rechten Bereich waren Ergebnisse von vier Ziegenserien aus einem Betrieb, in dem bei zwei Seren eine eindeutige BVDV-2 Spezifizierung möglich war. Das Histogramm des BVDV-1 SNTs kann ähnlich interpretiert werden; der zweigipflige Verlauf der Säulen spricht für eine Überlagerung durch BVDV-2- und BDV-Seren in den niedrigen Bereichen, der zweite *Peak* im Bereich acht stellt die BVDV-1-Seren dar.

Bei dem BDV-SNT konnte rechnerisch eine Normalverteilung nicht abgelehnt werden. Betrachtet man das Histogramm genauer, sind in zwei Bereichen Kumulationen erkennbar. Von den 83 positiven Seren wurden 48 auf eine BDV-Infektion zurückgeführt. Diese Seren bilden den rechten Bereich des Histogramms. Die linke Ansammlung niedriger Werte ist auf BVDV-1- und -2-Proben zurückzuführen. Aufgrund der antigenetischen Vielfalt der BDV könnte davon ausgegangen werden, dass der verwendete BDV2-Stamm eventuell ungünstig gewählt wurde und ein anderer BDV-Stamm eindeutigere Ergebnisse geliefert hätte. Dieser Hypothese kann anhand des Histogramms widersprochen werden: Die Ergebnisse des BDV-Betriebes heben sich deutlich ab von den niedrigeren Werten der BVDV-Seren, somit ist eine Diskriminierbarkeit mit den verwendeten Stämmen gegeben.

Bei den Werten des BVDV-1-Wilma-SNTs konnte die Annahme der Normalverteilung rechnerisch bestätigt werden, allerdings bezieht sich diese Aussage nur auf 20 Werte und ist deshalb nicht sehr aussagekräftig.

5.4 BETRACHTUNGEN ZU PESTIVIRUS-ANTIKÖRPER-PRÄVALENZEN

Die serologischen Untersuchungen der Schaf- und Ziegenserien ergaben folgende Ergebnisse: 1013 Schafe wurden insgesamt untersucht, davon waren 83 seropositiv und drei grenzwertig; von den 503 untersuchten Ziegenserien waren 6 antikörperpositiv. Die drei als grenzwertig eingestuften Schafserien werden in den folgenden Berechnungen als negativ gewertet. Daraus errechnet sich für Schafe eine Seroprävalenz von 8,2%. Bezogen auf die Betriebe beherbergten 12% aller untersuchten Bestände Seroreagente. Verglichen mit den Seroprävalenzen aus anderen europäischen Ländern wie z.B. Norwegen (4,5%), Dänemark (8,3%), England/Wales (10,8%) und Nordirland (5,3%) liegt Bayern mit einer Einzeltierprävalenz von 8,2% ebenfalls in dieser Größenordnung. Die Untersuchung der Ziegenserien ergab insgesamt sechs positive Seren. Die Seroprävalenz, bezogen auf 503 Ziegen aus insgesamt 17 Betrieben, betrug 1,2% (Einzeltiere) bzw. 5,9% (Betriebe). Diese Werte liegen unter den ermittelten Prävalenzen anderer europäischer Studien. So lag die Einzeltier-Prävalenz in Dänemark bei 8,3%, in Norwegen bei 3,6% und in Teilen von Österreich bei 11,5% (*Krametter-Frotscher et al., 2007; Loken, 1992; Tegtmeier et al., 2000*). Da allerdings die Zahl der untersuchten Betriebe in dieser Studie gering ist, kann der Wert nicht als repräsentativ angesehen werden.

Es wurden Betriebe aus allen sieben Regierungsbezirken Bayerns untersucht. In Mittelfranken (n=9), Oberpfalz (n=2) und Niederbayern (n=4) wurden keine Seroreagente bei kleinen Wiederkäuern gefunden, die Anzahl der untersuchten Betriebe war jedoch in allen drei Bezirken gering. Die höchsten Prävalenzwerte wurden in Unterfranken (2/7) und Schwaben (2/9), gefolgt von Oberfranken (2/17) und Oberbayern (5/43) ermittelt. Aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Betriebe ist ein signifikanter Unterschied nicht zu entnehmen. In den rinderhaltenden Betrieben ergab sich folgende regionale Verteilung: In Oberbayern wiesen 5 der 11 Betriebe, in denen ein BVDV-Status der Rinder festgelegt werden konnte, eine positive BVDV-Serologie auf; in Schwaben waren es fünf von sechs und in Unterfranken zwei von fünf untersuchten Betrieben. In den restlichen vier Regierungsbezirken Mittelfranken (2/7), Oberfranken (2/9) und der Oberpfalz (1/2) war die Zahl der untersuchten Betriebe ebenso wie die Anzahl der seropositiven Bestände gering. In Bayern liegt der Schwerpunkt der Rinderhaltung in Oberbayern und Schwaben, gefolgt von Niederbayern, Oberpfalz und Mittelfranken. In Oberfranken und Unterfranken ist die Zahl der Rinder vergleichsweise gering. Um einen Zusammenhang zur Viehdichte genauer zu

untersuchen müssten deutlich mehr Betriebe aus den einzelnen Regionen untersucht werden.

In vielen bergnahen Regionen Oberbayerns werden traditionell Schafe, Ziegen und Rinder im Sommer gealpt. In Österreich wurden höhere Seroprävalenzen in Gegenden ermittelt, in denen diese Form der Gemeinschaftsweide seit jeher betrieben wird (Schiefer et al., 2006). Durch den längeren, direkten Kontakt kommt es nach Meinung der Autoren zu häufigeren speziesübergreifenden Pestivirusinfektionen. Bestärkt wurde diese These durch Untersuchungen von Rindern und Schafen vor und nach der Weidesaison. Krametter-Frötscher wies einen signifikanten Anstieg der seropositiven Schafe nach (Krametter-Froetscher et al., 2007). In der hier vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Schafe nach dem Almabtrieb untersucht. Bei Schafen ($p=0,875$) und Rindern ($p=0,574$) wurde kein signifikanter Zusammenhang festgestellt zwischen seropositiven Tieren und deren Auftrieb auf Gemeinschaftsweiden. Bei den Rindern war allerdings die Anzahl der Betriebe sehr gering, da nur neun Betriebe ihre Tiere auf Gemeinschaftsweiden gaben, wovon in fünf Fällen kein BVD-Status der Rinder ermittelt werden konnte, da die Tiere auf Almen nicht fixierbar waren.

5.5 BEWERTUNG DER PER FRAGEBOGEN ERFASSTEN KLINISCHEN DATEN

Die Tierhalter wurden danach befragt, ob bei den Tieren klinische Symptome aufgetreten waren, die Hinweise auf eine BVDV- bzw. BDV-Infektion geben könnten. Die Auswertung der Daten der rinderhaltenden Betriebe zeigten keine signifikanten Unterschiede auf zwischen seropositiven und serologisch naiven Betrieben; so lagen die p-Werte für Läsionen an der Maulschleimhaut, Durchfall, Aborte und dem Auftreten von Früh- und Totgeburten bei 0,112; 0,251; 0,623 und 0,174. Bei den Schafen lagen die p-Werte dieser Symptome bei 1, da in keinem der Betriebe, in denen Antikörper gefunden wurden, klinische Symptome beobachtet wurden. Neben den häufig in der Literatur beschriebenen subklinischen Verläufen von Pestivirus-Infektion könnte auch mangelnde Beobachtung seitens der Tierhalter vorliegen. Ein weiterer Grund für die geringe Nennung von klinischen Symptomen liegt in der Mentalität vieler Schafhalter. Bei etwa einem Drittel der Betriebe konnten fast keine näheren Angaben zu klinischen Symptomen erfragt werden, da die Schafhalter zwar ihre Tiere für die Blutentnahme zur Verfügung stellten, aber ansonsten der Studie eher verhalten gegenüber

standen. Viele Schafhalter befürchteten Nachteile durch die Untersuchung der Tiere. In dem einzigen Betrieb, in dem BDV nachgewiesen wurde, waren aufgrund der mangelnden Kooperation des Besitzers kaum Angaben über den Krankheitsverlauf in der Herde zu eruieren. Obwohl kurz nach dem Betriebsbesuch ein *Hairy Shaker*-Lamm geboren wurde, war der Tierbesitzer an keiner weiteren Diagnostik interessiert.

5.6 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE DER GENOTYPISIERUNG VON RINDERISOLATEN BEZÜGLICH DER PESTIVIRUSÜBERTRAGUNG VON KLEINEN WIEDERKÄUERN

Im Rahmen der Genotypisierungen der Pestivirusisolale konnten nur die beiden Genotypen des BVD-Virus nachgewiesen werden. Keines der Isolate wurde BDV zugeordnet. Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Autoren, wonach eine BDV-Infektion bei Rindern äußerst selten vorkommt (Hornberg et al., 2009). Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass dieses schaf- und ziegenassoziierte Pestivirus nur eine geringe Gefahr für BVDV-freie Rinderpopulationen darstellt. Andererseits sollte man die kleinen Wiederkäuer dennoch nicht ganz außer Acht lassen. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass das BVD-Virus sowohl experimentell als auch unter natürlichen Bedingungen von Rindern auf kleine Wiederkäuer übertragen werden kann (Campbell et al., 1995; Carlsson, 1991). Ebenso sind sowohl Schafe als auch Ziegen bekannt, die persistent mit BVDV infiziert waren (Nelson et al., 2008; Scherer et al., 2001). Aber auch Infektionen mit dem Border Disease Virus, die bei Rindern zu Serokonversionen und Aborten führten, sind in der Literatur beschrieben worden (Carlsson and Belak, 1994; Loken et al., 1991a). Wird im Zuge der BVD-Bekämpfung eine vollständige Eradikation des BVD-Virus und die Schaffung antikörperfreier Herden angestrebt, könnten die kleinen Wiederkäuer an Bedeutung gewinnen. Trifft ein PI-Schaf oder eine PI-Ziege auf eine naive Rinderherde, kann dies verheerende Auswirkungen haben. Dem könnte vorgebeugt werden durch Einbeziehung der kleinen Wiederkäuer in Untersuchungsprogramme, insbesondere auch durch die Untersuchung von Importtieren. Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, existieren gut funktionierende, kommerziell erhältliche *Screening*-ELISAs für die Untersuchung von Seren kleiner Wiederkäuer.

5.7 SCHLUSSBEMERKUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten ausschließlich Proben aus Betrieben untersucht werden, die durch persönliche Kontakte rekrutiert wurden. Dies war der einzige effektive Weg, an Seren kleiner Wiederkäuer zu gelangen. Die Resonanz der Schafhalter, an der Studie teilzunehmen war gering. Um eine Prävalenzstudie für ganz Bayern erstellen zu können, wäre die Untersuchung einer größeren Zahl von Betrieben nötig. Unter den gegebenen Bedingungen war diese Zahl nicht zu erreichen, weswegen die Nutzung von Blutproben, die im Rahmen der pflichtgemäßen Tierseuchenbekämpfung gezogen werden, von großem Nutzen gewesen wäre. Alle Bemühungen, auf diesem Weg an Seren zu gelangen, scheiterten an Datenschutzbestimmungen. Es wäre wünschenswert, dass künftig die Zugänglichkeit zu solchen Seren erleichtert wird.

Gundula Egger:

„Untersuchungen zum Vorkommen von Pestiviren beim kleinen Wiederkäuer und Border Disease Virus (BDV) beim Rind in Bayern“

6 ZUSAMMENFASSUNG

Über einen Zeitraum von 1,5 Jahren wurden von 1013 Schaf-, 503 Ziegen- und 555 Rindern Blutproben aus 100 bayerischen Betrieben gezogen und auf das Vorhandensein von Pestivirus-Antikörpern bzw. BVDV/ BDV untersucht. Zum Antikörpernachweis wurden kommerziell erhältliche ELISAs verwendet: Ein indirekter ELISA (Svanovir BDV-Ab-ELISA, Svanova) und ein *Blocking*-ELISA (Procheck BVDV-Ab-ELISA, Prionics) für Seren kleiner Wiederkäuer und ein weiterer indirekter ELISA (Svanovir BVDV-Ab-ELISA, Svanova) für Rinderseren. Weiterhin wurden 325 Pestivirus-Isolate aus bayerischen Rindern mittels Multiplex *real time* RT-PCR (Cador BVDV Type 1 / 2 BDV RT-PCR, Qiagen) typisiert.

Die Einzeltierprävalenz betrug bei Schafen 8,2% und bei Ziegen 1,2%. Bezogen auf 91 schafhaltende Betriebe lag die Prävalenz bei 12,0%, in einem von 17 Betrieben wurden Pestivirusantikörper bei Ziegen gefunden. Mit Kreuzneutralisationstesten wurden die Antikörper typisiert: Bei den Schafseren waren 24,1% BVDV-1-, 1,2% BVDV-2-, 4,8% BVDV-1- oder 2- und 48,2% BDV-spezifisch. Die BDV-spezifischen Seren stammten alle aus einem Betrieb. Die verbleibenden 21,7% konnten wegen nur geringer Titerunterschiede zu den SNT-Stämmen nicht typisiert werden. Alle sechs Ziegenserien stammten aus einer Herde, sie wiesen jeweils den höchsten Titer gegen BVDV-2 auf, in zwei Fällen mit einem mehr als vierfachen Abstand zu BVDV-1 und BDV.

Eine signifikant höhere Anzahl an seropositiven kleinen Wiederkäuern ($p= 0,003$) stammte aus Betrieben mit Rinderhaltung. BVDV-Infektionen von Rindern zu kleinen Wiederkäuern wurden beobachtet, wohingegen keine Hinweise für die Übertragung von Pestiviren von kleinen Wiederkäuern zu Rindern oder für die Persistenz von BVDV in kleinen Wiederkäuern vorhanden waren.

Die Genotypisierung der 325 Pestivirus-Isolate aus Rindern lieferte folgendes Ergebnis: 91,4% erwiesen sich als BVDV-1 und 8,6% als BVDV-2, BDV wurde nicht gefunden.

Anhand von 128 Schafseren mit neutralisierenden Antikörpern wurden Sensitivitäten von 81% für den indirekten ELISA und 94% für den *Blocking*-ELISA bestimmt. Die Spezifitäten lagen jeweils bei 93% and 100% (N=200 SNT-negative Seren).

Gundula Egger:

„Prevalence of pestiviruses in small ruminants and Border Disease Virus (BDV) in cattle in Bavaria“

7 SUMMARY

Serological examinations were carried out to investigate the prevalence of pestiviral infections in small ruminants in Bavaria. Blood samples from 1013 sheep, 503 goats and 555 cattle were collected from 100 flocks, partially with different ruminant species. The samples were tested for antibodies against pestiviruses using commercially available ELISAs: An indirect ELISA (Svanovir BDV-Ab-ELISA, Svanova), a blocking-ELISA (Priocheck BVDV-Ab-ELISA, Prionics) for small ruminants' sera and an indirect ELISA (Svanovir BVDV-Ab-ELISA, Svanova) for bovine samples. Furthermore 325 bavarian bovine pestivirus field isolates were typed by a multiplex real time RT-PCR (Cador BVDV Type 1 / 2 BDV RT-PCR, Qiagen).

Pestivirus antibodies were found in 8.2% of sheeps and 1.2% of goats. The herd prevalence of 91 sheep flocks was 12.0%, seropositive goats were found in one of the 17 herds.

With neutralization assays antibodies from sheep were typed as BVDV-1 (24.1%), BVDV-2 (1.2%), BVDV-1 or -2 (4.8%) and BDV (48.2%) specific. All BDV-specific sera were out of one farm. The remaining 21.7% were not specified because of low differences to all SNT-strains. All six samples from goats being from one herd showed highest titres to BVDV-2 with a distance of more than fourfold to BVDV-1 and BDV in two cases.

A significant higher herd seroprevalence of pestivirus antibodies in small ruminants ($p=0,003$) was found on mixed farms with cattle. Transmissions of BVDV from cattle to small ruminants were observed, whereas no evidence for BVDV-persistence in small ruminants or transmission of pestiviruses from small ruminants to cattle was found.

The genotyping of the 325 bovine Pestivirus isolates resulted in 91.4% BVDV-1 and 8.6% BVDV-2, BDV could not be found.

Out of 128 sheep sera with neutralizing antibodies, sensitivities of 81% for the indirect ELISA and 94% for the *blocking*-ELISA were determined. The specificities were 93% and 100%, respectively (N=200 SNT-negative sera).

8 ANHANG

8.1 MATERIALLISTE

8.1.1 GERÄTE UND LABORHILFSMITTEL

1. Begasungsbrutschrank: Typ B5061 (für SNT, 37° C, 5% CO₂, 50-70% Luftfeuchte); Heraeus Instruments, Hanau
2. Einwegkanülen: Neolus (Nr. 1 Luer 0,9 x 40mm) Terumo®, Terumo, Leuven, Belgien
3. Einwegspritzen (1ml, 5ml), Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
4. Fluoreszenzmikroskop: Typ Axiovert 25, Zeiss, Jena
5. Laborglaswaren: Schott Glas, Mainz
6. Messpipetten aus Glas: Silberbrand Eterna Klasse B (1ml, 5ml, 10ml), Brand, Wertheim
7. Mikrotiterplatten für Durchflußzytometrie: Microtest plate 96-well (U-Boden), Sarstedt, Nümbrecht
8. Mikrotiterplatten für SNT: Zellkulturplatte 96-Loch (Flachboden), Nunclon™ Surface, Nunc, Roskilde, Dänemark
9. Optical Tube, 8x Stripe Otb 120, Stratagene, Amsterdam, Niederlande;
10. Optical Cap, 8x Stripe Otb 120, Stratagene, Amsterdam, Niederlande;
11. Pipetten:
 - 11.1 Research (0,1-2,5µl, 0,5-10µl, 100-1000µl), Eppendorf, Köln
 - 11.2 Reference (2-20µl, 20-200µl), Eppendorf, Köln

- 11.3 Mehrkanalpipette (25-200µl) Nr. 06200-12, SLG Süd-Laborbedarf, Gauting
12. Pipettenspitzen: Sarstedt, Nümbrecht
13. Pipettierhilfe: Accu-Jet, Brand, Wertheim
14. Polypropylenrörchen (15ml, 50ml), Nunc, Roskilde, Dänemark
15. Proben-Schraubgefäße, 2ml, PP, Sarstedt, Nümbrecht;
16. Probenrörchen:
- 16.1 Monovetten® (Serummonovetten und EDTA stabilisierte Monovetten), Sarstedt, Nümbrecht
- 16.2 Vacutainer Blutentnahmesystem, Serumrörchen 10ml, EDTA-Rörchen 10 ml, Kanülen 20gx1 ½ Becton Dickinson, Heidelberg
17. Schüttler für Mikrotiterplatten: Typ MTS4; IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
18. Sicherheitswerkbank: *Hera safe*-Heraeus, Klasse 2, Typ H, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
19. Thermocycler Mx3005P (Stratagene)
20. Vortexer: Vortex-Genie, Mod. K550-GE, Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
21. Wasserbad: Typ HWR, Daglef Patz KG, Wankendorf
22. Zellkulturflaschen (80cm₂, 175cm₂), Nunc, Roskilde, Dänemark
23. Zentrifugen:
- 23.1 Sepatech Megafuge 1.0 mit Rotoren Nr. 3471 und Nr. 2150, Heraeus Instruments, Osterode
- 23.2 Centrifuge 5810R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
24. Zytofluorometer: FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg
25. Zytofluorometer Software: Cell Quest Pro, Becton Dickinson, Heidelberg

8.1.2 KOMMERZIELLE KITS

1. cador BVDV Type 1/2 BDV RT-PCR, Qiagen, Hilden
2. High Pure Viral RNA Kit, Roche Diagnostics, Penzberg
3. Priocheck BVDV-Ab-ELISA, Prod.nr. 7588940, Hersteller: Prionics, Switzerland
4. Svanovir BDV-Ab-ELISA, Prod.nr. 10-8100-02, Hersteller: Svanova, Uppsala
5. Svanovir BVDV-Ab-ELISA, Prod.nr. 10-2200-02, Hersteller: Svanova, Uppsala

8.1.3 CHEMIKALIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

1. *AlexaFluor®488* Invitrogen, USA;
2. Antibiotika (dem SNT-Medium zugesetzt):
 - 2.1 Penicilin G, Grünenthal, Stolberg
 - 2.2 Streptomycin, Hefa Pharma, Werne
3. Digitonin: D-1407, Sigma Deisendorf
4. EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Merck, Darmstadt
5. FACS-Puffer: 10mM Hepes, 10mM EDTA, 2% (w/v) Natriumazid, ad 1l PBS ohne Mg^{2+} / Ca^{2+}
6. Fetales Kälberserum (FKS): *Fetal Bovine Serum*, Biochrom KG, Berlin
7. Hämolysepuffer pH 7,4: 8,29g NH_4Cl , 1,0g $KHCO_3$, 1mM EDTA, ad 1l Aqua demin.
8. Hepes, Sigma, Deisendorf
9. *MEM-Minimum-Essential-Medium Eagle* (MEM), Sigma-Aldrich, Steinheim;
 $NaHCO_3$ (8,8%ig), 300000E/l Penicillin, 200mg/l Streptomycin

10. Monoklonale Antikörper WB 103/105, C.C.Pro GmbH, Neustadt an der Waldnaab, Central Veterinary Laboratory Weybridge
11. NaCl (Natriumchlorid), Merck, Darmstadt;
12. Na₂HPO₄ (Natriumhydrogenphosphat), Merck, Darmstadt;
13. NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat), Merck, Darmstadt;
14. NH₄Cl (Ammoniumchlorid) Merck, Darmstadt;
15. Nichtessentielle Aminosäuren (*Non-Essential Amino Acids*) 100x (SNT-Medium zugesetzt), Biochrom AG, Berlin
16. Paraformaldehyd, Sigma, Deisendorf
17. PBS ohne Mg²⁺ / Ca²⁺: 8g NaCl, 0,2g KCl, 2,37g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,2g KH₂PO₄, ad 1l Aqua denim.
18. Propidiumjodid, Sigma, Deisendorf

8.1.4 ZELLEN

KOP-R Zelllinie (Rind, Pharynxgewebe), ZBV Insel Riems

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ab	<i>Antibodies</i>
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Aqua demin.	Aqua demineralisata
BD	Border Disease
BDV	Border Disease Virus
Betr.nr.	Betriebsnummer
BKF	Bösartiges Katharralfieber
BVD	Bovine Virus Diarrhoe
BVDV	Bovines Virus Diarrhoe Virus
bzw.	Beziehungsweise
cp	Zytopathogen
CSFV	<i>Classical Swine Fever Virus</i>
CT	<i>threshold cycle</i>
°C	Grad Celsius
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
E ^{rns}	envelope,ribonuclease soluble
etc.	et cetera
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
ggrd.	Geringgradig
häm.	Hämolytisch
hgrd.	Hochgradig
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
JT	Jungtier
kB	Kilobasen
KID ₅₀	50% kulturinfektiöse Dosis
km	Kilometer
Labornr.	Labornummer
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
mAK	monoklonale Antikörper
max.	Maximal
MD	Mucosal Disease
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
N	Anzahl
ncp	nicht zytopathogen

neg.	Negative
nm	Nanometer
NS	Nichtstrukturprotein
o.g.	oben genannten
OD	<i>Optical density</i>
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	persistent infiziert
pos.	Positiv
R	Rind
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
S	Schaf
s.	Siehe
sec.	Sekunde
SNT	Serumneutralisationstest
STV	Saline Versene Trypsin
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>Untranslated region</i>
V.	Vena
v.a.	vor allem
Wdk.	Wiederkäuer
Z	Ziege
z.B.	zum Beispiel

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Alba A., A.A., Serrano E., Casal J., 2008, Seroprevalence and spatial distribution of maedi-visna virus and pestiviruses in Catalonia (Spain). *Small Ruminant Research* 78, 80-86.
- Baker, J.C., 1995, The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 425-445.
- Barlow, R.M., Gardiner, A.C., Nettleton, P.F., 1983, The pathology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. *J Comp Pathol* 93, 451-461.
- Becher, P., Avalos Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo Rosales, S., Konig, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeier, H., Thiel, H.J., 2003, Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96-104.
- Becher, P., Konig, M., Paton, D.J., Thiel, H.J., 1995, Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology* 209, 200-206.
- Berriatua, E., Barandika, J.F., Aduriz, G., Hurtado, A., Estevez, L., Atxaerandio, R., Garcia-Perez, A.L., 2006, Flock-prevalence of border disease virus infection in Basque dairy-sheep estimated by bulk-tank milk analysis. *Vet Microbiol* 118, 37-46.
- Bolin, S.R., 1993, Immunogens of bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 37, 263-271.
- Brownlie, J., 1990, Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 23, 371-382.
- Brownlie, J., Hooper, L.B., Thompson, I., Collins, M.E., 1998, Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)--the bovine pestivirus. *Clin Diagn Virol* 10, 141-150.
- Campbell, J.R., Radostits, O.M., Wolfe, J.T., Janzen, E.D., 1995, An outbreak of border disease in a sheep flock. *Can Vet J* 36, 307-309.
- Carbrey, E.A., Stewart, W.C., Kresse, J.I., Snyder, M.L., 1976, Natural infection of pigs with bovine viral diarrhea virus and its differential diagnosis from hog cholera. *J Am Vet Med Assoc* 169, 1217-1219.
- Carlsson, U., 1991, Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec* 128, 145-147.
- Carlsson, U., Belak, K., 1994, Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet Scand* 35, 79-88.
- Carlsson, U., Fredriksson, G., Alenius, S., Kindahl, H., 1989, Bovine virus diarrhoea virus, a cause of early pregnancy failure in the cow. *Zentralbl Veterinarmed A* 36, 15-23.
- Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., Tremblay, R., Bolin, S., Godkin, A., Anderson, N., 1998, Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest* 10, 27-35.
- Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S.K., Retzel, E., 1988, Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208.
- Collett, M.S., Wiskerchen, M., Welniak, E., Belzer, S.K., 1991, Bovine viral diarrhea virus genomic organization. *Arch Virol Suppl* 3, 19-27.
- Corapi, W.V., Elliott, R.D., French, T.W., Arthur, D.G., Bezek, D.M., Dubovi, E.J., 1990, Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc* 196, 590-596.
- Cranwell, M.P., Otter, A., Errington, J., Hogg, R.A., Wakeley, P., Sandvik, T., 2007, Detection of Border disease virus in cattle. *Vet Rec* 161, 211-212.
- Depner, K., Hubschle, O.J., Liess, B., 1991a, BVD-virus infection in goats-experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. *Arch Virol Suppl* 3, 253-256.

- Depner, K., Hubschle, O.J., Liess, B., 1991b, Prevalence of ruminant pestivirus infections in Namibia. *Onderstepoort J Vet Res* 58, 107-109.
- Done, J.T., Terlecki, S., Richardson, C., Harkness, J.W., Sands, J.J., Patterson, D.S., Sweeney, D., Shaw, I.G., Winkler, C.E., Duffell, S.J., 1980, Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet Rec* 106, 473-479.
- Donis, R.O., 1995, Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 393-423.
- Doyle, L.G., Heuschele, W.P., 1983, Bovine viral diarrhea virus infection in captive exotic ruminants. *J Am Vet Med Assoc* 183, 1257-1259.
- Dubois, E., Russo, P., Prigent, M., Thiery, R., 2008, Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Vet Microbiol* 130, 69-79.
- Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R., Vogel, F.S., Gil, L.H., 2002, Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res* 87, 51-60.
- Frost, J.W., I. Westphäl und H. Krauss, 1991, Seroepidemiologische Untersuchungen bei Schafen in Süd- und Mittelhessen zur Verbreitung von Antkörpern gegen Border-Disease/BVD-Virus. *Tierärztl. Umschau* 42, 533-536.
- Fulton, R.W., Ridpath, J.F., Ore, S., Confer, A.W., Saliki, J.T., Burge, L.J., Payton, M.E., 2005, Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions: distribution of BVDV-1a, 1b, and 2a subgenotypes. *Vet Microbiol* 111, 35-40.
- Gillespie, J.H., Baker, J.A., Mc, E.K., 1960, A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet* 50, 73-79.
- Graham, D.A., Calvert, V., German, A., McCullough, S.J., 2001, Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. *Vet Rec* 148, 69-72.
- Gray, E.W., Nettleton, P.F., 1987, The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses. *J Gen Virol* 68 (Pt 9), 2339-2346.
- Grooms, D.L., 2004, Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20, 5-19.
- Hewicker-Trautwein, M., Liess, B., Trautwein, G., 1995, Brain lesions in calves following transplacental infection with bovine-virus diarrhoea virus. *Zentralbl Veterinarmed B* 42, 65-77.
- Hewicker-Trautwein, M., Trautwein, G., 1994, Porencephaly, hydranencephaly and leukoencephalopathy in ovine fetuses following transplacental infection with bovine virus diarrhoea virus: distribution of viral antigen and characterization of cellular response. *Acta Neuropathol* 87, 385-397.
- Hofmann, M.A., Brechtbuhl, K., Stauber, N., 1994, Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch Virol* 139, 217-229.
- Hornberg, A., Fernandez, S.R., Vogl, C., Vilcek, S., Matt, M., Fink, M., Kofer, J., Schopf, K., 2009, Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet Microbiol* 135, 205-213.
- Houe, H., 1995, Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11, 521-547.
- Hughes, L.E., G. F. Kershaw and I. G. Shaw, 1959, "B" or border disease. An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.* 71, 313-317.
- Hulst, M.M., Moormann, R.J., 1997, Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol* 78 (Pt 11), 2779-2787.
- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S., McCauley, J.W., 2004, Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J Virol* 78, 136-145.

- Kim, I.J., Hyun, B.H., Shin, J.H., Lee, K.K., Lee, K.W., Cho, K.O., Kang, M.I., 2006, Identification of bovine viral diarrhea virus type 2 in Korean native goat (*Capra hircus*). *Virus Res* 121, 103-106.
- Kirkland, P.D., Frost, M.J., Finlaison, D.S., King, K.R., Ridpath, J.F., Gu, X., 2007, Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res* 129, 26-34.
- Kleinschmidt, M. 2003. Abschätzung der Prävalenz von Infektionen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe in der Wildwiederkäuerpopulation in Zusammenhang mit der Weidehaltung von Rindern. Dissertation LMU München, pp. 68-70.
- Krametter-Froetscher, R., Kohler, H., Benetka, V., Moestl, K., Golja, F., Vilcek, S., Baumgartner, W., 2007a, Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: first identification of border disease virus in Austria. *Zoonoses Public Health* 54, 209-213.
- Krametter-Froetscher, R., Loitsch, A., Kohler, H., Schleiner, A., Schiefer, P., Mostl, K., Golja, F., Baumgartner, W., 2007b, Serological survey for antibodies against pestiviruses in sheep in Austria. *Vet Rec* 160, 726-730.
- Krametter, R. 2002, Pestivirusinfektionen bei Schafen und Ziegen in Österreich. Dissertation VU-Wien
- Kummerer, B.M., Meyers, G., 2000, Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of Bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J Virol* 74, 390-400.
- Kummerer, B.M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H., Meyers, G., 2000, The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol* 77, 117-128.
- Liebler, E., Johannsen, U., Pohlenz, J., 1995, [The hemorrhagic form of acute bovine virus diarrhea: literature review and case report]. *Tierarztl Prax* 23, 18-25.
- Lim, C.F., Carnegie, P.R., 1984, A survey of hairy shaker disease (border disease, hypomyelinogenesis congenita) in sheep. *Aust Vet J* 61, 174-177.
- Liu, L., Xia, H., Wahlberg, N., Belak, S., Baule, C., 2009, Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 385, 351-357.
- Loeffen, W.L., van Beuningen, A., Quak, S., Elbers, A.R., 2009, Seroprevalence and risk factors for the presence of ruminant pestiviruses in the Dutch swine population. *Vet Microbiol* 136, 240-245.
- Loken, T., 1987, Experimentally-induced border disease in goats. *J Comp Pathol* 97, 85-89.
- Loken, T., 1990, Pestivirus infections in Norway. Epidemiological studies in goats. *J Comp Pathol* 103, 1-10.
- Loken, T., 1992, Pestivirus infections in ruminants in Norway. *Rev Sci Tech* 11, 895-899.
- Loken, T., Barlow, R.M., 1981, Border disease in Norway. *Acta Vet Scand* 22, 137-139.
- Loken, T., Krogsrud, J., Bjerkaas, I., 1991a, Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J Comp Pathol* 104, 195-209.
- Loken, T., Krogsrud, J., Larsen, I.L., 1991b, Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, sheep and pigs. *Acta Vet Scand* 32, 27-34.
- McClurkin, A.W., Littledike, E.T., Cutlip, R.C., Frank, G.H., Coria, M.F., Bolin, S.R., 1984, Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can J Comp Med* 48, 156-161.
- McGowan, M.R., Kirkland, P.D., 1995, Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br Vet J* 151, 263-270.
- Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M.S., Rice, C.M., 1998, Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J Virol* 72, 4737-4745.
- Meyers, G., Rumenapf, T., Tautz, N., Dubovi, E.J., Thiel, H.J., 1991, Insertion of cellular sequences in the genome of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol Suppl* 3, 133-142.
- Mishra, N., Dubey, R., Rajukumar, K., Tosh, C., Tiwari, A., Pitale, S.S., Pradhan, H.K., 2007, Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhea virus type 2 isolated from Indian goats (*Capra hircus*). *Vet Microbiol* 124, 340-347.

- Mishra, N., Rajukumar, K., Tiwari, A., Nema, R.K., Behera, S.P., Satav, J.S., Dubey, S.C., 2009, Prevalence of Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies among sheep and goats in India. *Trop Anim Health Prod* 41, 1231-1239.
- Mishra, N., Rajukumar, K., Vilcek, S., Tiwari, A., Satav, J.S., Dubey, S.C., 2008, Molecular characterization of bovine viral diarrhea virus type 2 isolate originating from a native Indian sheep (*Ovis aries*). *Vet Microbiol* 130, 88-98.
- Nelson, D.D., Dark, M.J., Bradway, D.S., Ridpath, J.F., Call, N., Haruna, J., Rurangirwa, F.R., Evermann, J.F., 2008, Evidence for persistent Bovine viral diarrhea virus infection in a captive mountain goat (*Oreamnos americanus*). *J Vet Diagn Invest* 20, 752-759.
- Nettleton, P.F., 1987, Pathogenesis and epidemiology of border disease. *Ann Rech Vet* 18, 147-155.
- Nettleton, P.F., Gilray, J.A., Russo, P., Dlissi, E., 1998, Border disease of sheep and goats. *Vet Res* 29, 327-340.
- Nettleton, P.F.a.K.W., 2007, Border disease. I. D. Aitken, Oxford.
- Orsel, K., Antonis, A.F., Oosterloo, J.C., Vellema, P., van der Meer, F.J., 2009, Seroprevalence of antibodies against pestiviruses in small ruminants in The Netherlands. *Tijdschr Diergeneesk* 134, 380-384.
- Paton, D., Gunn, M., Sands, J., Yapp, F., Drew, T., Vilcek, S., Edwards, S., 1997, Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Arch Virol* 142, 929-938.
- Paton, D.J., Carlsson, U., Lowings, J.P., Sands, J.J., Vilcek, S., Alenius, S., 1995, Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet Microbiol* 43, 283-294.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J., Tussen, P., 1994, Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.
- Raul C. Mainar-Jaime, J.A.V.-B., 1999, Associations of veterinary services and farmer characteristics with the prevalences of brucellosis and border disease in small ruminants in Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 40 193-205.
- Rebhun, W.C., French, T.W., Perdrizet, J.A., Dubovi, E.J., Dill, S.G., Karcher, L.F., 1989, Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J Vet Intern Med* 3, 42-46.
- Reichle 2009. Untersuchungen bei Kälbern, die mit Border-Disease infizierten Lämmern zusammengehalten werden. Dissertation Vetsuisse Universität Zürich.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., 1998, Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes* 12, 101-106.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., Dubovi, E.J., 1994, Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205, 66-74.
- Ridpath, J.F., Neill, J.D., Frey, M., Landgraf, J.G., 2000, Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol* 77, 145-155.
- Ridpath, J.F., Neill, J.D., Vilcek, S., Dubovi, E.J., Carman, S., 2006, Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV-2 strain. *Vet Microbiol* 114, 196-204.
- Rosadio, R.H., Evermann, J.F., DeMartini, J.C., 1984, A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. *Vet Microbiol* 10, 91-96.
- Sands, J.J., Harkness, J.W., 1978, The distribution of antibodies to Border disease virus among sheep in England and Wales. *Res Vet Sci* 25, 241-242.
- Sausker, E.A., Dyer, N.W., 2002, Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1, and BRSV in ranch-raised bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest* 14, 68-70.
- Sawyer, M.M., 1992, Border disease of sheep: the disease in the newborn, adolescent and adult. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 15, 171-177.

- Schaller, P., H. R. Vogt, M. Strasser, P. F. Nettleton, E. Peterhans, Zanoni, a.R., 2000, Seroprevalence of maedi-visna and border disease in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 142, 145-153.
- Scherer, C.F., Flores, E.F., Weiblen, R., Caron, L., Irigoyen, L.F., Neves, J.P., Maciel, M.N., 2001, Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. *Vet Microbiol* 79, 285-299.
- Schiefer, P., Krametter-Frotscher, R., Schleiner, A., Loitsch, A., Golja, F., Mostl, K., Baumgartner, W., 2006, [Seroprevalence of antibodies to ruminant pestiviruses in sheep and goats in Tyrol (Austria)]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 113, 55-58.
- Schleiner, A., Krametter-Frotscher, R., Schiefer, P., Loitsch, A., Golja, F., Mostl, K., Baumgartner, W., 2006, [Seroepidemiological survey of sheep in Carinthia for the dissemination of ruminant pestiviruses]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119, 203-208.
- Schulz, 1959, Pathologisch-anatomische Befunde bei der sogenannten 'Mucosal disease' (Schleimhautkrankheit) des Rindes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 66.
- Stalder, H.P. 2008. Phylogenetischer Baum der Pestiviren, basierend auf der für das Virusprotein Npro-kodierenden Sequenz. In: Poster 3.16, 7. Pestivirus-Symposium, Uppsala, Schweden.
- Stalder, H.P., Meier, P., Pfaffen, G., Wageck-Canal, C., Rufenacht, J., Schaller, P., Bachofen, C., Marti, S., Vogt, H.R., Peterhans, E., 2005, Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev Vet Med* 72, 37-41; discussion 215-219.
- Stokstad, M., Loken, T., 2002, Pestivirus in cattle: experimentally induced persistent infection in calves. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49, 494-501.
- Strong, R., La Rocca, S.A., Ibata, G., Sandvik, T., 2010, Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle. *Vet Microbiol* 141, 208-215.
- Tajima, M., Dubovi, E.J., 2005, Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhea virus isolates from dairy operations in the United States of America. *J Vet Diagn Invest* 17, 10-15.
- Tautz, N., Meyers, G., Thiel, H.J., 1998, Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clin Diagn Virol* 10, 121-127.
- Tavella A., S.E., Zambotto P., Lombardo D., Rabini M., Robatscher E., Nardelli S. 2007. Die Rolle des Schafes und der Ziege als BVD-Virusüberträger in Rinder haltenden Betrieben, Feldstudie in infizierten Beständen in der Autonomen Provinz Bozen/Südtirol (Italien).
- Tegtmeier, C., Stryhn, H., Uttenthala, I., Kjeldsen, A.M., Nielsen, T.K., 2000, Seroprevalence of Border Disease in Danish sheep and goat herds. *Acta Vet Scand* 41, 339-344.
- Thabti, F., Letellier, C., Hammami, S., Pepin, M., Ribiere, M., Mesplede, A., Kerkhofs, P., Russo, P., 2005, Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. *Arch Virol* 150, 215-229.
- Thiel, H.J., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T., Meyers, G., 1991, Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* 65, 4705-4712.
- Thierauf, P., 1993, Untersuchungen zur Epidemiologie, Diagnose und Immunprophylaxe von BVD/ MD- Virusinfektionen in Milchviehzuchtbeständen.
- Tsuboi, T., Imada, T., 1996, Noncytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhea-mucosal disease viruses do not affect in vitro embryonic development into the blastocyst stage. *Vet Microbiol* 49, 127-134.
- Valdazo-Gonzalez, B., Alvarez-Martinez, M., Sandvik, T., 2007, Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Vet J* 174, 316-324.
- Valdazo-Gonzalez, B., Alvarez, M., Sandvik, T., 2008, Prevalence of border disease virus in Spanish lambs. *Vet Microbiol* 128, 269-278.

- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., Paton, D.J., 2005, Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med* 72, 31-35; discussion 215-219.
- Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J., 1994, Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 136, 309-323.
- Vilcek, S., Nettleton, P.F., 2006, Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol* 116, 1-12.
- Vilcek, S., Nettleton, P.F., Paton, D.J., Belak, S., 1997, Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol* 78 (Pt 4), 725-735.
- Voss, H.J., 1960, Beobachtungen über die Schleimhauterkrankung (Mucosal disease) der Rinder in Deutschland. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*.
- Wilsmore, A.J., Roeder, P.L., 1984, Border disease in Syria. *Trop Anim Health Prod* 16, 225-226.
- Wohlsein, P., Trautwein, G., Depner, K.R., Hubschle, O.J., Liess, B., 1992, Pathomorphological and immunohistological findings in progeny of goats experimentally infected with pestiviruses. *Zentralbl Veterinarmed B* 39, 1-9.
- Wolfmeyer, A., Wolf, G., Beer, M., Strube, W., Hehnen, H.R., Schmeer, N., Kaaden, O.R., 1997, Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch Virol* 142, 2049-2057.
- Yamamoto, T., Kozasa, T., Aoki, H., Sekiguchi, H., Morino, S., Nakamura, S., 2008, Genomic analyses of bovine viral diarrhea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Vet Microbiol* 127, 386-391.

11 DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter möchte ich danken für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme im Institut und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Umwelt- und Verbraucherschutz (Bayr.StMinUV) danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Georg Wolf für die stets freundschaftliche Betreuung zu jeder Tages- und Nachtzeit, für all die guten Ratschläge und die fachliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Gudrun Schulz, Hilke Hubert und ganz besonders Astrid Freudenstein möchte ich ganz herzlich für die Einführung in die Laborarbeit, die Durchführung der PCRs, so manch guten Ratschlag und das gute Klima im Labor danken.

Bei Herrn Dr. Robert Fux möchte ich mich für alle Ratschläge rund um die PCR bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Nicole Gollnick für alle guten Ratschläge und Tipps in Bezug auf die Probennahmen.

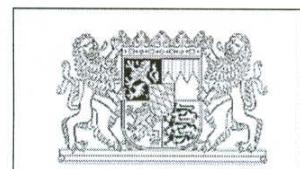
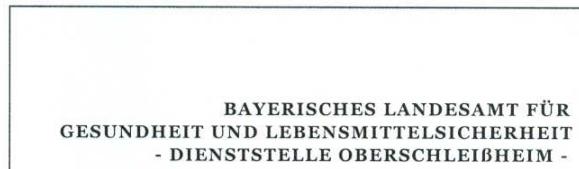
Weiterhin möchte ich mich bei Birgit Rohlederer und Alexandra Hund bedanken, ohne die die Beprobung von 100 Betrieben nicht möglich gewesen wäre! Ebenso gebührt all denjenigen ein großes Dankeschön, die mit viel Elan bei der Beprobung der Tiere mitgeholfen haben!

Herrn Ulli Jeratsch und Steffen Schiwek möchte ich ganz herzlich für die Mithilfe bei der statistischen Auswertung der Daten danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Freunden, Mitbewohnern etc. bedanken, die durch ihre tatkräftige Unterstützung bei allen anfallenden Problemen so manche Katastrophe abgewendet haben!

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Tierhaltern bedanken, die ihre Tiere für die Blutentnahmen zur Verfügung gestellt haben

12 FRAGEBOGEN FÜR LANDWIRTE



Fragebogen für Landwirte

im Zusammenhang mit der Probennahme für

das BVD-/ Border-Disease-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.: _____ / _____

FAX: _____

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

Haupterwerb Hobbyhaltung

Nutzungsart: Milchvieh Mutterkuhhaltung

Mastvieh Aufzuchtbetrieb

Welche Art 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

Hobbyhaltung

Nutzungsart:

Zucht

Milch

Mast

Welche Art hauptsächlich: _____

Rasse(n): hauptsächlich gehalten: _____

andere Rassen gehalten: _____

Zahl der **Ziegen** insgesamt:

davon _____ Kitze (bis 2 Monate)

_____ Jungziegen (über 2 Monate bis 1 Jahr bzw. weibl. bis zum 1. Ablammen)

_____ Geißeln

_____ Böcke

Haupterwerb

Hobbyhaltung

Nutzungsart:

Zucht

Milch

Mast

Welche Art hauptsächlich: _____

Rasse(n): hauptsächlich gehalten: _____

andere Rassen gehalten: _____

Haltung

Rinder:

ausschließlich Weidehaltung

ausschließlich Stallhaltung

Stall- und Weidehaltung

Haltungsform:

Laufstall

Anbindestall

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

Welche Tiergruppen wo? _____

Bei Stall und Weide kombiniert: saisonal asaisonal

Welche Tiergruppen haben Weidegang?

Schafe:

ausschließlich Weidehaltung ausschließlich Stallhaltung

Stall- und Weidehaltung

Haltungsform: _____

Bei Stall und Weide kombiniert: saisonal asaisonale

Welche Tiergruppen haben Weidegang?

Ziegen:

ausschließlich Weidehaltung ausschließlich Stallhaltung

Stall- und Weidehaltung

Haltungsform: _____

Bei Stall und Weide kombiniert: saisonal asaisonale

Welche Tiergruppen haben Weidegang?

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?

Sonstiges

Zukäufe (im letzten Jahr): nein ja

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

Woher? _____

Wie viele/ wann/ welche(Ohrmarken-Nr.)?

Tierverluste: nein ja

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

Wie viele? _____

Wodurch? _____

Wann ? _____

Kontakt zu anderen Tieren/Herden:

Pensionstiere ja nein

Tierklinik ja nein

Ausstellungen/Märkte/Hoffest etc. ja nein

Wanderschäfer auf Weide/Wiese ja nein

Kontakt zu Tieren im Ort/Umgebung ja nein

BVD/MD, BD-Fälle: nein/unbekannt ja

Falls „ja“: Wann? Wie viele? Welche Tierart?

über Jungtierfenster bestätigte BVD-Freiheit?

Wann wurde das letzte Jungtierfenster angefertigt? _____

Mit welchem Ergebnis? _____

Wurden PI-Tiere gefunden und gemerzt? ja nein

Wenn ja, wann? _____

Symptome

Sind in diesem bzw. letztem Jahr (2007/08) folgende Symptome aufgetreten:

Rd./Schf./Zg.

Läsionen an Flotzmaul / Lippen / Nasenöffnungen, Maulhöhle

Läsionen an den Klauen / im Zwischenklauenspalt (mit/ohne Lahmheit)

Fieber _____

Rd./Schf./Zg.

- Augen-/ Nasenausfluß (Rhinitis, Conjunctivitis)

- Durchfall

- Zentralnervöse Störungen bei Lämmern (Zittern, Bewegungsstörungen)

- Vliesveränderungen (Lamm)- Hairy- Shaker- Syndrom

Reproduktionsstörungen:

- Gehäuftes Umrindern/ Umbocken?

(Änderungen: z.B. neuer Stier, Besamungstechniker, Management ...)

- Aborte, Mumifikation, Frühgeburten, Totgeburten?

- Kümmerer, Geburt lebensschwacher Kälber/ Lämmer?

Missbildungen?

Sonstiges

Impfungen

BVD / MD –Impfung:

ja

nein

Welcher Impfstoff? _____

Welche Tiere werden geimpft? (Mit welchem Impfstoff?) _____

Ab welchem Alter wird geimpft? _____

In welchen Abständen wird geimpft? _____

Wann war die letzte Impfung? _____

Wurden alle Tiere geimpft? _____