Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
(Vorstand: Prof. Dr. O.-R. Kaaden)
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Prävalenz von Infektionen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe in der Wildwiederkäuerpopulation in Zusammenhang mit der Weidehaltung von Rindern

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München

von
Markus Kleinschmidt

aus Mussenhausen, Markt Rettenbach

München 2004

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

Dekan:	Univ. Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ. Prof. Dr. O.-R. Kaaden
Korreferent:	Univ. Prof. Dr. J. Braun

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	8
2. Literaturübersicht	10
2.1. Das BVD-Virus	10
2.1.1. Morphologie, Biotypen und Serotypen	10
2.1.2. BVD-Virus bei Wildwiederkäuern	16
2.1.2.1. Isolate von BVD-Virus	16
2.1.2.2. Nachweis von BVD-Virus und Hinweise auf MD bei Wildwiederkäuern	17
2.1.2.3. Experimentelle Infektionen von Wildwiederkäuern mit BVD-Virus	21
2.2. Serologische Untersuchungen auf Antikörper gegen BVD-Virus	22
2.2.1. Untersuchungen in Deutschland	22
2.2.2. Weltweit Untersuchungen	23
2.3. BVDV- Infektion beim Rind	26
2.4. Border Disease	28
2.5. BVDV- Infektionen bei Schweinen	29

3. Eigene Untersuchungen 30
3.1. Material und Methodik 30
3.1.1. Konzept 30
3.1.2. Untersuchungsgebiet Ostallgäu 31
3.1.3. Projektorganisation der Wildwiederkäuerseite 32
3.1.4. Blutentnahme beim Wildwiederkäuer 34
3.1.5. Versand der Wildwiederkäuerblutproben 37
3.1.6. Aufarbeitung und Lagerung der Blutproben von Wildwiederkäuern 38
3.1.7. Teste für den Nachweis von BVDV-spezifischen Antikörpern 39
3.1.7.1. IDEXX- Test 39
3.1.7.2. Bommeli BVD-Sero II 40
3.1.7.3. Bommeli CSF-Marker 41
3.1.7.4. Bar-Vac- ELISA 42
3.1.7.5. BVDV- Serumneutralisationstest (SNT) 44
3.1.8. Border Disease Virus- Serumneutralisationstest 45
3.1.9. BVD-Virus Nachweis 46
3.1.8.1. Antigen- ELISA 46
3.1.9.2. Immunfluoreszenz 47
3.1.10. Seronegative Weiderinder und das Selektionsverfahren 48
3.1.11. Kontrolluntersuchung der Weiderinder 51
3.1.12. Vergleich der Seroprävalenz der Jahre 2001 und 2002 ausgewählter Weidetiergruppen 52
3.1.13. Statistik 52

3.2. Ergebnisse 53
3.2.1. Untersuchte Wildwiederkäuer aus dem Untersuchungsgebiet 53
3.2.1.1. Ergebnisse der ELISA-Testverfahren und der Serumneutralisationsteste 54
3.2.1.2. BDV- Serumneutralisationstest 62
3.2.1.3. Vergleich zwischen SN(BVDV1)-Titer, SN(BVDV2)-Titer und BDV-Titer 62

3.2.1.4. Altersverteilung der gefundenen SN-positiven Tiere 66
3.2.1.5. Prävalenz von BVDV- und BDV-Infektionen 70
3.2.1.6. Gesundheitszustand der seropositiven Tiere 73
3.2.1.7. Weitere Daten aus den Probenbegleitschreiben 73
3.2.2. BVDV-Seroreagenten in ausgewählten Weiderinder 75
3.2.2.1. Verlaufsuntersuchung von seronegativen Weiderindergruppen aus dem Jahr 2001/2002 75
3.2.2.2. Verlaufsuntersuchung 2001 bis 2002 78
3.2.3. Befunde und Ergebnisse zur Ursachenabklärung der BVDV-Infektionen bei Weiderindern 81

4. Diskussion 86
4.2. Probenzahl und Verteilung 86
4.3. Probenqualität 87
4.4. Testverfahren zur Antikörperbestimmung der Wildwiederkäuerproben und Bewertung der SNT- Ergebnisse 87
4.5. Prävalenz von BVDV- und BDV- Seroreagenten in der Wildwiederkäuerpopulation 89
4.6. Epidemiologische Abschätzung der Interaktion zwischen Wildwiederkäuern und Weiderindern 91

5. Zusammenfassung 97

6. Summary 99

7. Abkürzungsverzeichnis 101

8. Literaturverzeichnis 102

9. Lebenslauf 124

10. Danksagung 125

1 Einleitung

Infektionen mit dem Virus der bovinen Virusdiarrhoe/*Mucosal Disease* (BVDV) sind weltweit verbreitet. Sie werden infolge der klinischen Auswirkungen der Infektion, insbesondere der Infektion während der Gravidität, als eine der bedeutendsten Rindererkrankungen angesehen. Als wichtigste Verbreitungsquellen werden persistierend infizierte Rinder betrachtet, die lebenslang große Mengen BVD-Virus ausscheiden. Diese Tiere entstehen durch fetale Infektionen während der Frühgravidität. Als Ansteckungsquelle fungieren auch Tiere mit transienten Infektionen, ohne dass diese notwendigerweise klinische Erkrankungen zeigen. Das Wirtsspektrum des BVDV ist nicht allein auf Rinder beschränkt, auch andere Wiederkäuer und Schweine können infiziert werden.

Die Bestrebungen, Schäden durch die BVDV Infektion zu verhindern, sind vielfältig. Die Prophylaxe hat dabei den höchsten Stellenwert, insbesondere die Verhinderung von Neuinfektionen gravider Tiere. Sowohl die Impfkonzepte mit dem Ziel, fetale Infektionen zu verhindern, als auch systematische Diagnose und Elimination der Infektionsquellen sind prinzipiell denkbar. Die zweite Variante wird derzeit in einigen Regionen Europas mit bereits laufenden, verpflichtenden oder freiwilligen BVDV-Bekämpfungsprogrammen durchgeführt, ohne dass bislang das Ziel, ein BVDV-freies Land, erreicht worden wäre. Aufgrund des Wirtsspektrums von BVDV ist vor der Schaffung einer BVDV-freien, empfänglichen Rinderpopulation die Frage zu klären, inwieweit jeweils regional andere Tierarten als Ansteckungsquelle für Rinder relevant sein können. Ein hierfür hilfreiches epidemiologisches Verfahren ist die Beurteilung der Seroprävalenz bei der jeweiligen Spezies.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die Eignung von drei tierartunabhängigen Enzymimmunoassays (zwei Blocking-Teste; ein indirekter Test) für die Bewertung der Prävalenz von BVDV-Antikörpern bei einheimischen Wildwiederkäuern zu prüfen. Als Standardteste zum Vergleich werden Serumneutralisationsteste gegen BVDV-Typ1, BVDV-Typ2 und zwei unterschiedliche Border Disease-Virusstämme (BDV) durchgeführt.

Nach Auswahl der geeigneten Methoden wird die Prävalenz von BVDV- und BDV-Antikörpern bei den Wildwiederkäuern Reh, Rotwild und Gämse in einer bayerischen Alpenregion geschätzt.

Im gleichen Untersuchungsgebiet und Untersuchungszeitraum wurde versucht, BVDV-Infektionen bei Weiderindern mittels Serokonversion zu erfassen, wobei nur Rinder ohne

nachgewiesenen Kontakt zu persistent BVDV-infizierten (PI) Rindern während der Weideperiode betrachtet wurden.

Als Untersuchungsgebiet wurde das südliche Ostallgäu aus folgenden Gründen gewählt: Die Region weist sowohl intensive Weidebewirtschaftung als auch einen hohem Wildwiederkäuerbesatz auf. Außerdem werden im Ostallgäu aufgrund von Vorgaben der Weidebetreiber seit dem Jahr 2001 nur noch geprüfte BVDV-Antigen negative Rinder auf die Gemeinschaftsweiden verbracht, so dass Infektionen auf der Weide durch Rinder sehr unwahrscheinlich sind. Vor dem Auftrieb untersuchte seronegative Rinder solcher Weiden werden als Prüftiere für die Frage der Infektion vom Wildwiederkäuer zum Rind verwendet.

2 Literaturübersicht

2.1 Das BVD-Virus

2.1.1 Morphologie, Biotypen und Serotypen

Das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVDV) wird dem Genus *Pestivirus* zugeordnet und gehört damit zu der Familie *Flaviviridae* (Heinz *et al.*, 2000). Der Prototyp dieser Familie ist das Virus des menschlichen Gelbfiebers (lat. *flavus* = gelb). Weitere wichtige Vertreter der Familie *Flaviviridae* sind das FSME-Virus (Frühsommer-Meningoenzephalitis; *Tick-borne encephalitis virus*), das Louping Ill-Virus und das Hepatitis C-Virus des Menschen (Heinz *et al.*, 2000).

Die *Pestiviren* sind genetisch und strukturell eng miteinander verwandt. Antikörper gegen Pestiviren lassen eine antigenetische Kreuzreaktivität erkennen, die auch zur Kreuzneutralisation zwischen allen *Pestivirus*spezies führt (Darbyshire, 1960; Plant *et al.*, 1973). Verwandte Virusspezies sind das Virus der Klassischen Schweinepest (KSP, ESP, Europäische Schweinepest, CSF, *classical swine fever*), das in der Schafpopulation vorkommende Border Disease (BD) Virus und das BVDV das als auslösendes Agens der BVD/MD (Bovine Virus Diarrhoe/ *Mucosal Disease*), einer ökonomisch bedeutsamen Krankheit der Rinder, die in der ganzen Welt vorkommt (Backer, 1995; Houe, 1999).

Merkmale der Mitglieder des Genus *Pestivirus* sind die lipidhaltige Hülle und eine einzelsträngige Ribonukleinsäure positiver Polarität. Mit einem Durchmesser von 40 – 60 nm gehört das BVDV zu den kleineren Viren. Aufgrund seiner Hülle wird es durch alle gängigen Desinfektionsmittel inaktiviert. Seine Tenazität ist gering und es verliert seine Infektiosität bei 37 °C in vier Tagen, bei 56 °C nach circa 45 Minuten (Horzinek *et al.*, 1967; Ritchie und Fernelius, 1968; Murphy *et al.*, 1999).

Das virale Genom des BVDV ist circa 12 Kilobasen lang (Renard *et al.*, 1985; Collett *et al.*, 1988). Darin enthalten ist ein langer offener Leserrahmen, der für ein Polyprotein kodiert. Während der Virusreplikation wird dieses Polyprotein proteolytisch gespalten, um die Struktur- und die Nicht-Struktur (NS)-Proteine zu generieren (Rümenapf, 1993; Meyers und

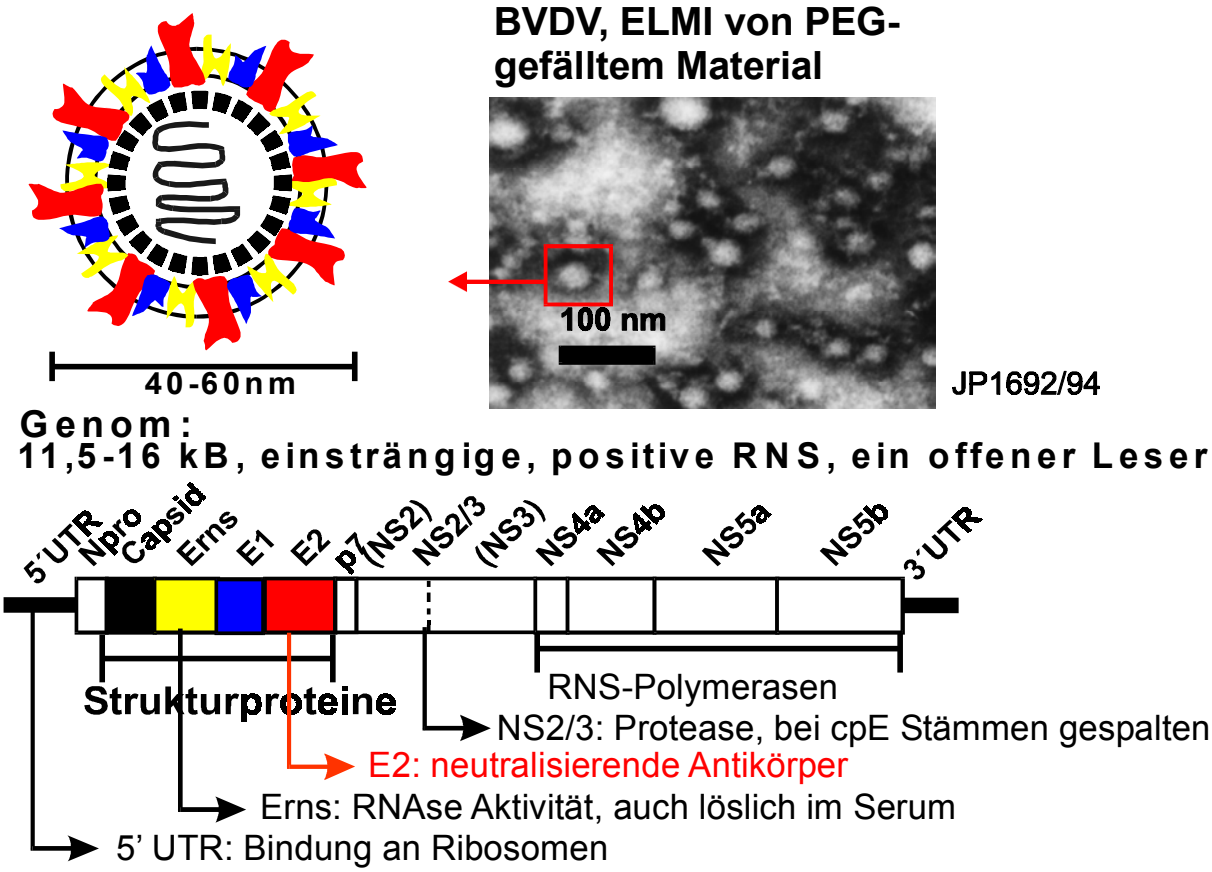


Abb. 1 : Schematische Darstellung des *Pestivirus*genoms (Bild, G. Wolf)

Thiel, 1996). Das Genom enthält nicht translatierte Regionen an jedem Ende (3'- und 5'-*untranslated region* (UTR)). Der offene Leserahmen beginnt mit dem N-terminalen Autoproteasegen Npro, gefolgt von den Genen für die Strukturproteine, welche für das Kapsidprotein C und drei Hüllproteine E^{rns} (*Envelope, RNase, soluble*), E1 (*Envelope 1*) und E2 (*Envelope 2*) kodieren, gefolgt von den Nicht-Strukturproteinen p7 (Elbers *et al.*, 1996), NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Collett *et al.*, 1988). Abbildung (Abb.) 1 zeigt die Organisation des *Pestivirus*genoms.

Das E2 der *Pestiviren* ist aufgrund seiner Eigenschaft, neutralisierende Antikörper zu induzieren, von besonderem Interesse für die Entwicklung von Impfstoffen (Weiland *et al.*, 1990; Donis, 1995). Gegen E^{rns} gerichtete Antikörper zeigen keine oder nur schwache neutralisierende Aktivität (Boulanger *et al.*, 1991; Weiland *et al.*, 1992; Hulst und Moormann, 1997), das dritte virale Hüllprotein E1 scheint keine signifikanten Antikörpertiter zu induzieren (Bolin und Ridpath, 1989; Boulanger *et al.*, 1991; König *et al.*, 1995). Im Neutralisationstest weisen Seren von BVDV-infizierten Tieren eine Kreuzreaktion mit heterologen BVD- und *Pestiviren* auf (Castrucci *et al.*, 1975; Howard *et al.*, 1985), wobei die Neutralisationstiter gegen den homologen Virusstamm im Allgemeinen höher sind (Howard

et al., 1987). Die gegen das NS3-Protein gerichteten Antiköper weisen zwar keine neutralisienden Eigenschaften auf, reagieren jedoch mit dem NS3-Protein anderer *Pestiviren* und werden zum Nachweis einer *Pestivirus*infektion genutzt (Edwards *et al.*, 1991; Edwards, 1996).

Eine bemerkenswerte Besonderheit der *Pestiviren* ist die Existenz von zwei Biotypen, die aufgrund morphologischer Veränderungen, die sie in Zellkulturen auslösen, definiert wurden (Gillespie *et al.*, 1960). Nichtzytopathogene (nzp) *Pestiviren* replizieren ohne lichtmikroskopisch erkennbaren zytopathischen Effekt (Lee und Gillespie, 1957), wohingegen zytopathogene (zp) BVDV-Stämme zu einer fortschreitenden Degeneration und Pyknose des Zellkerns sowie zu einer Vakuolosierung des Zytoplasmas (Liess, 1967; Scott *et al.*, 1972) und schließlich zum Tod der infizierten Zellen durch Apoptose führen (Zhang *et al.*, 1996; Hoff und Donis, 1997). Zudem wird bei zp BVDV- Stämmen das Nicht-Strukturprotein NS3 zusammen mit dem Nicht-Strukturprotein NS2-3 gefunden, wobei nach Infektionen mit nzp BVDV-Stämmen nur das NS2-3 detektiert wird (siehe Abb.1) (Meyers und Thiel, 1996; Kümmerer *et al.*, 2000; Becher *et al.*, 2001).

Beide viralen Biotypen, nzp und zp, sind an der Pathogenese der *Mucosal Disease* beteiligt. Innerhalb des an MD erkrankten Einzeltieres werden das nzp Virus zusammen mit dem zp Virus als Viruspaar bezeichnet. Ursache der MD ist die Infektion des Fötus mit einem nzp-Stamm während des ersten Trimenon der Gravidität, in dessen Folge eine spezifische Immuntoleranz entwickelt wird und die Tiere persistent infiziert bleiben (Liess *et al.*, 1984; McClurkin *et al.*, 1984). Zum Ausbruch der MD kommt es durch postnatale Superinfektionen des persistent infizierten Tieres mit einem antigenetisch eng verwandten zp-Stamm (Brownlie *et al.*, 1984; Bolin *et al.*, 1985a; Moennig *et al.*, 1990; Loehr *et al.*, 1998) oder durch Mutation des nzp-Biotyps in einen zp-Biotyp. Diese Mutation kann durch Ribonukleinsäure-Rekombinationen, Punktmutationen innerhalb des NS2-Gens, Insertionen zellulärer Sequenzen oder Genomduplikationen entstehen (Howard *et al*., 1987; Corapi *et al*., 1988; Tautz *et al*., 1994; Fritzemeier *et al*., 1995; Ridpath und Bolin, 1995b). Folge ist immer die proteolytische Spaltung von NS2-3 in NS2 und NS3 (Kümmerer *et al.*, 2000). Die klinischen Symptome der MD werden in Kapitel 2.3 beschrieben.

Die Unterteilung von *Pestiviren* aufgrund ihrer antigenetischen Eigenschaften mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (Moennig *et al*., 1987, Corapi *et al.*, 1988) oder spezifischen Seren (Castrucci *et al.*, 1975) war bereits vor der Technik der Genotypisierung eine vielgenutzte Methode. Mit Hilfe solcher serologischer Reaktionsmuster war es möglich, Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies des Genus *Pestivirus* zu bestimmen. Die

Unterscheidung in Viren der KSP, der BD und der BVD wurden durch speziesspezifische monoklonale Antikörper ergänzt. So war es möglich mit Hilfe von drei Gruppen monoklonaler Antikörper Viren der ESP von den *Pestiviren* der Wiederkäuer zu trennen (Edwards *et al.*, 1988).

Das Wirtsspektrum von BVDV ist nicht auf das Rind beschränkt, denn auch Schweine, Hirsche, Rehe und andere Wildwiederkäuerarten können mit BVDV infiziert werden (Hamblin und Hedger, 1979; Doyle und Heuschele, 1983; Hyera *et al.*, 1987; Nettleton, 1990; Becher *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1999). Molekularepidemiologische Studien führten zu dem Ergebnis, dass es eine Einteilung basierend auf der Wirtsspezies für *Pestiviren* nicht gibt (Becher *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1999).

Zwischen 1993 und 1995 wurde eine neue hochvirulente und epidemische Form von akuter BVD in Ontario, Kanada beschrieben. Etwa zur gleichen Zeit traten auch in den USA mit BVD verbundene schwere Fälle mit Thrombozytopenien, hämorragischen Diathesen und hoher Mortatlität auf (Pellerin *et al*., 1994; Liebler *et al*., 1995). Untersuchungen haben ergeben, dass ein bis dahin unentdecktes hochvirulentes Virus des BVDV Genotyps 2 dieses neue klinische Bild verursachte (Ridpath *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998). Zunächst wurde angenommen, dass alle BVDV-Typ2 Stämme ein hämorrhagisches Syndrom auszulösen vermögen (Rebhuhn *et al*., 1989; Corapi *et al*., 1990; Pellerin *et al.*, 1994). In der folgenden Zeit wurden aber auch in anderen Regionen wie Deutschland (Wolfmeyer *et al.*, 1997; Becher *et al*., 1999; Beer und Wolf, 1999; Beer *et al*., 2002), Österreich (Vilcek *et al.*, 2003), Belgien (Couvreur *et al*., 2000), England (Drew *et al.*, 2002), Japan (Sakoda *et al.*, 1999), Neuseeland (Vilcek *et al*., 1998), Mozambique (Baule *et al.*, 1997) BVDV-Typ2 Stämme entdeckt, deren Auftreten nicht immer mit Erkrankungen korrelierte. Von 96 bayerischen Isolaten aus dem Zeitraum von 1992 bis 1996 waren elf dem BVDV- Typ2 zuzuordnen (Wolfmeyer *et al.*, 1997).

Der Einsatz molekularbiologischer Methoden (Collett *et al.*, 1988; Boye *et al.*, 1991) machte eine genaue genetische Charakterisierung und Einteilung möglich (Becher *et al.*, 1997). Für vergleichende genetische Analysen wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche *Pestivirus*stämme aus Rind, Schwein, Schaf, Ziege und mehreren Wildwiederkäuerspezies herangezogen. Eine Einteilung auf der Grundlage des Npro-Gens gibt Abb. 2 wieder (Becher *et al.*, 2001). Ein Ergebnis der Analyse war die Identifizierung einer neuen Gruppe von *Pestiviren*, die insbesondere aus Rind und Schaf isoliert wurde (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Becher *et al.*, 1995). Diese *Pestivirus*gruppe – BVDV-Typ2 - unterscheidet sich

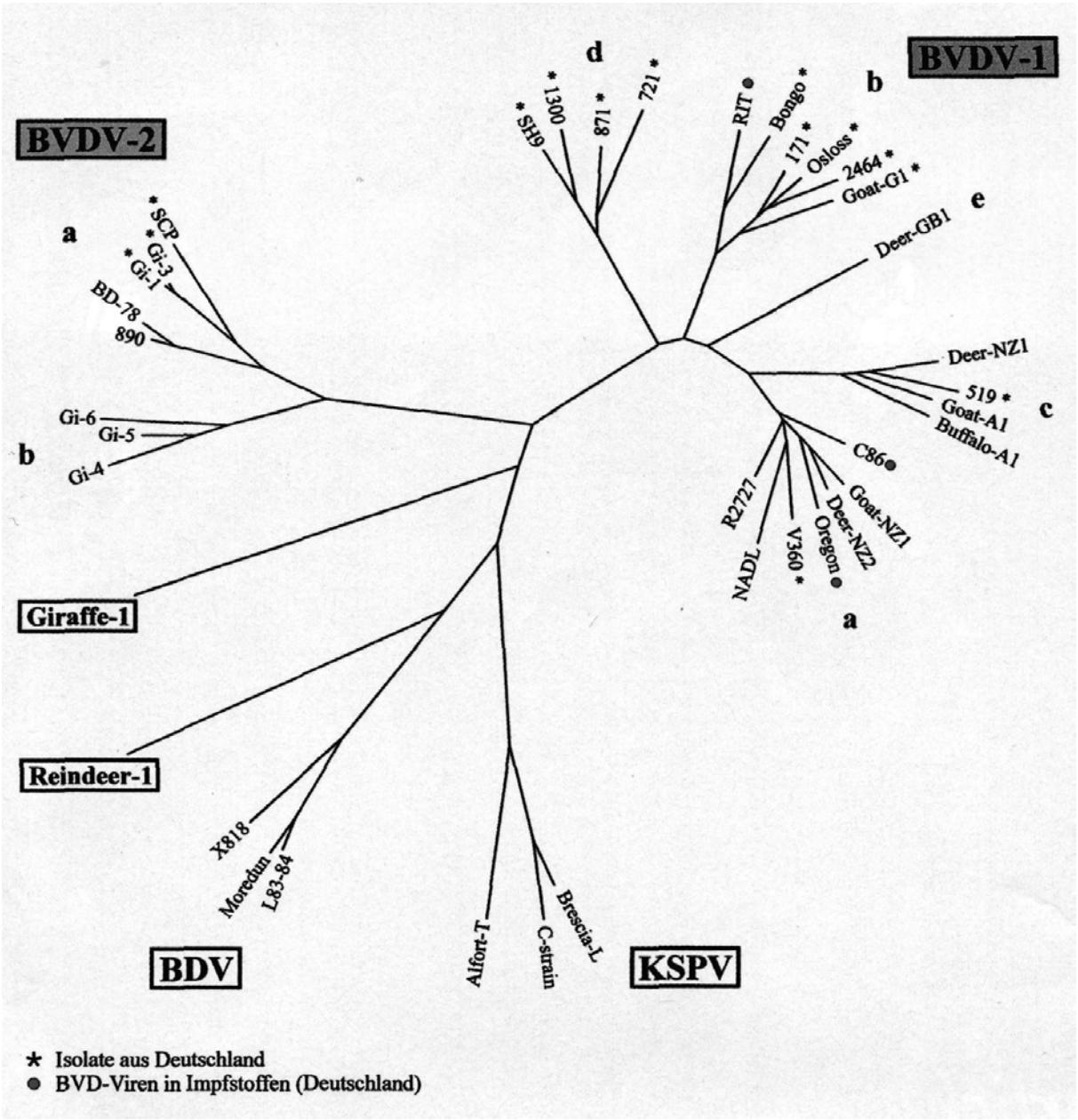


Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum auf Grundlage der Nukleotidsequenz des Npro- Gens von *Pestiviren* (Bild, P. Becher)

genetisch und antigenetisch von den drei anderen *Pestivirus*spezies BVDV-Typ1, BDV und KSP-Virus (Ridpath und Bolin, 1995a; Ridpath *et al*., 2000).

So finden sich in Abb. 2 nach Becher *et al.* (2001) Isolate aus Rind, Schwein, Schaf, Ziege und Hirsch. Es wurden drei *Pestivirus*isolate von Ziegen, eines von einem Büffel, drei von Hirschen, eines von einem Rentier und eines von einer Giraffe charakterisiert. Das Virusisolat aus einer Giraffe (*Giraffe camelopardalis*) wurde als weitere Spezies in das Genus *Pestivirus* aufgenommen. Das *Pestivirus*isolat Reindeer-1 aus dem Zoo Duisburg unterscheidet sich ebenfalls von den bisherigen Virusspezies (Becher *et al.*, 1999; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001).

Es ist nicht bekannt ob die beiden neu aufgenommenen *Pestivirus*spezies Giraffe-1 und Reindeer-1 unter natürlichen Bedingungen andere Tiere infizieren können.

Vergleiche basierend auf der Sequenz der hoch konservierten 5'-UTR waren die Grundlage für die Unterteilung der BVDV in zwei Genotypen, BVDV-Typ1 und BVDV-Typ2 (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Ridpath und Bolin, 1998). Neben der 5`-UTR Region wurden auch andere Teilsequenzen wie die von Npro- und E2-Genen (Tijssen *et al.*, 1996; Becher *et al.*, 1997; van Rijn *et al.*, 1997; Becher *et al.*, 1999; Tajima *et al.*, 2001), NS3 (Ridpath *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 1994) und der 3'-UTR (Vilcek *et al.*, 1999c) sowie gleichzeitig mehrere Abschnitte der Genomsequenz für die phylogenetische Analyse verwendet (Hofmann *et al.*, 1994; Harasawa, 1996; Wolfmeyer *et al.*, 1997; Ridpath und Bolin, 1998; Vilcek *et al.*, 1998; Sakoda *et al.*, 1999). Sie konnten die Einteilung in die Genotypen bestätigen und führten zu einer weiteren Differenzierung der BVDV-Stämme in Subtypen.

Vergleichende Sequenzanalysen zeigten, dass insbesondere die BVDV-Typ1 Isolate ausgesprochen variabel sind und somit in mindestens fünf Subgruppen (1a bis 1e) unterteilt werden können. Die BVDV-Typ2-, CSFV- und BDV-Stämme werden jeweils in zwei Subgruppen (a und b) unterteilt (Lowings *et al*., 1996; Vilcek *et al*., 1997; Vilcek und Belak, 1997; Harasawa und Giangaspero, 1998; Becher *et al.*, 1999; Sakoda *et al.*, 1999). Die Variabilität des BVDV wird zudem dadurch unterstrichen, dass selbst BVDV-Isolate aus ein und derselben Herde genetisch uneinheitlich sein können (Paton *et al.*, 1995a,b). Untersuchungen, die sich nur auf die BVDV-Isolate aus einem definierten geographischen Gebiet beschränkten, zeigten auch hier die große genetische Variabilität dieser Virusstämme innerhalb einer Region (Baule *et al.*, 1997; Wolfmeyer *et al.*, 1997; Vilcek *et al.*, 1999a,b; Tajima *et al.*, 2001).

BVD-Viren sind nicht streng auf eine Wirtsspezies fixiert. Diese Tatsache ist für die Epidemiologie und eventuelle Bekämpfungsverfahren von entscheidender Bedeutung. So argumentiert Becher *et al.* (2001), dass beim derzeitigen hohen Durchseuchungsgrad in der Rinderpopulation bei gleichzeitiger geringer Verbreitung bei anderen Wildwiederkäuerarten und beim Schwein, zur Zeit BVDV häufiger vom Rind auf andere Tierarten übertragen wird als umgekehrt. Bei einem Rückgang der BVDV-Infektionen innerhalb der Rinderpopulation könnten infizierte Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer eine wichtige Ansteckungsquelle für Rinder darstellen und Programme zur Bekämpfung von BVD/MD ernsthaft gefährden.

2.1.2 BVD-Virus bei Wildwiederkäuern

In der Literatur über das Vorkommen von BVDV in unterschiedlichen Wildwiederkäuerspezies wird von BVDV-Nachweisen und von BVDV-Isolaten berichtet. Diese Tiere stammten entweder aus einer Gehegehaltung oder waren bis zum Zeitpunkt der Probennahme freilebend; als Probenmaterial dienten entweder Blut oder Organteile.

2.1.2.1 Isolate von BVD-Virus

Wie oben bereits erwähnt wurden ebenfalls *Pestivirus*isolate außerhalb der Spezies Rind gefunden und molekularbiologisch charakterisiert. In einer Studie (Becher *et al.*, 1997) wurden die individuellen Viren charakterisiert und mit der korrespondierenden Wirtsspezies sowie der Region in der das Virusisolat gewonnen wurde in Zusammenhang gebracht; Darstellung siehe Tabelle 1. Mit Hilfe einer RT-PCR wurde das 5'-UTR und das Npro- Gen sequenziert.

Tabelle 1: *Pestivirus*isolate

Virusisolat	**Abkürzung**	**Isolationsjahr**	**Ursprungsspezies**	**Region**
CV 94/4068	Buffalo-A1	1994	Büffel	Australien
'Deer'	Deer-GB1	1986	Hirsch	England
95-4845A	Deer-NZ1	1980	Hirsch	Neuseeland
95-4845B	Deer-NZ2	1980	Hirsch	Neuseeland
'Giraffe'	Giraffe-1	1969	Giraffe	Kenia
V60-Krefeld	Reindeer-1	1996	Rentier	Deutschland
V65-Krefeld	Bison-1	1996	Bison	Deutschland
V2486-Krefeld	Bongo	1997	Bongo	Deutschland
SH 9		1990	Reh	Deutschland
SH 11		1991	Reh	Deutschland

Die Isolate Giraffe-1, Deer-NZ2, SH 9 und SH 11 sind zytopathogene Viren, während die restlichen nichtzytopathogen sind. Isolat Deer-GB1 stammt von einem einzelnen Hirsch (*Cervus elaphus*) der in einer Parkherde im Süden Englands lebte (Edwards *et al.*, 1988).
Die Isolate Bongo, Reindeer-1 und Bison-1 konnten von Wiederkäuern aus dem Duisburger Zoo gewonnen werden. Giraffe-1 wurde nach Plowright (1969) aus einer kranken in Gefangenschaft gehaltenen Giraffe (*Giraffe camelopardalis*) isoliert. Die beiden deutschen

Rehisolate SH 9 und SH 11 wurden in Schleswig-Holstein aus Milzproben von 203 freilebenden Rehen (*Capreolus capreolus*) gewonnen und stammten von einem weiblichen Alttier und einem jungen Bock. Beide Isolate gehören zum gleichen BVDV- Stamm (Frölich und Hofmann, 1995; Fischer *et al.*, 1998).

Der phylogenetische Stammbaum (Abb. 2) zeigt sechs Hauptzweige entsprechend der jeweiligen *Pestivirus*spezies BVDV-1, BVDV-2, BDV, KSP und den Isolaten von einer Giraffe und einem Rentier. Des weitern wird die Untergruppe BVDV-1 in fünf Subgruppen (a – e) unterteilt. Eine Subgruppe- genannt 1d- enthält *Pestivirus*isolate von Rindern aus Deutschland (871, 721) und von einem Reh (SH 9). Impfstämme von BVDV C86, das Schweineisolat V360 und das Hirschisolat Deer-NZ2 gehören zur Subgruppe 1a, zu der auch der Stamm NADL gehört. Ein weiterer BVDV- Impfstamm RIT und das Isolat von einem Bongo (Tragelaphinae) , sowie Stamm Osloss gehören zur Subgruppe 1b. Rinderisolat 519 zusammen mit Hirschisolat Deer-NZ1 und Büffelisolat Buffalo-A1 gehören zur Subgruppe 1c. Das Hirschisolat Deer-GB1 stellt das erste Mitglied in der Subgruppe 1e dar. Das Isolat Bison-1 wird in der Untergruppe Reindeer-1 geführt (nicht in Abb. 2) (Becher *et al.*, 1999, Harasawa *et al.*, 2000; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001).

Es ist nicht bekannt, ob die Wildwiederkäuer eigene *Pestiviren* beherbergen, aber das vorliegende Giraffenisolat legt die Vermutung nahe (Becher *et al.*,1997). Infektionen die die Speziesbarriere überwinden, vor allem zwischen Hauswiederkäuern und Wildwiederkäuern, können vorkommen und spielen in der Verbreitung der *Pestiviren* möglicherweise eine Rolle. Es ist nur wenig darüber bekannt, inwieweit *Pestivirus*infektionen klinische Bilder ähnlich der Mucosal Disease bei nichtdomestizierten Wiederkäuern auslösen (Nettleton, 1990).

2.1.2.2 Nachweise von BVD-Virus und Hinweise auf MD bei Wildwiederkäuern

Im folgenden Abschnitt werden die Nachweise oder Hinweise auf BVDV-Infektionen in chronologischer Reihenfolge beschrieben, wobei die BVDV- Isolate aus Abschnitt 2.1.2.1. nicht mehr aufgeführt werden.

Richards *et al.* (1956) hatten bereits im Jahr 1956 in Dakota (USA) Erkrankungen bei Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginiamus*) und Rehen beschrieben, die dem Bild der BVD/MD entsprachen. Guenter (1954) berichtet über einen Ausbruch bei Weißwedelhirschen in Washington, Shope *et al.* (1955) veröffentliche Befunde in einer Hirschpopulation in New Jersey sowie Krankheitsfälle bei Cerviden in Michigan (Fay und Boyce, 1955). Die

Sektionen ergaben katarrhalische, ulzeröse und hämorrhagische Entzündungen der gesamten Körperschleimhäute. Die Reproduzierbarkeit der Erkrankung wurde im anschließenden Infektionsversuch mit Organsuspension gezeigt.

Eines der ersten veröffentlichten Isolate bei Wildwiederkäuern stammt aus Ungarn . Es wurde ein nzp BVD-Virus aus der Milz eines Rehes (*Capreolus capreolus*), das nahe bei infizierten Rindern lebte, gewonnen. Ein Übertragungsversuch dieses Rehisolates auf ein Kalb löste Diarrhö aus (Romvary, 1965).

Das Auftreten von *Mucosal Disease*-ähnlichen Erkrankungen bei Zoowiederkäuern im Herbst 1964 wird bei elf Wiederkäuer aus dem Zoo Hannover beschrieben. Die drei Dorcasgazellen (*Gazella dorkas*), drei Heulingsgazellen (*Gazella tilonura*), eine Grantgazelle (*Gazella granti*), ein Muntyak (*Muntiacus Muntjak*), ein Gauer (*Bos gaurus*) und zwei Bantengs (*Bos javanicus*) aus verschiedenen Revieren des Gartens starben, nachdem sie vorher wässrigen bis blutigen Durchfall bei mittelgradigem Fieber und stark gestörtem Allgemeinbefinden hatten. Trotz sofortiger Therapie starben die Tieren nach ein- bis achttägigem Krankheitsverlauf. Ein Teil der Tiere zeigten Kopfödeme, Salviation, sowie mukösen bis muko-prulenten Augen- und Nasenausfluss. In der Sektion der Tiere wurden ulcerierende Schleimhautdefekte an Lippen, Zahnfleisch und Zunge, längsgerichtete Schleimhautnekrosen im Ösophagus sowie eine fibrinöse bis hämorrhagische Enteritis festgestellt. Histologisch wurden lympho-leukozytäre perivaskuläre Infiltrarte in Leber und Niere gefunden. Die bakteriologische und virologische Untersuchung war in allen Fällen negativ. Weiterhin wird berichtet, dass zeitlich und räumlich unabhängig davon 17 Ducker (*Cephalophus monticola*) an Schleimhauterkrankungen verstarben. Das klinische sowie das pathologisch-anatomische Bild entsprach den Erkrankungsfällen im Zoo Hannover. Der virologische Nachweis war ebenfalls negativ. Die pathologisch- anatomischen Veränderungen wurden als typisch für die Mucosal Disease-Virusdiarrhöe interpretiert, während als Differentialdiagnose die Rhinotracheitis vom Autor erwähnt wird (Brass *et al.*, 1966).

Eine Fallwilduntersuchung in den Jahren 1950 bis 1970 ergab bei 65 von 446 Rehen sowie fünf von 18 Hirschen unspezifische Darmentzündungen, die äthiologisch nicht weiter untersucht wurden (Weidenmüller, 1971).

Plowright (1969) isolierte außer dem oben genannten Giraffenisolat noch zusätzlich BVD-Virus aus einem kranken Büffel (*Synercus caffer*) der in Zentralafrika geschossen wurde. Dieser Büffel war an einem Krankheitsausbruch beteiligt, der auch Elenantilopen (*Taurotragus oryx*) und Warzenschweine (*Phacochoerus aethiopicus*) erfasste.

Unter wildlebenden Tieren ist die BVD/MD beim Damhirsch (*Dama Dama*) in England (McDiarmid, 1975) und Australien (Munday, 1972), beim Dickhornschaf (*Ovis canadiensis*) in Nordamerika (Parks und England, 1974), beim Gabelbock (*Antilocapra americana*) in Kanada (Barett und Chalmers, 1975) und bei Rentieren (*Rangifer tarandus*) (Steger, 1973) festgestellt worden. In Bayern wurde im Zeitraum 1973 bis 1976 Fallwild untersucht, um einen Überblick über die Krankheitsursachen zu geben. Innerhalb der vier Jahre wurden insgesamt 1033 Stück Fallwild, davon 580 Rehe, untersucht. 1976 konnte bei zwei Rehen mit Abomasitis sowie starker Enteritis ein als BVDV bezeichnetes Virus aus der Milz, der Labmagenschleimhaut und den Darmlymphknoten isoliert werden. Ob es sich um eine Infektion auf virusverseuchten Rinderweiden handelt, konnte nicht geklärt werden (Schellner, 1977). Vier weitere Fälle von klinischer Mucosal Disease bei Zootieren, nämlich bei Damhirsch, Axishirsch (*Cervus axis*) sowie bei weitern Cerviden wurden berichtet (Behlert, 1979). Nettleton *et al.* (1980) isolierten in England BVD-Virus aus einem Rothirsch (*Cervus elaphus*). Das Jungtier starb nach 24 Stunden unter ungewöhnlichen Symptomen, unter anderem zentralnervösen Störungen. In der Sektion wurde ein mit Flüssigkeit und Blut gefülltes Ileum gefunden. BVD-Virus konnte angezüchtet werden und zeigte einen zytopathischen Effekt in der Zellkultur. Zwei der 15 Hirsche, die mit dem Jungtier in Kontakt waren, hatten im BVDV-Serumneutralisationstest Antikörpertiter von 1:80.

Aus dem Tiergesundheitsamt in Oldenburg stammt der Bericht von einem im Gatter gehaltenen Damhirsch. Das Tier verendete nach drei Tagen Fieberphase. Pathologisch-anatomische Veränderungen konnten in der Sektion in Form von Entzündungen am Epikard und Blutungen auf der Labmagenschleimhaut gefunden werden. Im Organpool von Parotis, Milz- und Darmlymphknoten konnte BVD-Virus nachgewiesen werden (Neumann *et al.*, 1980). Zwei Jahre später veröffentlichten Weber *et al.* (1982) einen Artikel über das Vorkommen des Virusdiarrhoe/ Mucosal Disease-Virus bei Cerviden in Rheinland- Pfalz. 81 Organproben wurden untersucht, bei drei in Gattern gehaltenen Damwild wurde nichtzytopathogenes BVD-Virus nachgewiesen. Zusammenfassend zeigten alle drei Tiere klinisch Abmagerung und Durchfall, pathologisch-anatomisch wurden eine gerötete Labmagenschleimhaut mit zahlreichen blutigen Ulcera und katarrhalische Darmentzündungen gefunden. Der Autor resümiert, dass aufgrund des zwischen den Damwildhaltungen üblichen Tieraustausches die Möglichkeit der Einschleppung des Erregers mit klinisch gesunden Virusträgern auf der Hand liegt.

Nach einem Bericht von Schellner (1982) konnte bei 125 erkrankten Damwildtieren im Zeitraum von 1977 bis 1982 kein BVD-Virus isoliert werden.

Aus fünf exotischen Wiederkäuern, die in verschiedenen nordamerikanischen Zoos gehalten wurden konnte nzp BVD-Virus isoliert werden. Die Wildwiederkäuer waren eine Nilaugenantilope (*Boselaphus tragocamelus*), ein Axishirsch, ein Barigahirsch (*Cervus duvanceli*) und zwei Weißschwanzgnus (*Connochaetes gnu*) (Doyle und Heuschele, 1983). In Schweden konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz nzp BVD-Virus bei einem im Gatter gehaltenen Damwild festgestellt werden (Diaz *et al.*, 1988).

Baradel *et al.* (1988) berichten über die Isolierung eines *Pestivirus* beim Rothirsch aus Frankreich, welches nicht mit dem klassischen BVD-Virus identisch sein soll.

Auf der Suche nach *Pestiviren* wurden im Jahr 1994 in Zimbabwe Blutproben von Elenantilopen (*Taurotragus oryx*) gesammelt. 1539 Proben wurden in einem indirekten ELISA getestet, wobei 32% der Proben Antikörper enthielten (Anderson und Rowe, 1998). 303 der seronegativen Proben, die aus Gebieten stammten, in denen seropositive Tiere lebten, wurden mit Hilfe eines Antigen-Capture-ELISA vorselektiert und anschließend Virus in der Zellkultur isoliert. In drei Tieren wurde nzp BVD-Virus gefunden. Alle drei Tiere waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch unauffällig. Eines dieser drei Tiere konnte als persistent virämisch bestätigt werden, da aus seiner Blutprobe, die zufällig bei einer späteren Untersuchung genommen wurde, erneut Virus isoliert werden konnte. Dieses Tier magerte später ab, entwickelte eine fieberhafte Erkrankung und starb. Die anderen beiden Tiere waren in einer zweiten Untersuchung Virus negativ, hatten aber Antikörper gegen BVDV. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass in der Elenantilopenpopulation BVD-Virus beherbergt wird. Eine genetische Typisierung des Antilopenisolates - des persistent infizierten Tieres- basiered auf einer RT-PCR der 5'-UTR ergab eine 93 prozentige Ähnlichkeit zum NADL-Stamm (BVDV 1a) (Vilcek *et al.*, 2000).

Ein nichtzytopathogenes BVDV wurde aus einem freilebenden Schwarzwedelhirsch (*Odocoileus hemionus*) isoliert. Das einjährige weibliche Tier stammte aus Wyoming (USA). Das im November 1997 getötete Tier war kachektisch, schwach und hatte Schaum vor dem Maul. Außer bakteriellen Erregern und Sarcozysten im Herzmuskel konnte aus dem Gehirn, der Lunge und dem Herzen BVD-Virus isoliert werden. Eine Sequenzierung der 5'-UTR ergab die Zuordnung zu BVDV Typ 1a. Um eine Abschätzung der Verbreitung von BVD-Virus in der Hirschpopulation zu machen, wurden 124 Seren von freilebenden Schwarzwedelhirschen aus der selben Region untersucht; zum Vergleich wurden 59 Hirschseren aus Gehegehaltung gewonnen. 74 von 124 (60 %) der freilebenden Hirsche hatten Antikörper gegen BVDV Typ 1a, Titer zwischen 1:4 bis 1:512. Alle Proben aus dem Gehege waren negativ. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Hirsche das BVD-Virus in

ihrer Populationen beherbergen. So können Virusübertragungen stattfinden, da Hirsche und Rinder Weideflächen, Futter und Wasserquellen miteinander teilen (Van Campen *et al.*, 2001).

Ein totgeborenes Alpaca (*Lama pacos*) wurde in Minnesota, USA, untersucht. Es konnten keine pathologisch-anatomischen Veränderungen festgestellt werden. In einem Pool aus Lungen-, Leber- und Gehirngewebe konnte BVD-Virus gefunden werden, das als nzp BVDV Typ 1b genauer charakterisiert werden konnte (Goyal *et al.*, 2002).

2.1.2.3 Experimentelle Infektionen von Wildwiederkäuern mit BVDV

Einige experimentelle Infektionen bei Wildwiederkäuern sind in der Literatur beschrieben.

Ein sieben Monate altes schottisches Rothirschkalb (*Cervus elaphus*) zeigte im Serum neutralisierende Antikörper gegenüber BVD-Virus. Dieses Tier wurde intramuskulär mit einem BVDV-Isolat aus einem an MD verendeten Stier geimpft. Nach der Impfung stieg der SNT-Titer von 1:40 auf 1:160. Gleichzeitig wurde ein zunächst seronegatives Stück Rotwild mit dem gleichen Virus intramuskulär geimpft und ein drittes Tier bekam das Virus oral und intranasal appliziert. Beide letzten Tiere zeigten eine Serokonversion. Des weiteren zeigte keines der drei Tiere klinische Anzeichen (McMartin *et al.*, 1977).

Zwanzig Jahre später wurden an der Universität Wyoming vier Schwarzwedelhirsche (*Odocoileus hemionus*) und ein Weißwedelhirsch (*Odocoileus virgianus*) intranasal mit dem BVD-Virusstamm New York-1 inokuliert. Ab dem Tag zwei nach der Infektion bis Tag 15 konnte Virus einmal oder mehrmals aus den weißen Blutzellen isoliert werden; dies zeigt, dass eine systemische Verbreitung des BVD-Virus stattgefunden hat. Zwischen Tag zwei und acht nach der Infektion konnte zudem Virus ein- bis dreimal aus Nasentupfern der Hirsche isoliert werden. Drei Wochen nach der Infektion stiegen die Virus neutralisierenden Antikörpertiter um das Vierfache an. In dieser Zeit konnten keine klinischen Symptome festgestellt werden. Dies zusammen zeigt, dass Hirsche empfänglich sind für BVD-Virus und Virus durch direkten Kontakt übertragen können, wie durch die Schleimhautisolate gezeigt (Van Campen *et al.*, 1997). Morton *et al.* (1990) beobachteten nach intranasaler Infektion mit BVD-Virus milde Krankheitsanzeichen bei zwei experimentell infizierten Rentieren (*Rangifer tarandus*).

Zur Charakterisierung einer BVDV-Infektion bei Hirschen (*Cervus elaphus*) wurden zwei Gruppen von je fünf Hirschen und zwei Kontrollrinder mit BVDV-Typ1 Stamm Singer bzw.

einem virulenten BVDV-Typ2 Stamm 24515 intranasal infiziert. Die Virulenz des Typ2-Isolates wurde durch die Infektion der Kontrollkuh bestätigt. Sie zeigte Durchfall, Dehydratation, schwere Thrombozytopenie, Hämorrhagien und Darmnekrosen. Keiner der Hirsche, unabhängig ob mit Typ 1 oder mit Typ 2 infiziert, zeigte klinische Symptome. Durch den Nachweis von Virus in Blutproben zu mehreren Zeitpunkten nach der Infektion konnte eine systemische Verbreitung in den Hirschen gezeigt werden. Ebenfalls wurden Nasentupfer genommen, aus denen wenige Tage nach der Infektion Virus isoliert werden konnte. Alle infizierten Tiere zeigten Serokonversion und hatten im Serumneutralisationstest Titer von 1:4000 und 1:8000. Ein nichtinfizierter Kontakthirsch serokonvertierte. Insgesamt kann gesagt werden, dass nichtträchtige Hirsche keine klinischen Erkrankungen zeigen, diese Spezies aber empfänglich für Infektionen mit BVD-Virus ist und Virus ausscheiden und übertragen kann (Tessaro *et al.*, 1999).

2.2 Serologische Untersuchungen auf Antikörper gegen BVD-Virus

Es gibt eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich hauptsächlich sowie beiläufig mit der Detektion von BVDV spezifischen Antikörpern beschäftigt. Die folgenden beiden Unterkapitel sollen einen Überblick über die serologischen Untersuchungen in den letzten 40 Jahren geben.

2.2.1 Untersuchungen in Deutschland

Erste Untersuchungen auf Antikörper gegen BVD-Virus blieben ohne Erfolg. So konnten in 81 Seren von Rehen keine Antikörper nachgewiesen werde (Bögel, 1964). Die in der Jagdsaison 1975/76 durchgeführte serologische Untersuchung bei einheimischem Schalenwild fand neutralisierende Antikörper gegen BVD-Virus. Sieben von 117 (5,9 %) Rehen und fünf von 75 Stück (6,6 %) Rotwild hatten Antikörpertiter zwischen 1:5 bis 1:80. Die gleichzeitig untersuchten zwanzig Stück Damwild und zwanzig Stück Muffelwild hatten keine nachweisbaren Antikörper (Weber *et al.*, 1978).

Bei serologischen Untersuchungen mittels Serumneutralisationstest an 1344 Seren von heimischen Wildwiederkäuern – 1111 Reh-, 151 Rot-, 79 Dam-, drei Muffelwild (*Ovis musimon*) – konnten acht mal Antikörper gegen das BVD-Virus festgestellt werden. Dies

gelang zweimal beim Rotwild und sechs mal beim Rehwild. Dies entspricht 0,6 Prozent; Titer lagen zwischen 1:2 und 1:8; die Seren von Dam- und Muffelwild waren serologisch negativ (Dedek *et al.*, 1988). Liebermann *et al.* (1988, 1989) fanden in der Deutschen Demokratisch Republik bei rund zehn Prozent der heimischen Cerviden (insgesamt 372 Seren) Antikörper gegen das nah verwandte Border Disease- Virus mit Titern zwischen 1:4 und 1:128.
Des weiteren zeigte eine Erhebung in den Jahren 1990 bis 1992 mit insgesamt 355 Blutproben von 123 Rehen, 60 Stück Rotwild, 87 Stück Damwild und 85 anderen Cerviden, das 17 Proben seropositiv waren und Titer zwischen 1:5 bis 1:125 nachgewiesen werden konnten. Es waren signifikant mehr Rehwildproben als Rotwildproben serologisch positiv. Zudem war kein signifikanter Unterschied in der Seroprävalenz zwischen Gebieten mit einer hohen, intermediären und niedrigen Rinderdichte festzustellen. In Prozent ausgedrückt ergibt sich somit: 9,8 % beim Rehwild, 5 % beim Rotwild und 1,1% beim Damwild (Frölich, 1995).
In einer groß angelegten Untersuchung zum Vorkommen von Antikörpern gegen ausgewählte bovine und ovide Viruserkrankungen wurden in den Jagdjahren 1991/92 bis 1993/94 im Land Brandenburg innerhalb dieser drei Jahre insgesamt 2185 Seren gesammelt. Für 1303 Wildwiederkäuerseren ergaben sich serologische Befunde bezüglich BVD-Virus: 27 von 577 (4,68 %) Rehen, 21 von 443 (4,74 %) Hirsche und 10 von 283 (3,53 %) Stück Damwild waren Seroreagenten bezüglich Antikörpern gegen BVD-Virus (Müller *et al.*, 1997).

2.2.2 Weltweite Untersuchungen

Die Seroepidemiologischen Ergebnisse über das Vorliegen von BVD-Virus spezifischen Antikörpern in der Wildwiederkäuerpopulation ist in Tabelle 2 dargestellt. Falls nur Titer angegeben sind wurde ein Serumneutralisationstest (SNT) durchgeführt und die Titer genau bestimmt. Die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, dass überwiegend kleine Prozentzahlen an seropositiven Proben in den jeweiligen Populationen vorliegen. Vereinzelt wurden in den Beobachtungen hohe Durchseuchungen festgestellt, was eigenständige Infektionsherde, wie die bei Antilopen gezeigten Pi-Tiere, bestätigt oder aber auch einen engen Kontakt zum Rind vermuten lässt. Meist ist keine Differenzierung der Pestiviren möglich, da zum Teil nur ein Ergebnis eines Serumneutralisationstestes dargestellt wurde, was eine Zuordnung zu BVDV-Infektionen vage erscheinen lässt. Jedoch der hohe Titer einer Gabelantilope mit 1:6000 spricht für eine BVDV-Infektion oder den Kontakt mit einem sehr nahe verwandten Pestivirus.

Tabelle 2 : Serologische Untersuchungen weltweit

Quelle	Land	Tierart	positive Tiere/ Gesamtzahl	relativer Anteil	Testverfahren oder SN-Titer 1:X
Lawman *et al.*, 1978	England	Damhirsch (*Dama dama*)	4 / 50	8 %	1:15 bis 1:120
		Rothirsch (*Cervus elaphus*)	8 / 50	16 %	1: 15 bis 1:40
		Chinesisches Wasserreh (*Hydropotes inermis*)	2 / 18	11 %	1:20 bis 1:30
		Sikahirsch (*Cervus nippon*)	2 / 22	9 %	1:20 und 1:30
		Reh (*Capreolus capreolus*)	- / 50	-	SNT
Frölich und Flach, 1998	England	Davidhirsch (*Elaphurus davidianus*)	11 / 49	22 %	SNT
		Spießbock (*Oryx dammah*)	7 / 37	19 %	SNT
		Wisent (*Bison bonasus*)	5 / 28	18 %	SNT
		Chinesisches Wasserreh	10 / 137	7 %	SNT
Leila *et al.*, 1991	USA	Weißwedelhirsche (*Odocoileus virginianus*)	- / 400	-	SNT
Kahrs *et al.*, 1964	USA	Weißwedelhirsch	12 / 200	6 %	SNT
Friend und Haltermann, 1967	USA	Weißwedelhirsch	13 / 201	6 %	SNT
Riemann *et al.*, 1979	USA	Axishirsch (*Axis axis*)	2 / 57	4 %	SNT
		Damhirsch	- / 42	-	SNT
Aguirre *et al.*, 1995	USA	Schwarzwedelhirsch (*Odocoileus hemionus*)	79 / 133	59 %	SNT
		Wapiti (*Cervus elaphus canadensis*)	251 / 456	55 %	SNT
Dunbar *et al.*, 1999	USA	Gabelantilope(*Antilocarpa americana*)	- / 18	-	SNT
Taylor *et al.*, 1997	USA	Bison (*Bison bison*)	31 / 101	31%	SNT
Clark *et al.*, 1993	USA	Dickhornschaf (*Ovis canadensis*)	69 / 993	7 %	SNT
Davidson *et al.*, 1987	USA	Pferdehirsch (*Cervus unicolor*)	- / 10	-	SNT
		Weißwedelhirsch	- / 6	-	SNT
Clark *et al.*, 1985	USA	Dickhornschafe	6 / 188	3 %	SNT
Turner und Payson, 1982	USA	Dickhornschaf	- / 10	-	SNT
Stauber *et al.*, 1980	USA	Gabelantilope	2 / 143	1 %	SNT
Parks und England, 1974	USA	Dickhornschaf	1 / 29	3 %	SNT
Doyle und Heuschele, 1983	USA	Zoowiederkäuer	60/ 1390	4 %	SNT
Kocan *et al.*, 1986	Alaska	Elch (*Alces alces*)	13 / 110	12 %	1:16 bis 1:128
Zarnke, 1983	Alaska	Karibu (*Rangifer tarandus*)	2 / 67	3 %	SNT
Munday *et al*., 1966	Australien	Damhirsch	- / 532	-	SNT

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Quelle	Land	Tierart	positive Tiere/ Gesamtzahl	relativer Anteil	Testverfahren oder SN-Titer 1:X
McKenzie *et al.*, 1985	Australien	Rothirsch	16 / 405	4 %	SNT
English, 1982	Austalien	Damhirsch	1 / 86	1 %	SNT
Karesh *et al.*, 1995	Afrika	Ducker (*Sylvicapra grimmia*)	- / 77	-	SNT
Hamblin und Hedger, 1979	Afrika	Büffel (*Synercus caffer*)	605 / 1442	42 %	SNT
[nur ausgewählte		Buschbock (*Targelaphus scriptus*)	- / 38	-	SNT
Tierarten aufgeführt]		Elenantilope (*Taurotragus oryx*)	33 / 61	54 %	SNT
		Impalas (*Aepyceros melampus*)	19 / 280	8 %	SNT
		Ducker	10 / 36	28 %	SNT
		Giraffe (*Giraffe camelopardalis*)	3 / 24	13 %	SNT
Hamblin *et al.*, 1990	Tansania	Büffel	33 / 195	17 %	SNT
Anderson und Rowe, 1998	Zimbabwe	Elenantilopen	490 / 1059	46 %	SNT
[nur ausgewählte Tierarten]		Giraffe	13 / 261	5 %	SNT
		Büffel	57 / 577	10 %	SNT
Thorsen und Henderson, 1971	Kanada	Elch	4 / 22	18 %	SNT
Elazhary *et al.*, 1981	Kanada	Karibu	38 / 58	66 %	1:4 bis 1:512
Kingscote und Bohac, 1986	Kanada	Gabelantilope	92 / 210	44 %	1:3 bis 1:6561
Kingscote *et al.*, 1987	Kanada	Wapiti	12 / 23	52 %	SNT
Nielsen *et al.*, 2000	Dänemark	Rothirsche	3 / 57	5%	1:16 bis 1:45
Borchers *et al.*, 2002	Polen	Wisent	2 / 256	1 %	1:5 und 1:16
Karesh *et al.*, 1998	Argentinien	Guanoko (*Lama guanicoe*)	- / 20	-	SNT
Prieto *et al.*, 1999	Spanien	Iberiahirsch (*Cervus elaphus hispanicus*)	12 / 22	55 %	SNT
Couvillion *et al.*, 1980	Mexiko	Schwarzwedelhirsch	26 / 76	34 %	SNT
Baradel *et al.*, 1988	Frankreich	Reh	4 / 563	0,7 %	SNT
		Gemse (*Rupricapra rupicapra*)	4 / 72	5,5 %	SNT
		Steinbock (*Capra ibex*)	5 / 67	7,5 %	SNT
		Rothirsch	- / 23	-	SNT
Giovannini *et al.*, 1988	Italien	Damhirsch	25 / 43	58 %	SNT
Cuteri *et al.*, 1999	Italien	Damhirsch	10 / 224	4 %	ELISA

2.3 BVDV- Infektion beim Rind

Das Virus der BVD/MD zeigt in den Rinderbeständen weite Verbreitung. Serologische Untersuchungen Mitte der 80iger Jahre zeigen, dass etwa 90 Prozent der Rinder Antikörper haben (Dedek *et al.*, 1988). In neueren Erhebungen wurden in 75 – 80% der Milchviehherden in der Bestandsmilchprobe BVDV- Antikörper nachgewiesen (Bayerische Landestierärztekammer, 2000). Der Anteil persistent virämischer Rinder liegt im Bereich zwischen ein bis zwei Prozent (Liess *et al.*, 1987a; Radostits und Littlejohns, 1988; Thierauf, 1993; Frey *et al.*, 1996). Höhere relative Anteile können in einzelnen Herden vorkommen und erreichen bis zu 27 % (Bolin *et al.*, 1985b). Die Zuordnung zu unterschiedlichen BVDV-Genotypen, die sich auch serologisch beträchtlich unterscheiden, liegt nach relativ neuen Daten in Bayern bei 93,5% BVDV-Typ1 und 6,5 % BVDV-Typ2 (Beer und Wolf, 1999).

Die Übertragung von BVDV kann horizontal und vertikal erfolgen. Das Virus wird über Kot, Speichel und weitere Se- und Exkrete ausgeschieden und meist oronasal aufgenommen (Backer, 1995). Auch eine Übertragung über den Samen wurde beschrieben (Ricula *et al.*, 2002). Als Virusquelle fungieren transiente und vor allem persistent virämische Tiere. Eine Übertragung von BVD-Virus durch Weidestechfliegen (*Haemotopota pluvialis*, *Stomoxys calcitrans*) wurde von Tarry *et al.* (1991) beschrieben.

Entscheidend für die Folgen und Auswirkungen der BVDV- Infektion sind viele Faktoren, aber vor allem der Immunstatus, das Alter, das Trächtigkeitsstadium und die Virulenz des Erregers (Brownlie *et al*., 1984; Liess *et al.*, 1987b; Brownlie, 1990a; Brownlie, 1990b; Brownlie, 1991; Brownlie und Clark, 1993; Weiss *et al.*, 1994; Brownlie *et al.*, 2000; Becher *et al.*, 2001; Goens, 2002):

- Postnatale Infektion:

  Meist verlaufen diese Infektionen subklinisch und es lässt sich im Blut des betroffenen Tieres Leukopenie, Lymphopenie – damit verbunden eine Immunsuppression- sowie eine wenige Tage andauernde Virämie nachweisen. Milde klinische Erscheinungen sind Fieber, Anorexie, Augen- und Nasenausfluss, Diarrhö sowie Erosionen und Ulzerationen im Bereich des Flotzmauls. Es kommt zu einer Aktivierung der humoralen und zellulären Immunität, so dass etwa drei Wochen nach der Infektion hohe Antikörpertiter gegen BVDV nachweisbar sind. Das Tier baut eine langandauernde und belastbare Immunität auf. Des weitern werden im

Zusammenhang mit der BVDV-Infektion respiratorische Erkrankungen beobachtet (Ganheim *et al.*, 2002). Eine Sonderform stellen hoch virulente BVDV-Stämme dar - zuerst beschrieben in den späten 80er Jahren in den USA - die zu schweren Erkrankungen und zu einer Mortalität bis 25 % führen können (Pellerin *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998). Akute Infektionen mit diesen Viren verursachen häufig ausgeprägte Diarrhö, respiratorische Erkrankungen und ein hämorrhagisches Syndrom, das durch Thrombozytopenie und Blutungen im Bereich der Schleimhäute und in inneren Organen gekennzeichnet ist (Liebler *et al.*, 1995).

- Embryonale und fetale Infektion:

Bei Infektionen im ersten Drittel der Gravidität kommt es nach transplazentarer Infektion zur Virusansiedlung im Fötus und aufgrund der noch nicht vorhandenen Immunabwehr des Kalbes zur Ausbildung einer spezifischen Immuntoleranz. Dies hat zur Folge, dass ein persistent virämisches Tier (Pi- Tier) am Ende der Gravidität geboren wird. Diese Tiere beherbergen nzp BVD-Virus und scheiden das Virus zeitlebens in großen Mengen aus. Zu Beginn des zweiten Drittels der Trächtigkeit kann es zur Induktion von Missbildungen vor allem des Gehirns kommen wie zum Beispiel *Hydrocephalus*, Kleinhirnhypoplasie, Augenmissbildungen (Folge: Okulozerebelläres Syndrom) (Trautwein *et al.*, 1987); auch atypische ZNS-Veränderungen wurden beschrieben (Kümper *et al.*, 2000). Abb. 3 zeigt den zeitlichen

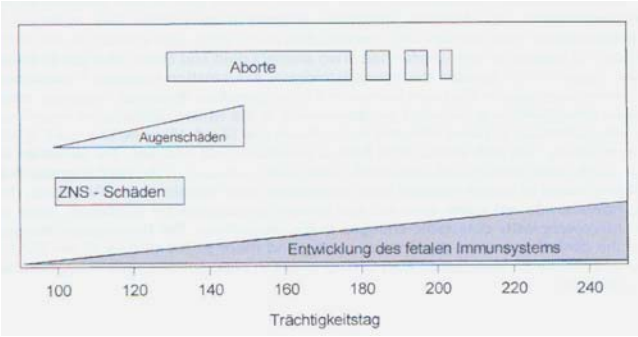


Abb. 3:
Einfluß des Zeitpunktes der BVDV- Infektion auf den Fötus (Missbildungen)

Zusammenhang zwischen Infektionszeitpunkt und Folgen (nach Liess *et al.*, 1987b; Becher *et al.*, 2001). Infektionen mit BVDV im letzten Drittel der Gravidität führen zur Geburt lebensschwacher Neugeborener und damit zu einer erhöhte Kälbersterblichkeit. Ebenso kann es zum Nachgeburtsverhalten des Muttertieres kommen. Während der ganzen Phase der Trächtigkeit kann es zur Resorption des Embryos oder zum Abort kommen.

- Mucosal Disease:

  Nur Pi- Tiere erkranken an MD durch die Superinfektion mit zp BVDV Stämmen. Diese Krankheit hat eine Letalität von 100 % und tritt meist bei Tieren bis 2 ½ Jahren auf. Klinisch äußert sich die MD in Form von ausgeprägte Erosionen und Ulzerationen an Schleimhäuten des Verdauungstrakts, im Zwischenklauenspalt. Unstillbarer Durchfall mit Tenesmus ist eines der typischen Symptome. Die Hautform der MD mit diffusen Erosionen der Haut wird auch beobachtet. Bei der chronische Verlaufsform der MD wird ein weiteres Krankheitsbild gesehen: Diabetes mellitus (Taniyama *et al.*, 1995).

2.4 Border Disease

Die Infektionscharakteristik des BD-Virus und die Pathogenese der Border Disease ist dem Infektionsgeschehen der BVD/MD ähnlich. Auch hier kann wieder zwischen postnatalen und intrauterinen Infektionen unterschieden werden. Akute Infektionen beim jungen und adulten Schaf sind klinisch inapperent und verursachen allenfalls milde klinische Symptome in Form von Fieber, Leistungsdepression und Leukopenien. Mucosal Disease-ähnliche Krankheiten können beim Schaf beobachtet werden. Bei intrauterinen Infektion kommt es ebenfalls zu Fruchtbarkeitsstörungen, Aborten, Totgeburten und zur Geburt lebensschwacher Lämmer. Bei Infektionen bis zum 60. Tag der Gravidität kommt es ebenfalls zur Ausbildung einer spezifischen Immuntoleranz. Diese Tiere sind persistent infiziert und kümmern meist. Der bekanntste Symptomenkomplex in diesem Zusammenhang ist das sogenannte ‚hairy shaker'-Syndrom, gekennzeichnet durch geringes Geburtsgewicht, derb-glattes Vlies und tonisch-klonischen Tremor sowie Ataxie. ZNS- Störungen ergeben sich durch eine De- oder Hypomyelinisierung der weißen Substanz im Gehirn (Liess *et al.*, 1982; Murphy *et al*., 1999). Gehirnmissbildungen in Zusammenhang mit intrauterinen Infektionen äußern sich in *Hydranenzephalie*, *Porenenzephalie*, *zerebelläre Hypoplasie (*Gruber *et al.*, 1995). Die meisten BD-Virusisolate sind nichtzytopathogen (Nettleton *et al.*, 1998).

Border Disease beim Schaf kann durch BD-Virus, BVDV-Typ1 und BVDV-Typ2 ausgelöst werden (Paton *et al.*, 1995a; Vilcek *et al.*, 1997; Scherer *et al.*, 2001). Nzp BVDV- Stämme (Swasdipan *et al.*, 2001) und auch zp BVDV-Stämme können intrauterine Infektion beim

Schaf auslösen (Hewicker-Trautwein *et al.*, 1994). So können persistent infizierte Rinder Schafe infizieren und damit hohe Lämmerverluste und ‚hairy shaker'- Lämmer verursachen (Carlson, 1991; Paton *et al.*, 1995b).
Das Infektionsgeschehen und die Klinik der Border Disease bei der Ziege ist homolog zur Border Disease beim Schaf (Loken, 1992; Loken und Bjerkas, 1991; Loken *et al.*, 1991; Nettleton *et al.*, 1998).

2.5 BVDV- Infektionen bei Schweinen

Sowohl experimentelle als auch natürliche Infektionen mit BVD-Virus beim Schwein wurden beschrieben (Stewart *et al.*, 1971; Fernelius *et al.*, 1973) und führten früher zu diagnostischen Problemen, da BVD-Infektionen und europäische Schweinepest aufgrund ihrer engen Verwandtschaft leicht verwechselt wurden (Carbrey *et al.*, 1976). Die BVDV-Infektionen verliefen meist subklinisch. Natürliche Infektionen basierten auf dem Kontakt zu Rindern oder dem Verfüttern von Schlachtabfällen. In experimentellen Infektionen wurden sogar intrauterine Infektionen nachgewiesen (Stewart *et al.*, 1980). So beschreiben Dahle *et al.* (1987) experimentelle Infektionen von Schweinen mit BVDV; gleichzeitig wurden Kälber mit ESP- Virus infiziert. Schweine und Kälber entwickelten hohe neutralisierende Antikörpertiter.
In einem Schweinebestand in Niedersachsen traten Fruchtbarkeitsstörungen bei Zuchtsauen auf. Wachstumsstörungen bei den Ferkeln und die Obduktionsergebnisse zweier Ferkel deuteten auf ESP hin. Vier Schweine zeigten Entwicklungsstörungen verbunden mit langen lockenähnlichen Borsten und übergroßen Ohren und Köpfen. Es wurde eine Feldinfektion mit BVD-Virus nachgewiesen (Matschullat *et al.*, 1994).
Während der Jagdsaison 1990/1991 wurden in Niedersachsen 841 Blutproben von erlegten Wildschweinen (*Sus scrofa*) gesammelt. In einem Serumneutralisationstest wurden sieben (0,8 %) positive Proben gefunden; die Titer lagen zwischen 1:10 und 1:480. Der Autor vermutet als Ansteckungsquelle Schlachtabfälle oder eine Kontaktinfektion mit virustragenden Wiederkäuern (Dahle *et al.*, 1993).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Konzept

Als Untersuchungsgebiet wurde die südliche Hälfte des Landkreis Ostallgäu gewählt, in dem auf der einen Seite durch die serologische Untersuchung der Wildwiederkäuer und auf der anderen Seite durch die serologische Untersuchung der Weiderinder, zur Abklärung der Fragestellungen folgende diagnostische Ansätze gewählt wurden:

1. Zur Untersuchung der Prävalenz von Antikörpern in der Wildwiederkäuerpopulation wurden die von Jägern in der Region entnommenen und eingesandten Wildwiederkäuerseren untersucht. Eine anfängliche Prüfung der notwendigen Testsysteme ergab, dass die drei verwendeten unterschiedlichen ELISA-Tests (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay) für die Suche nach BVDV-spezifischen Antikörpern falsch positive Ergebnisse lieferten, nachdem die nach Testdefinition fraglichen und positiven Seren in Serumneutralisationstesten (SNT) mit BVDV-Stämmen des Typ1c, Typ2 und BDV-Stämmen (BDV Moredun und BDV 137/4 Riems) nachuntersucht wurden. Diese Divergenz der Testverfahren lässt sich durch Infektionen mit *Pestiviren*, die nicht BVDV oder BDV sind, sowie unspezifische Reaktionen der ELISAs erklären.

2. Zur Abschätzung der Prävalenz von BVDV-Infektionen in der Wildwiederkäuerpopulation wurden nur Wildseren guter Qualität ausgewählt, da die Ergebnisse der Serumneutralisationsteste bei diesen Proben am sensitivsten sind. Hämolytische und putride Seren bereiten durch Toxizitäten und bakterielle Kontaminationen vor allem in den niedrigen Verdünnungsstufen Probleme, so dass niedrige Antikörpertiter nicht erkannt werden können.

3. Titer bezüglich BVDV- und BDV-Antikörper dieser ausgewählten guten Seren wurden in den Serumneutralisationstesten bestimmt. Anhand der Zahl der serologisch positiven Wildwiederkäuer, der Antikörpertiter sowie der regionalen und individuellen Daten der Einzeltiere wurde die Vorkommenshäufigkeit von BVDV-Infektionen innerhalb

der Wildwiederwiederkäuerpopulation und die epidemiologische Bedeutung der BVDV-Problematik innerhalb der Population sowie populationsübergreifend beurteilt.

4. Aufgrund der erhöhten Kontaktmöglichkeiten der Weiderinder mit den Wildwiederkäuern, vor allem mit Rotwild, könnten sich seronegative Rinder während der Weidehaltung über den Sommer mit eventuell von der Wildwiederkäuerpopulation stammendem BVDV infizieren. In diesen Rindern könnten Serokonversionen nach dem Weideabtrieb detektiert werden und an Hand der regionalen Verteilung zugeordnet werden. Die Auswahl der Weiderinder und die Verlaufsuntersuchungen wurden mit einem Antikörper-ELISA durchgeführt. In den Fällen, in denen eine Infektion der Rinder mit BVDV während der Weidephase nachgewiesen werden konnte, wurde versucht mit virologischen und weiteren serologischen Testverfahren die Quelle der Infektion ausfindig zu machen.

3.1.2 Untersuchungsgebiet Ostallgäu

Das zu untersuchende Probenmaterial wurde von Wildwiederkäuern und Weiderindern aus der südlichen Hälfte des Landkreis Ostallgäu gewonnen. Als nördliche Grenze wurden folgende Orte festgelegt (von West nach Ost): Nesselwang, Seeg, Roßhaupten, Trauchgau (siehe Abb. 4). Im Westen wurde die Landkreisgrenze zum angrenzenden Oberallgäu, im Osten die Landkreisgrenze zum benachbarten Oberbayern gewählt. Die südliche Grenze der Untersuchungsregion wurde ursprünglich durch die Landesgrenze nach Österreich angenommen. Aufgrund der Tatsache, dass viele Weidegebiete grenzüberschreitend sind, wurden diese Weidegebiete und die entsprechenden grenznahen und grenzüberschreitenden Jagdgebiete in die Untersuchung miteinbezogen.

Auf die Gemeinschaftsweiden im Landkreis Ostallgäu wurden seit dem Frühjahr 2000 nur BVDV-Antigen getestete, freie Rinder aufgetrieben, sodass eine indirekte Untersuchung der Wildwiederkäuerfrage ermöglicht wurde (siehe Abschnitt 3.1.10). Aufgrund der landwirtschaftlichen Struktur in der Region – Weidehaltung der Jungrinder während der Sommerperiode - wird ein Kontakt der Wildwiederkäuer mit den Weiderindern ermöglicht, sodass direkte und indirekte Kontaktinfektionen stattfinden könnten. So berichteten Landwirte und Weidebetreiber aus der Untersuchungsregion über ganze Rotwildgruppen, die während der Alpungsperiode zusammen mit den Weiderindern äßen. Der alpine Bereich bildet einen

schmalen Gürtel im äußersten Süden des Landkreises; hier wird schon seit vorrömischer Zeit Alpwirtschaft betrieben. Die Lichtweidefläche der 29 anerkannten Alpen im Ostallgäu umfasst im Jahr 2002 1.737 ha mit 3.096 geälpten Rindern und 59 Pferden. Das Landwirtschaftsamt in Kaufbeuren gibt für die Rinderdichte in dieser Region 1,9 Rinder pro Hektar landwirtschaftliche Fläche an (Stand Nov. 2002).
Die relativ intensive Jagdwirtschaft in der Region ist zudem ein Maßstab für die Wildwiederkäuerdichte, die bei einer Besatzdichte des Rotwildes von 2,2 Tieren pro 100 Hektar Fläche in den Jahren 2001 und 2002 liegt. Für Gamswild und Rehwild gibt es keine Tierzählungen. Anhaltspunkte für die Reh- und Gamswilddichte geben die Abschusszahlen. Der jährliche Abschuss für Rehwild lag in dem Untersuchungsgebiet im Durchschnitt der Jahre 2001 und 2002 bei 1665 Tieren, für Gamswild im Durchschnitt der Jahre bei 335 Tieren. Beim Rotwild lag die Abschusszahl im Durchschnitt der Jahre 2001 und 2002 bei 480 Stück Rotwild (Frau Hartmann, Forstamt Marktoberdorf, persönliche Mitteilung).

3.1.3 Projektorganisation für Wildwiederkäuerblute

Die eine Seite des Untersuchungsvorhabens war die Gewinnung von Serumproben der Wildwiederkäuer aus dem Untersuchungsgebiet, um diese anschließend auf BVDV-spezifische Antikörper zu untersuchen. Um einen reibungslosen und fehlerfreien Ablauf zu sichern, wurde im Herbst 2000 in Zusammenarbeit mit drei Jägern aus der Untersuchungsregion ein Vorversuch gestartet. Geklärt werden sollte die Frage nach der praktischen Durchführbarkeit der Blutentnahme am frisch erlegten Wildwiederkäuer unter Wald- und Wiesenbedingungen, Fragen zum Versand der Proben und die Qualität des im Labor ankommenden Probenmaterials, sowie die Vollständigkeit der Probenbegleitschreiben.
Um der Verbreitung von BVDV-Infektionen in der Wildwiederkäuerpopulation umfassend zu klären, wurde versucht alle Jäger im Untersuchungsgebiet zur Teilnahme an dem Projekt zu motivieren. Im Rahmen eines Informationsabends vor Beginn der Jagdsaison im April 2001 wurden die Jäger über das Vorgehen und die Ziele der Untersuchung informiert. Basierend auf den Ergebnissen aus dem Pilotprojekt und mit Hilfe von Bildmaterial zur Darstellung der Blutentnahme am erlegten Tier wurden die Jäger aus der Region in die Technik der Blutentnahme eingewiesen. Anschließend wurde an die interessierten und teilnehmenden Jäger ausreichend Material zur Blutentnahme und zum kostenfreien Versand der Proben verteilt. Zur direkten Untersuchung der Wildwiederkäuerpopulation wurden im Zeitraum Oktober 2000 bis Januar 2003 insgesamt 624 Serumproben gesammelt und ausgewertet.

Abb. 4: Karte des Untersuchungsgebietes mit festgelegter nördlicher Grenze

OA= Oberallgäu, OB= Oberbayern ; Teilgebiete mit Nummern = Jagdreviere mit Revier-Nr.

3.1.4 Blutentnahme bei Wildwiederkäuern

Am frisch erlegten und aufgebrochenen Tier (siehe Abb. 5) wurde von den Jägern Blut entnommen, was sich auch unter Feldbedingungen relativ leicht und zügig realisieren lässt. Den Jägern wurden zur Blutentnahme am frisch erlegten Tier fortlaufend nummerierte 9 ml Serum-Monovetten (Monovette®, Firma Sarstedt) und Kanülen der Größe 1,50 x 30 mm zur Verfügung gestellt. In Rücksprache mit den drei Jägern aus dem Pilotprojekt hatten sich vier Entnahmestellen am frisch aufgebrochenen Wildwiederkäuer als günstig erwiesen:

- *Vena iliaca externa* (Brandader)
- Brusthöhle
- direkt aus dem Herzen
- *Vena cava caudalis* (hintere Hohlvene)

Mit auf der Monovette aufgesetzten Kanüle kann aus der meist klein-Finger-starken noch blutgefüllten *Vena iliaca externa*, die in der Beckenhöhle deutlich zu sehen ist, genügend Blut gewonnen werden (siehe Abb. 6). Bei einem Blattschuss – hier werden die großen herznahen Gefäße getroffen – befindet sich sehr viel Blut im Brustraum, so dass dieses durch einen kleinen Schnitt im Zwerchfell leicht zugänglich gemacht werden kann. Es kann direkt mit der Monovette aufgesaugt werden (siehe Abb. 7).

Für den seltenen Fall, dass an den zuvor genannten Stellen kein Blut gewonnen werden kann oder durch eine Verletzung des Pansens die Köperhöhlen kontaminiert sind, lässt sich Blut direkt aus dem Herzen gewinnen (siehe Abb. 8). Ein nicht so einfaches Verfahren ist die Entnahme aus der *Vena cava caudalis* (abdominaler Teil). Sie ist meist blutleer, kollabiert und ist durch den Ansatz der Gekrösewurzel und das *retroperitoneale* Fett schwer zugänglich (siehe Abb. 9).

Erläuterungen zu Abb. 5:

1	Pansen
2	Rektum, das bereits aus der Beckenhöhle herausgelöst wurde
3	gravider Uterus
4	rechte Hintergliedmaße
5	eröffnete Beckensymphyse
6	linke Hintergliedmaße
7	Darmkonvolut

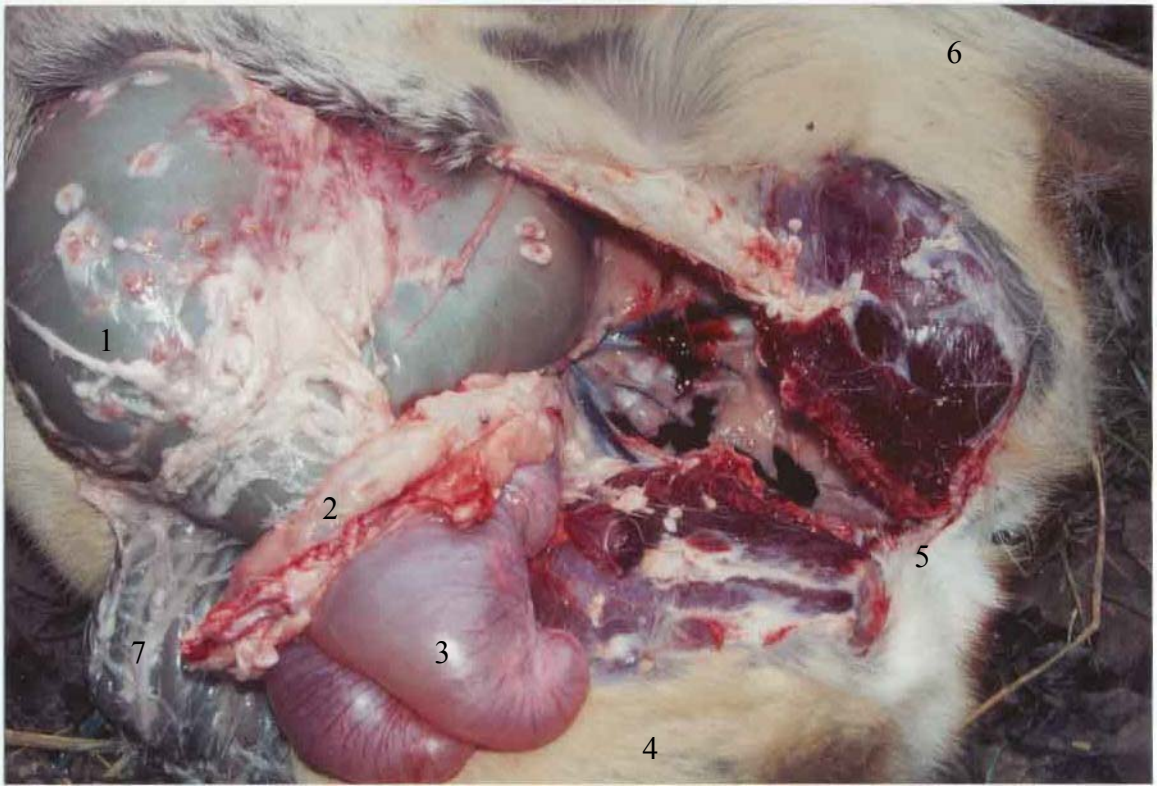


Abb. 5: Aufgebrochenes Reh (links Oben = *cranial*), Blick in die Beckenhöhle

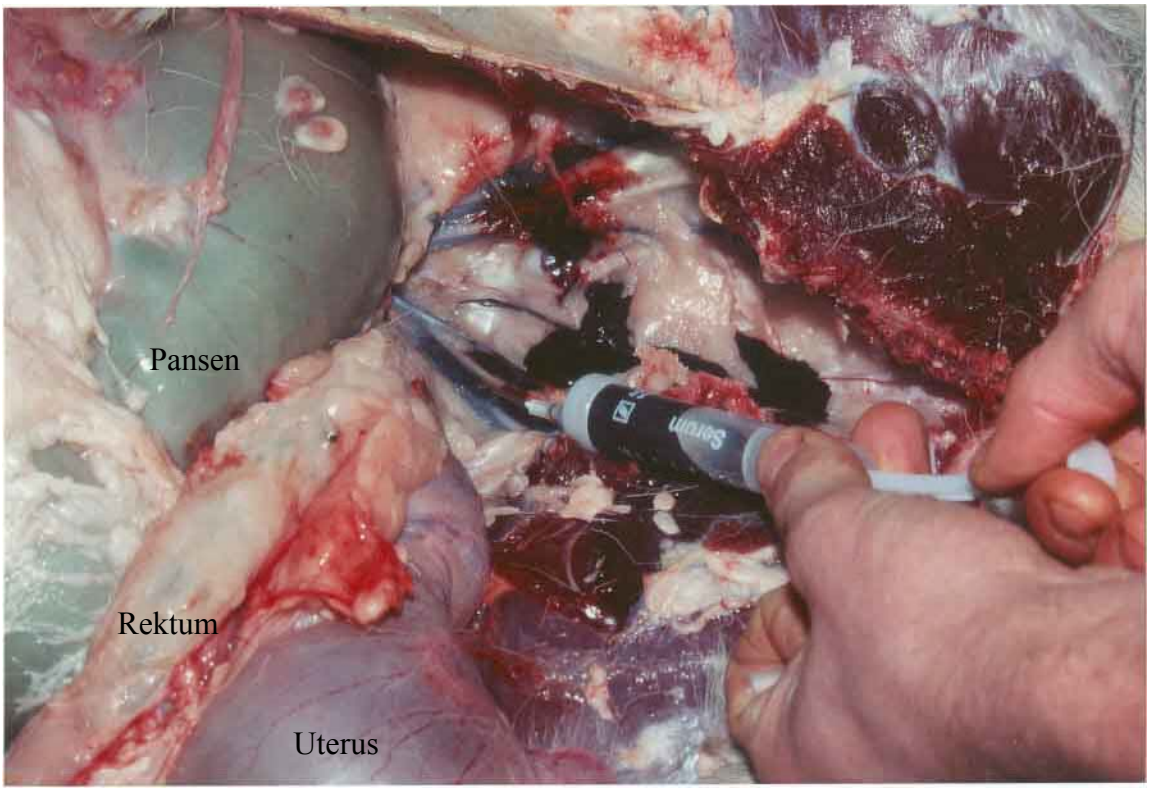


Abb. 6: Blutentnahme aus der *Vena iliaca externa* (Brandader)

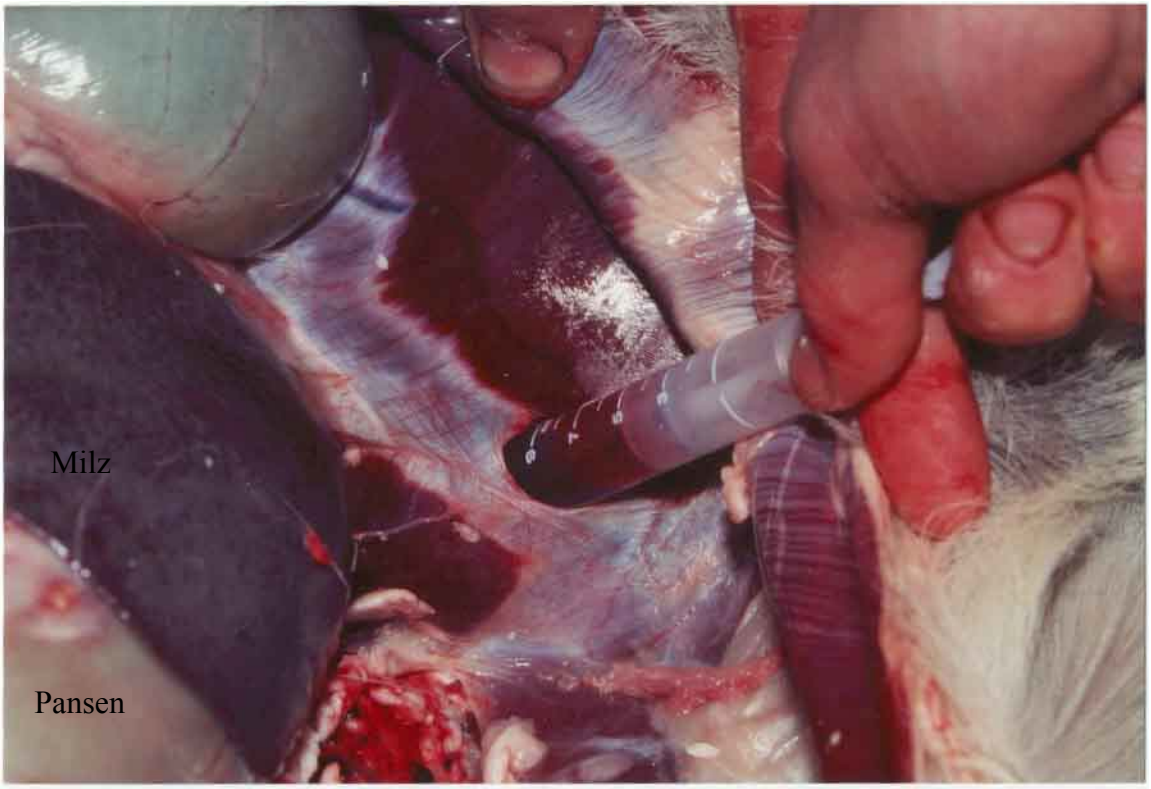


Abb. 7: Blutentnahme aus dem Brustraum durch einen Schnitt im Zwerchfell

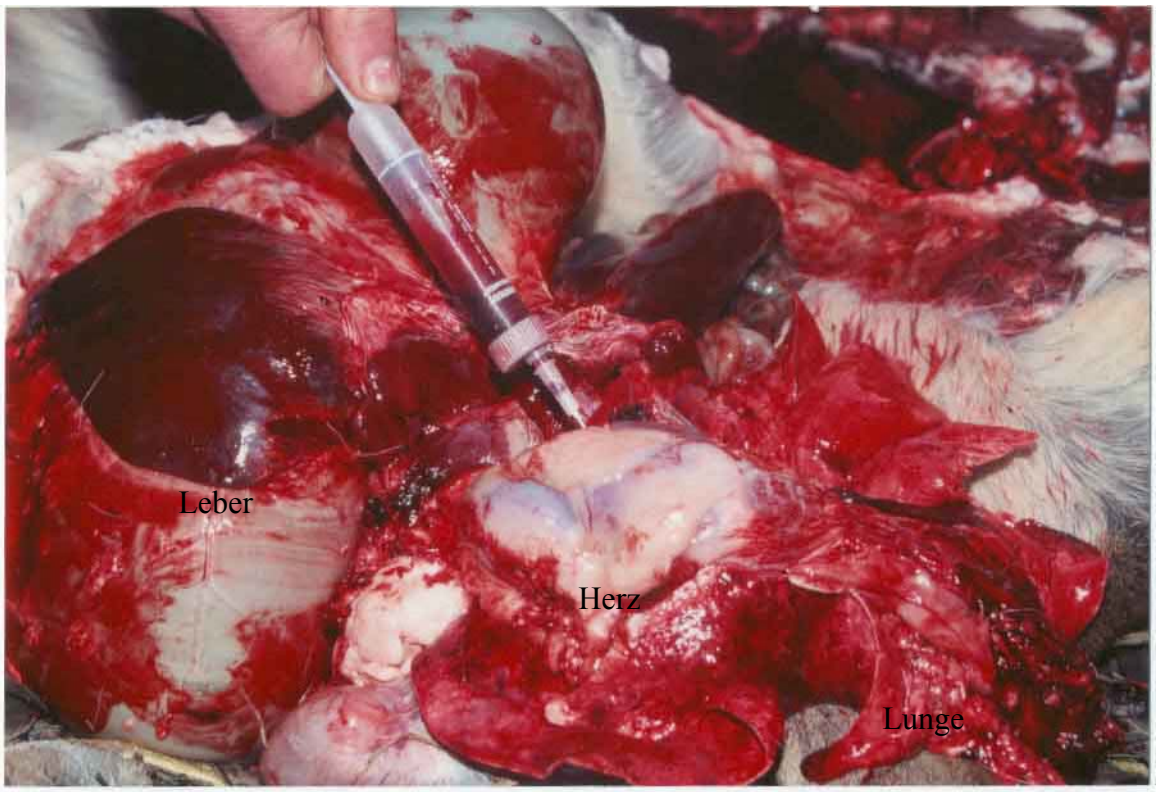


Abb. 8: Geschlinge; Blutentnahme direkt aus dem Herzen

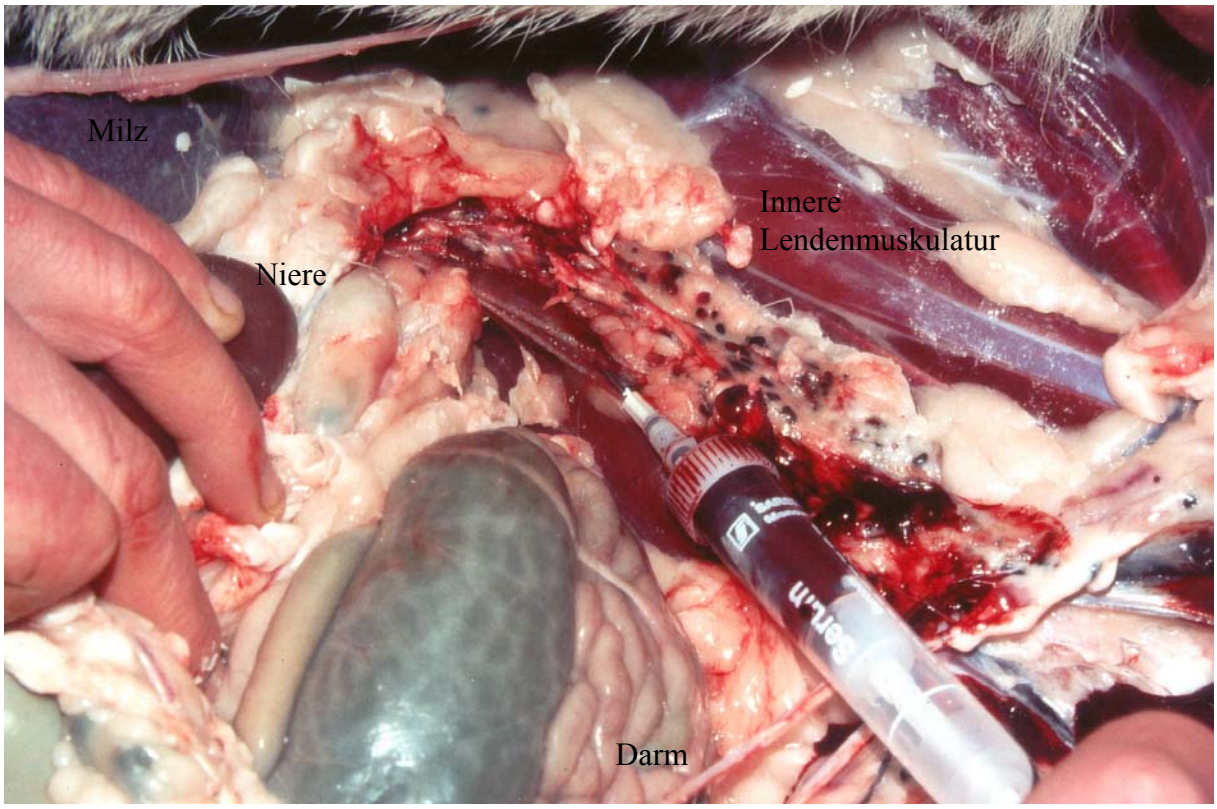


Abb. 9: Blutentnahme aus der *Vena cava caudalis* (hintere Hohlvene)

3.1.5 Versand der Wildwiederkäuerblutproben

Die Jäger erhielten Luftpolster-Versandtaschen der Größe 17 x 22,5 cm, deren Verschlusslasche mit einem Klebestreifen versehen waren. Ein zusätzlich in das Versandkuvert eingelegter Plastikbeutel mit mehreren Lagen Haushaltspapier sollte zusätzlichen Schutz bieten und als Saugmaterial ein eventuelles Auslaufen der Proben verhindern.

Je nach Größe des Reviers oder der Abschusszahlen und damit der Probenzahl, konnten in den Plastikbeutel mit dem Saug-/Polstermaterial insgesamt ein bis fünf Proben verpackt werden. Der Plastikbeutel wurde anschließend verschlossen.

Um eine Zuordnung der Probe zu Jagdrevier, Tierdaten, Gesundheitsstatus des Tieres, Labordaten und Ergebnissen zu ermöglichen, musste zu jeder Serumprobe ein Probenbegleitschreiben (Abb. 10) ausgefüllt werden. Um Material, Porto und Arbeitsaufwand zu sparen, konnten die Proben von den Jägern maximal eine Woche lang im Kühlschrank aufbewahrt und gesammelt werden.

Begleitschreiben zur eingesandten Blutprobe (Röhrchen-Nr.)

Erlegedatum : .....
Jäger : .....
Jagdgebiet / Jagdgebietsnummer : .....Nr.:.....
Tierart : ..... O männlich / O weiblich, Alter : .....

Abschussgrund : .....
Krankheitsanzeichen : O keine O ja, welche .....
(z.B. Durchfall, Abmagerung, Atemwegserkrankungen, Veränderungen in der Mundhöhle)
Veränderungen an inneren Organen : O keine O ja, welche .....
(z.B. Verfärbungen, Parasiten, Blutungen)

Eingangsdatum: ..... Lfd.-Nummer :.....
Zustand der Probe : O In Ordnung O schwach hämolytisch O schlecht
Serologie ❑
(wird von uns selbst ausgefüllt)

O Ich benötige noch Material , Tel. .....

Abb. 10: Probenbegleitschreiben

3.1.6 Aufarbeitung und Lagerung der Blutproben von Wildwiederkäuern

Die Blutproben in den Serummonovetten wurden verschlossen zehn Minuten lang bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurden mit einer 1000 µl Pipette 1,2 ml Serum steril in jeweils zwei sterile 1,5 ml Sarstedt®-Röhrchen abgefüllt und bei – 80° C tiefgefroren.

Vor dem Tiefgefrieren wurde die Probenqualität bewertet und zusammen mit der laborinternen laufenden Probennummer auf dem Probenbegleitschreiben notiert (siehe Abb. 10). Für die Qualität der Seren wurden vier Kategorien festgelegt: in Ordnung (Serum hellgelb bis gelb und klar), schwach hämolytisch (Serum hellrot bis rot und transparent), hämolytisch (Serum dunkelrot bis braun und flüssig), schlecht (Serum schokoladenfarben, flüssig bis zähflüssig).

3.1.7 Teste für den Nachweis von BVDV-spezifischen Antikörpern

Die tiefgefrorenen Seren wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut. Zunächst wurden die Proben mit Hilfe von drei Antiköper-ELISA-Tests untersucht. Die für den Serumneutralisationstest vorgesehenen Proben wurden anschließend bei 56 °C 30 Minuten hitzeinaktiviert.

3.1.7.1 IDEXX- Test

Zur Untersuchung der Serumproben wurde ein kompetitiver ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das BVD-Virus verwendet. Dieser Test der Firma IDEXX (HerdChek ELISA) ist geeignet zum Nachweis von Antikörpern in Serum-, Plasma- und Milchproben.
Testprinzip:
Die Mikrotiterplatten des ELISA sind unter Verwendung von polyklonalem Anti- *Pestivirus*-Antiserum mit BVDV-Antigenen beschichtet. Die Proben und eine Mischung aus monoklonalen BVDV-Antikörpern gegen die viralen Proteine gp53 = E2, p80 = NS 2/3) werden in die beschichtete Vertiefung eingebracht, wo sich die spezifischen Antikörper an das Antigen in der Beschichtung anlagern. Ungebundenes Material wird durch einen Waschschritt ausgespült. Anschließend wird ein mit Meerrettichperoxidase (HRPO) konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin G (IgG) zugegeben. Ungebundenes HRPO-Konjugat wird wiederum ausgewaschen. Die anschließend eingebrachte Substratlösung ruft durch die Konversion durch das Antikörper-HRPO- Konjugat eine Farbreaktion hervor. Bei einer relativ schwachen Farbentwicklung liegen in der Probe spezifische Antikörper vor (positives Ergebnis). Findet eine sehr starke Farbreaktion statt, so enthält die Probe keine spezifischen Antikörper (negatives Ergebnis). Die optische Dichte wird mit einem Photometer bei einer dualen Wellenlänge von 450 nm und 620 nm gemessen. Die prozentuale Blockierung durch die Probe wird auf der Grundlage der optischen Dichte der Probe und eines negativen Serums ohne spezifische Antikörper (negatives Kontrollserum) errechnet.
Testdurchführung:
Reagenzien und Serumprobenproben werden auf Zimmertemperatur gebracht. Zunächst werden 25µl der Serumkontrollen und Serumproben mit jeweils separaten Pipettenspitzen in die Vertiefungen gebracht. Es wurden die Kontrollseren doppelt und jede Probe einfach

angesetzt. Anschließend wird in jede Vertiefung 75µl BVDV-spezifischer Antikörper gegeben und die Mikrotiterplatte bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation werden die Vertiefungen entleert und jeweils mit 300 µl Waschlösung gewaschen. Nachdem 100 µl HRPO-Konjugat zugegeben wurde wird erneut eine Stunde inkubiert. Nach erneutem waschen wird mit 100 µl Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB)/ Wasserstoffperoxid- Lösung) inkubiert, um anschließend mit 100 µl Stopplösung (einmolare Salzsäure) die Reaktion zu beenden. Die Extinktionswerte der Proben werden bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Photometer - Modell Anthos HT II - gemessen, einem Computer transferiert, gespeichert und ausgewertet. Die OD-Werte (optische Dichte) der negativen Kontrollseren werden gemittelt und die Blockierung in Prozent für die Positivkontrollen und die Proben mit Hilfe einer Tabellenkalkulation errechnet:

$$\text{Blockierung in \%} = \frac{OD_{negativ} - OD_{Probe}}{OD_{negativ}} \cdot 100\,\%$$

Das Ergebnis der Probe gilt als positiv, wenn die Blockierung durch die Probe über 50 % , als negativ wenn die Blockierung unter 30 % liegt. Im Bereich zwischen 30 % und 50 % gilt die Probe als fraglich. Der Test ist valide, wenn die OD- Werte, gemessen bei 450 nm, der negativen Kontrollen größer als 0,75 sind. Weiterhin muss die Blockierung in Prozent durch die positive Kontrolle über 80 % betragen.

3.1.7.2 Bommeli BVD-Sero II

Dieser monophasische indirekte ELISA der Firma Bommeli ist ein Test zum Nachweis von Antikörpern gegen BVDV im Blutserum, -plasma und Milch von Ruminanten. Der Test ist nicht für Blutproben von Gemsen geeignet (persönliche Mitteilung Dr. Christian Schelp, Bommeli AG).

Die Testplattenoberfläche ist mit inaktiviertem Erregerantigen (BVDV-Stamm: NADL) beschichtet, welches Antikörper, die spezifisch gegen BVDV gerichtet sind, bindet. Die Proben werden bei einer Endverdünnung von 1:10 nach Vorlage von Probenverdünner in die Reaktionsvertiefungen gegeben und bei 37 °C eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit können eventuell in den Seren vorliegende Antikörper an das Antigen binden. Im Anschluss an die Inkubation werden die Testplatten dreimal gewaschen. Gebundene Antikörper werden mit

einem Anti-Ruminant-IgG-Peroxidase-Konjugat nachgewiesen (monoklonal, markiert mit Meerrettichperoxidase), welches ebenfalls eine Stunde lang bei 37 °C in den Reaktionsvertiefungen inkubiert wird. Nach weiteren drei Waschschritten wird bei Raumtemperatur das Chromogen auf die Platten pipettiert. Nach visueller Kontrolle der Vertiefungen mit positiven Seren wird bei blaugrüner Farbreaktion nach circa 30 Minuten eine Stopplösung zugegeben. Das Messen der Farbreaktion erfolg im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Differenz der Extinktionen zwischen negativer und positiver Kontrolle sollte größer 0,3 sein. Die Werte für die Kontrollen entsprechen dem Mittelwert der optischen Dichten der doppelt mitgeführten Kontrollen. Der Probenwert in Prozent wird auf die Positivkontrolle bezogen, die mit 100 % festgesetzt wird, und errechnet sich wie folgt aus den OD-Werten:

$$\text{Prozentwert der Probe} = \frac{OD_{\text{Pr}obe} - OD_{neg}}{OD_{pos} - OD_{neg}} \cdot 100\,\%$$

Liegt der Probenwert für Serumproben unter 20 % gilt die Probe als negativ, zwischen 20 % und 30 % als grenzwertig und über 30 % als positiv.

3.1.7.3 Bommeli CSF-Marker

Dieser kompetitive ELISA (Fa. Bommeli) dient zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen das Glycoprotein E^{rns} von *Pestiviren* – CSFV, BVDV und BDV - im Serum oder Plasma von Schweinen. Mit diesem Test kann zudem eine Differenzierung von Feld infizierten und E^{rns} freien, vakzinierten Tieren (z.B. E2-Subunit-Impfstoff) vorgenommen werden.

Die Mikrotiterplatten sind mit Anti- E^{rns}-Antikörpern beschichtet. 50 µl der Proben werden zusammen mit einer definierten Menge von E^{rns}-Antigen (rekombinantes E^{rns} aus Zellkultur) in die jeweiligen Vertiefungen gegeben und eine Stunde inkubiert bei 37°C . Durch die Zugabe von Probenverdünner ergibt sich eine Verdünnung von 1:4 für die Einzelprobe. Falls spezifische Antikörper gegen E^{rns} in der Probe vorliegen, bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, der nicht mehr an die Anti-E^{rns}-Antikörper auf der Platte binden kann. In den drei anschließenden Waschschritten wird ungebundenes Material aus den Vertiefungen herausgewaschen und ein Anti-E^{rns}-Peroxidase-Konjugat (markiert mit Meerrettichperoxidase) in jede Reaktionsvertiefung gegeben. Erneute Inkubation bei 37 °C eine Stunde lang. Dieses Konjugat bindet nun an E^{rns}, das an den Antikörpern auf der Platte

gebunden ist. Ungebundenes Konjugat wird nach der Inkubationszeit in drei weiteren Waschschritten herausgespült, um anschließend das chromogenhaltige Substrat in die Vertiefungen zu pipettieren. Nach etwa 30 Minuten stellt sich bei Zimmertemperatur eine deutliche blaugrüne Farbreaktion ein, die mit einer Stopplösung beendet wird. Die optische Dichte wird bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und ist indirekt proportional zum Gehalt von spezifischen Antikörpern gegen E^{rns} in der gestesteten Blutprobe.
Kontrollseren und Seren von BVDV-inifizierten Rindern werden auf jeder Platte im Doppelansatz mitgeführt. In der Auswertung wird nun errechnet inwieweit die Probe oder die Kontrolle die Reaktion des Anti-E^{rns}-Peroxidase-Konjugat blockieren kann. Die OD-Werte der positiven und negativen Kontrolle werden gemittelt und die Auswertung der Proben durch die Relation zur negativen und positiven Kontrolle entsprechend folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Prozentwert der Probe} = \frac{OD_{neg} - OD_{Probe}}{OD_{neg} - OD_{pos}} \cdot 100\,\%$$

Ist der Prozentwert kleiner 40 % gilt die Probe als negativ, im Bereich zwischen 40 % und 50% gilt sie als fraglich und über 50 % als positiv. Der Test ist valide, wenn die Differenz zwischen der negativen und positiven Kontrolle größer als 0,3 und der Quotient aus negativer und positiver Kontrolle größer zwei ist und der OD- Wert der negativen Kontrolle nicht über 1,8 liegt.

3.1.7.4 Bar Vac -ELISA

Die Blutproben der Weiderinder wurden mit Kabevetten® (Firma Kabe) - Lithium-Heparin als Gerinnungshemmer – gezogen. 3,5 ml Blutplasma wurde nach Sedimentation der zellreichen Fraktion gewonnen. Für die serologische Untersuchung der Weiderinder wurde ein indirekter ELISA (BAR VAC® BVDV-Diagnostikum, Vertrieb: Boehringer Ingelheim, Hersteller: Svanova Biotech) verwendet. Dieser Test weist spezifische Antikörper gegen BVDV im Blutserum , -plasma oder Milch nach. In den Reaktionsvertiefungen fixiertes inaktiviertes Antigen bindet in der zu testenden Probe vorhandene Antikörper gegen das BVDV während einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C. Anschließend wird die ELISA-Platte dreimal gewaschen. Die nun zuzuführenden monoklonalen Antikörper gegen Rinder IgG sind mit Meerrettichperoxidase (HRPO) konjugiert, die einen Komplex mit den gebundenen BVDV-Antikörpern bilden (37°C, eine Stunde). Ungebundenes Material wird durch drei

Waschzyklen weggespült. Danach zugeführtes Substrat reagiert mit dem HRPO-Konjugat. Es kommt nach etwa zehn Minuten zu einer Farbreaktion. Diese Reaktion wird mit einer Stopplösung (2 M Schwefelsäure) beendet. Sind in der zu testenden Probe keine messbaren Antikörper gegen das BVDV, so kann sich kein Komplex mit dem HRPO-Konjugat bilden und das zugeführte Substrat wird nicht gespalten; es kommt somit zu keiner Farbreaktion. Der Test ist negativ.

Für die Testdurchführung werden je 10 µl Blutplasma in jede der zwei Reaktionsvertiefung pipettiert (biphasischer ELISA: BVDV-Antigen (BVDV-Stamm: Singer) und Kontrollantigen (negativ)), so dass mit jeder 96-Loch Mikrotiterplatte bei Doppelansatz der Kontrollseren 44 Proben untersucht werden können.

Für diese Teste wurde die Laborausstattung des LGL in Anspruch genommen. Das Waschen der Mikrotiterplatte wurde mit einem Pipettierautomaten – Modell Behring ELISA Processor Typ II - durchgeführt. Die Messung und Berechnung der Extinktionswerte wurde ebenfalls mit diesem Gerät zusammen mit einer computergestützten Datenverarbeitung durchgeführt. Die OD-Werte der Proben und Kontrollen müssen vor der Auswertung korrigiert werden, indem die korrespondierenden Werte aus den Reaktionsvertiefungen mit dem Kontrollantigen abgezogen werden. Nach Berechnung der Mittelwerte der korrigierten OD-Werte ($OD_{korrigiert}$) der Kontrollen kann der Prozentsatz der OD-Werte der Proben (OD_P) berechnet werden.

$$OD_P = \frac{OD_{korrigiert,PROBE} \cdot 100}{Mittelwert \quad OD_{korrigiert,POS-Kontrolle}}$$

Für $OD_P < 10$ % gilt die Probe als negativ, bei $OD_P > 25$ % gilt die Probe als positiv, im Zwischenbereich als fraglich positiv.

3.1.7.5 BVDV- Serumneutralisationstest (SNT)

Zur Durchführung der Serumneutralisationsteste wurden zwei verschiedene Virusstämme zur Abdeckung der in der Rinderpopulation vorkommenden und relevanten BVD-Viren verwendet: BVDV-Typ1c (Stamm: PT 810) und BVDV-Typ2 (Stamm: CS 8644).
Für die Serumneutralisationsteste wurden primären bovine embryonale Lungenzellen (BEL) der zweiten bis fünften Passage verwendet. Die Seren wurden in verschiedenen Verdünnungen auf eine 96-Lochplatte gebracht und anschließend 100 KID_{50} einer Virussuspension dazugegeben. Falls BVDV-Antikörper in der Probe vorhanden sind, binden diese das Virus und neutralisieren die Infektiösität. Eine BEL-Zellsuspension wurde hinzugegeben und die Platten bei 5 % Kohlendioxid, 37 °C und Wasserdampfsättigung bebrütet. Inaktivierte Seren (Dreifachansatz) wurden in log2-Schritten auf einer Mikrotiterplatte in Erhaltungsmedium verdünnt, so dass das Endvolumen in jeder Vertiefung 50 µl beträgt. Nach Zugabe der gleichen Menge an Virus-Gebrauchsverdünnung (10^2 KID_{50}) erfolgte eine kurze Durchmischung beider Reaktionspartner und eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden in 100 µl 20000 BEL-Zellen pro Loch hinzugegeben und die Platten weiter bei 37°C inkubiert. Bei jedem Test wurde ein standardisiertes Positiv- und Negativ- Kontrollserum mitgeführt, sowie die Virus-Gebrauchsverdünnung rücktitriert.
Die Immunofluoreszenzfärbung des Neutralisationstestes erfolgte nach einer Inkubationszeit von vier bis sechs Tagen bei 37°C und 5% CO_2; eine mikroskopische Kontrolle wurde einmal täglich durchgeführt. Die mit 30 µl Paraformaldehyd fixierten Zellen (zehn Minuten im Kühlschrank) werden mittels dem Detergens Digitonin permeabilisiert. Nach fünf Minuten Inkubation mit 100 µl Digitonin und einem Waschschritt wurden 50 µl primären Antikörper (WB 103/105, Weybridge, Nummer: PA 0801) auf jedes Pellet gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wird 50 µl sekundären Antikörper (ALEXA 488, anti-Maus-Konjugat, Molecular Probes, Nummer: A 11017) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Messung am Fluoreszenzmessgerät (MWG Lambda Fluoro 320) diente in den ersten SN-Testen zur Vorabschätzung der Fluoreszenzintensität. Die Messung über das MWG Lambda Fluoro 320 wurde durch mikroskopische Kontrolle zur Titerfindung ergänzt und bestätigt. Mit der Fluoreszenzmikroskopie im Umkehrmikroskop (Modell: Axioskop 25, Firma Zeiss) wurden die gesamte Kontrollplatte und auf den Testplatten alle Vertiefungen im Grenzbereich zwischen negativ/positiv beurteilt; liegt der Grenzbereich bei Serumverdünnung < 1:8, war aufgrund möglicher Zellablösung und

Toxizität bei hoher Serumkonzentration grundsätzlich eine mikroskopische Beurteilung erforderlich. Die zuletzt durchgeführten SN-Teste wurden komplett mit der Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Durch die DNS-Färbung mit 50 µl 10^{-6} molarem Propidiumjodid waren die Zellen einfacher zu erkennen.
Neutralisationstiter der Seren wurden in Anlehnung an die Methode nach Behrens und Kaerber (Mayer *et al.*, 1977) folgendermaßen berechnet:

Neutralisationstiter $- \log 2 = \frac{a}{b} + c$

mit a = negative Reagenten des Testserums
b = Anzahl der Reagenten pro Verdünnungsstufe
c = -log2 einer evtl. Vorverdünnung des Testserums

Der SNT- Titer wird korrigiert mit Hilfe folgender Berechnung:
Rücktitrationsergebnis: 10^{2+x} ; x/log(4) = x/0,6021 = Korrekturfaktor für den Exponenten bei -log2 Angabe des SNT- Titers. Die Angabe des Titers erfolgt für die virtuelle vollständige Neutralisation (SNT_{100}).
SNT-Titer, die kleiner als 1:2 werden als negativ, Titer im Bereich 1:2 bis 1:8 werden als fraglich eingestuft. Liegt der Titer bei 1:8 und höher wird das Tier als serologisch positiv eingestuft.

3.1.8 Border Disease Virus - Serumneutralisationstest

Die Serumneutralisationsteste zur Bestimmung der BDV-Titer der ausgewählten Seren wurden von der BFAV Insel Riems durchgeführt.
Der Test wird in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit Serumverdünnungsreihen in 2-er-Stufen mit je einem Volumen von 50 µl pro Kavität hergestellt. Pro Serumverdünnungsstufe werden zwei Kavitäten (Doppelansatz) nebeneinander beschickt. Die Serumprobe des Wildwiederkäuers wird mit einer Virusmenge (Testviren: BD-Virus Isolat 137/4 und BDV Stamm Mordun) von ca. 100 KID_{50} für 1 bis 2 Stunden in Mikrotiterplatten inkubiert. Anschließend werden SFT-Zellen (Schaf Thymuszellen, Bezugsquelle: Zellbank der BFAV; Zelldichte ca. 300.000 Zellen/ml) hinzugegeben. Eine Zellkontrolle, eine Viruskontrolle und eine Rücktitration des Testvirus sowie mindestens zwei positive Referenzseren werden als Kontrollen mitgeführt. Die Inkubation erfolgt für 3-4 Tage bei 37 °C im CO_2-Schrank (5% CO_2; gesättigter Wasserdampf) . Anschließend werden infizierte Zellen durch Immunfärbung

nachgewiesen (NPLA, Neutralisation Peroxidase-Linked Assay). Die Immunfärbung wird indirekt mit einem monoklonalen Maus-anti-Pestivirus-Antikörper, einem Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat und entsprechendem Chromogen (jeweils 50 µl) durchgeführt.
Die braunrote Färbung der Zellkulturen wird mittels Umkehrmikroskop ausgewertet. Dabei gilt eine Kavität bereits als infiziert, wenn das Zytoplasma nur einer Zelle spezifisch gefärbt ist. Der Neutralisationstiter wird als der Kehrwert der Serumverdünnung bestimmt, bei der in einer von zwei Vertiefungen (50%) das Virus neutralisiert wurde. Der Titer wird als neutralisierende Dosis 50 (ND_{50}) angegeben. Ein Titer, der zwischen zwei Verdünnungsstufen liegt, wird als der Durchschnittswert zwischen diesen zwei Stufen angegeben.
Der sich aus dem SNT ergebende SN 50- Titer wurde auf den SN 100- Titer umgerechnet:

$$SN\ 100 = 2^{\log_2(SN50)-0,5}$$

3.1.9 BVD-Virus Nachweis

Zur Routinediagnostik der Weiderinderuntersuchung wurde ein Antigen-ELISA verwendet. Um Proben nachzuuntersuchen d.h. zu bestätigen wurde die FACS-Analyse gewählt.

3.1.9.1 BVDV-Antigen- ELISA

Die eingesandten Blutproben der Weiderinder im Rahmen der Weidetieruntersuchung wurden mit Kabevetten® der Firma Kabe entnommen. Diese mit einem Barcode gekennzeichneten Röhrchen fassen 3,5 ml Blut und enthalten Lithium-Heparin als Gerinnungshemmer und sind durch ihre Barcodierung automatisch zuzuordnen. Man erhält nach dem Zentrifugieren Plasma. Für die BVD-Antigenuntersuchung der Weiderinder wurde ein ELISA (Herd Check® BVDV- Ag- E^{rns} / Serum, Hersteller: IDEXX) verwendet. Es wird spezifisches Antigen in Serum, Plasma und Vollblut nachgewiesen. Die Mikrotiterplatten sind mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen E^{rns} des BVDV beschichtet. Dadurch wird in der Probe vorhandenes BVDV-Antigen an die Platte gebunden. Nach der Probeninkubation wird gebundenes Antigen durch spezifische Antikörper und ein Meerrettichperoxidase-Konjugat nachgewiesen. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen weggespült und anschließend eine Substrat (Chromogenlösung) zugegeben, die mit der Meerrettichperoxidase reagiert. Bei

Vorhandenseins des Enzyms kommt es zur Farbreaktion. Durch Zugabe der Stopplösung kommt es zum Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbreaktion wird mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und 620 nm gemessen. Das Ergebnis wird basierend auf den OD-Wert der Probe berechnet und ausgewertet.

3.1.9.2 BVDV-spezifische Immunfluoreszenz in Leukozyten

Zum Nachweis von BVDV-Antigen in Blutleukozyten der gerinnungsgehemmten Vollblutproben. Die Erythrozyten werden zunächst mit Lysispuffer lysiert. Die mit Paraformaldehyd fixierten Leukozyten werden mittels dem Detergens Digitonin permeabilisiert. So kann der primärer Antikörper in die Zelle eindringen und sich an das Antigen binden; die primären Antikörper WB 103/105 sind monoklonal, pan-*Pestivirus* reaktiv und gegen das intrazelluläre Nichtstrukturprotein NS2/3 gerichtet (Weybridge, Nr. PA 0801). Der anschließend zugegebene sekundärer Antikörper ALEXA (anti-Maus-Konjugat, Molecular Probes Nr. A11017) kann sich an den primären Antikörper binden und wird damit durch ein Fluoreszenzsignal sichtbar. Durch DNS-Färbung mit Propidiumjodid ist eine Unterscheidung zwischen Zelle und DNS-freien Partikel möglich. Die Messung erfolgt im Zytofluorometer FACScan (Becton Dickinson). Es werden 5000 Zellen pro Probe erfasst. Die Messung der grünen Fluoreszenz (Alexa) von Lymphozyten und Granulozyten/ Monozyten wird zur Auswertung des BVDV-spezifischen Signals verwendet. Zellen mit einem deutlich höheren Signal als die Kontrolle werden als BVD-Antigen positiv klassifiziert.

3.1.10 Seronegative Weiderinder und das Selektionsverfahren

Im Rahmen der pflichtgemäßen BVDV- Antigenuntersuchung aller Weiderinder wurden vor dem Auftrieb auf die Sammelweiden alle Rinder beprobt. Diese Weideuntersuchung der Rinder wurde vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim mit Hilfe eines BVDV-E^{rns}-Antigen-ELISA (Fa. IDEXX) durchgeführt.
Ein Teil der Weiderinder wurde während der Alpungsphase über den Sommer serologisch untersucht. Vorraussetzung für diese Verlaufsuntersuchung der Rinder waren BVDV-Antikörper freie Weiderindergruppen. Zudem konnte durch die Bedingung der Weidebetreiber nur BVDV untersuchte und damit BVDV-freie Rinder aufzutreiben eine BVDV-Infektionen von anderen Weiderindern weitgehend ausgeschlossen werden.
Das bedeutet, dass ein seronegatives Weiderind zum Abtrieb im Herbst immer noch serologisch negativ ist, es sei denn es wurde durch eine andere Infektionsquelle mit BVDV angesteckt.
In der Untersuchungsregion liegt die Seroprävalenz in der Rinderpopulation je nach Altersgruppe bei bis zu 80 % (Bayerische Landestierärztekammer, 2000), bedingt durch regen Viehverkehr, hohe Viehdichte, persistent infizierte Tiere – die eventuell an MD verendet sind- oder Impfung. So mussten die seronegativen Weiderinder und die dazugehörigen Herden zunächst in einem Selektionsverfahren (siehe Abb. 11) gesucht werden. Auch im Frühjahr 2001 wurden die Weiderinder auf den Gemeinschaftsweiden in der Untersuchungsregion zuvor auf BVDV-Antigen untersucht, um zu gewährleisten, dass keine BVD-Virämiker aufgetrieben werden. Die gesamte Untersuchung des Weideauftriebs in Bayern wurde vom LGL in Oberschleißheim durchgeführt.
Ziel war es etwa 300 seronegative Rinder zu finden; dazu wurden viele der eingesandten Proben aus der Untersuchungsregion dem Selektionsverfahren unterworfen, dass folgende Ausschlusskriterien hatte:
Falls in den Proben aus einem Bestand mindestens eine Probe im Antigennachweis positiv war, wurden die Proben dieser Herde nicht weiter serologisch untersucht, da davon auszugehen ist, dass in einer Herde mit mindestens einem Pi-Tier über 74 % der Rinder seropositiv sind (Thierauf, 1993). Die zweite Stufe der Selektion war ein Fragebogen, den die Landwirte zusammen mit ihrem Tierarzt ausfüllen und zusammen mit der Blutuntersuchungsliste einsenden mussten. Tierärzte und Landwirte waren durch ein vorab versandtes Rundschreiben informiert worden. Im Januar 2001 wurden alle Weidebetreiber

aus der Untersuchungsregion in einer Informationsveranstaltung über Problematik und Wichtigkeit der BVD/MD, die erneute BVDV-Untersuchung der Weiderinder und der serologischen Untersuchung der Rinder im Rahmen dieser Dissertationsarbeit informiert. Die Weidebetreiber erhielten anschließend Fragebögen entsprechend der Anzahl der Beschicker, die sie an die Landwirte im Rahmen der Weideanmeldung weiterleiteten.

In dem Fragebogen wurden allgemeine Betriebsdaten, Betriebsstruktur und die beschickte Alm abgefragt. Das weiteren wurde nach MD-Fälle oder PI-Tiere in den letzten Jahren gefragt, sowie ob eine BVD-Impfung durchgeführte wurde. Die letzten drei genannten Punkte waren Negativselektionskriterien im Auswahlverfahren für die seronegativen Herden. Sind bisher alle Punkte mit nein beantwortet worden, so wurden die eingesandten Proben der Herde serologisch untersucht. Insgesamt wurden somit die Proben von 185 Herden mithilfe eines BVDV-Antiköper-ELISA serologisch untersucht. Alle Herden, die mehr als fünf Proben einsandten und zudem maximal ein serologisch positives Tier von zehn untersuchten Rindern aufwiesen – wurden ausgewählt. Somit gelangten 31 von 185 Herden in das Verfahren der Weiteruntersuchung. Die serologischen Ergebnisse der restlichen 154 Herden wurden den jeweiligen Hoftierärzten zugesandt, um die wertvollen Informationen aus dieser serologischen Zusatzuntersuchung nutzen zu können. Da meist mehrere Jungrinder aus den Beständen zur Alpung untersucht wurden, sind diese serologischen Ergebnisse einem diagnostischen Jungtierfenster (JTF) gleichzustellen.

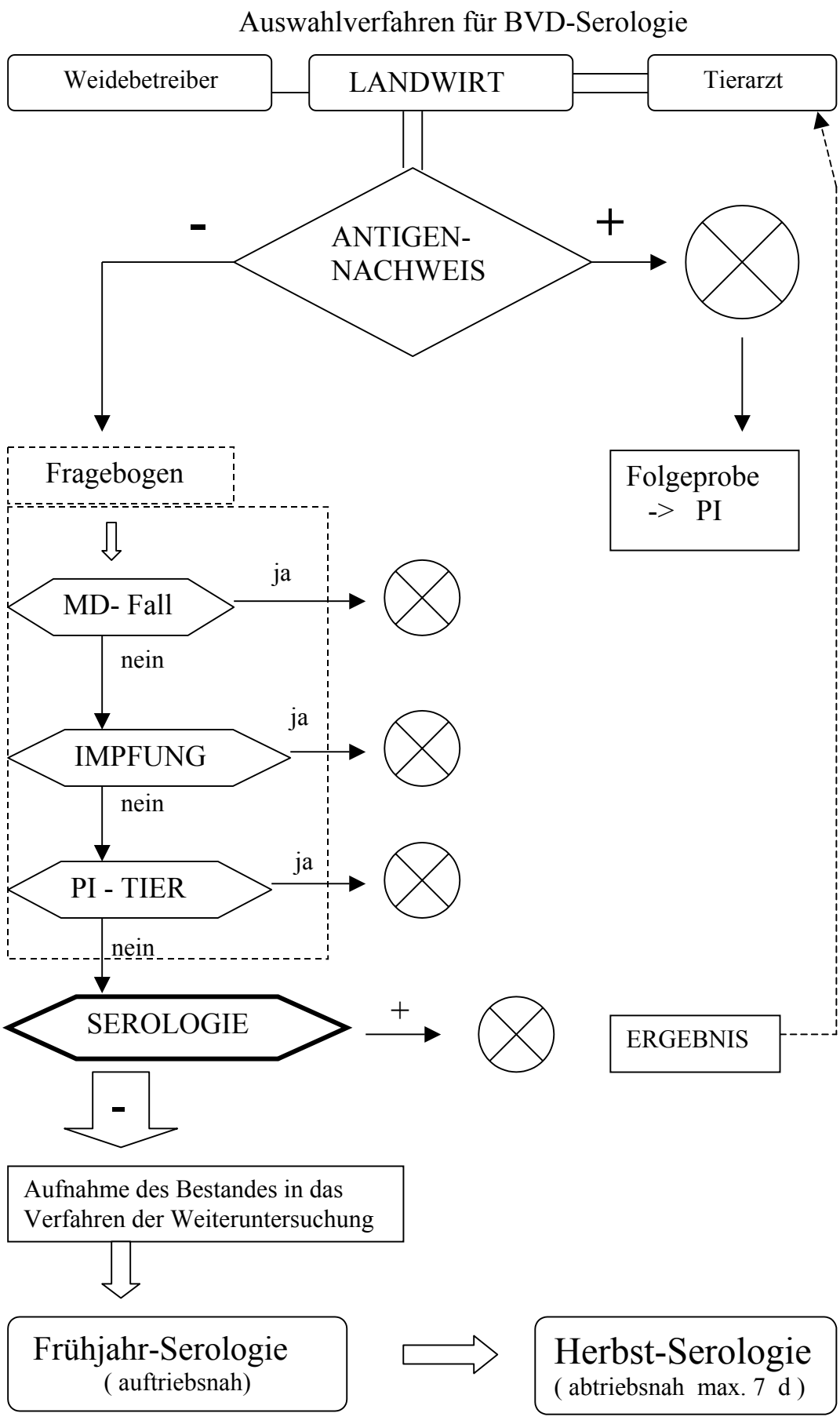


Abb. 11: Flussdiagramm des Selektionsverfahrens (Erläuterung siehe Text)

3.1.11 Kontrolluntersuchung der Weiderinder

Wie in Abb. 11 zu sehen ist, wurden die seronegativen Herden kurz vor dem Weideauftrieb d.h. in einer Zeitspanne von maximal 14 Tagen und kurz nach dem Almabtrieb innerhalb von sieben Tagen untersucht. Aus dem in Kap. 3.1.10 beschriebenen Auswahlverfahren wurden zunächst 31 Herden ausgewählt und die Landwirte dieser Herden angeschrieben:

„ ... Studie über die Ausmaße der Verbreitung der BVD/MD-Problematik im Ostallgäu wurden dieses Jahr ausgewählte Herden – ausgewählt nach der Erfassung des Herdenstatus – serologisch d.h. auf Antikörper gegen den BVD-Virus untersucht. Diese Studie läuft in Zusammenarbeit des Veterinäramts Markt Oberdorf und dem Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Fakultät München.
Bei Ihren Weiderindern habe ich bei der Untersuchung der Blutproben festgestellt, dass alle bzw. fast alle Tiere keine Antikörper haben und daher für die Studie sehr wertvoll sind. Hierbei sollen die Jungrinder über die Weideperiode beobachtet werden, indem zwei Blutproben – eine kurz vor dem Auftrieb und eine kurz nach der Sömmerung – untersucht werden. Kurz bedeutet in diesem Fall eine Zeitspanne von höchstens einer Woche .Um eine bestmöglichste Organisation und Auswertung zu ermöglichen bitte ich um Ihre Mitarbeit. Beantworten Sie bitte die unten stehenden Fragen und senden Sie dieses Schreiben in dem beigefügten frankierten und adressierten Briefumschlag umgehend an mich zurück.

Voraussichtlicher Auftriebstermin der Weiderinder : .....
Die Tiere sind bis zu diesem Termin O *im Stall* O *auf einer Weide*
Blutentnahme kurz vor dem Auftrieb möglich O *JA* O *Nein*
Blutentnahme kurz nach der Sömmerung möglich O *JA* O *Nein*
Voraussichlicher Abtriebstermin im Herbst : .... “

Da die Bereitschaft der Landwirte an dieser Studie teilzunehmen nicht durchwegs gegeben war, schwand die Zahl der Herden und damit auch die Zahl der untersuchten Tiere über die zwei Jahre. Es wurden bei den verbleibenden Weiderindergruppen die Einzeltiere vor dem Auftrieb und nach dem Abtrieb serologisch auf BVD-Antikörper untersucht. Die serologische Untersuchung eines Teils der Herden vor dem Auftrieb im Frühjahr 2002 wurde an die BVDV- Weideuntersuchung gekoppelt, so dass 16 Herden mit insgesamt 250 Rindern untersucht wurden. Zum Vergleich wurden im Jahr 2001 zunächst 31 Weiderindergruppen mit 480 Rindern untersucht.
Dieses Konzept ermöglichte es zu untersuchen, ob während der Sömmerung Infektionen mit BVDV und somit Serokonversionen stattfanden. Durch die Dokumentation der Herkunftsbetriebe, der Zeitskala, der Lage der Weiden, der Nachbarweiden und der Identität der Einzeltiere der Weideherden konnten während des Sommers stattfindende Infektionen weitgehend geklärt werden.

3.1.12 Vergleich der Seroprävalenz des Jahres 2001 und 2002 ausgewählter Weidetiergruppen

Im Rahmen der Weidetieruntersuchung und dem damit verknüpften Selektionsverfahren im Frühjahr 2001 wurden für die 154 nicht selektierten Herden wertvolle serologische Daten von 1557 Rindern gefunden. Um eine Verlaufstendenz der Seroprävalenz in der Untersuchungsregion zu erhalten, wurden die eingesandten Proben zur Weideuntersuchung im Frühjahr 2002 dieser 154 Herden erneut serologisch untersucht. Es wurde somit der serologische Status der Betriebe nach einem Jahr erfasst. Im Jahr 2002 wurden 103 Herden mit 769 Weiderindern untersucht.
Da die Adressen und LKV-Nummern der Betriebe bekannt waren, wurden im Untersuchungslabor des LGL diese Proben nach dem Abschluss des BVDV-Antigen-Test getrennt aussortiert. Es wurde nun ausgewertet wie stark die Seroprävalenz in diesen Betrieben zu- oder abgenommen hat, und inwiefern PI-Tiere in diesen Betrieben gefunden wurden. Durch die Entfernung eines Teils der Virusquellen würde man erwarten, dass die Infektionshäufigkeit in den Betrieben selbst, sowie auf den Gemeinschaftsweiden geringer und damit die Seroprävalenz der Rinder fallen wird.

3.1.13 Statistik

Bei der Binomialverteilung geht man von der Vorstellung aus, dass eine Grundgesamtheit vorliegt, an deren Einheiten ein Merkmal beobachtet wird, das nur zwei qualitative Ausprägungen besitzen kann (Kreienbrock und Schach, 2000). Für Fragestellung der Prävalenz sind diese Ausprägungen das SNT positive und das SNT negative Ergebnis. Es ergibt sich daraus die Wahrscheinlichkeit p, mit der innerhalb der vorrausgesetzten Grundgesamtheit die spezifische Eigenschaft vorliegt.
Unter Zugrundelegung der Binomialverteilung wurde im Vertrauensbereich 95 % die obere und untere Grenze für p bei vorhandenem N errechnet.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Untersuchte Wildwiederkäuer aus dem Untersuchungsgebiet

Die im Untersuchungszeitraum November 2001 bis Januar 2003 gesammelten 624 Seren verteilen sich auf die einzelnen Arten wie in Abb. 12 dargestellt. 297 Proben stammten vom Rehwild (*Capreolus capreolus*) mit einem Anteil von 47 %, 247 Proben vom Rotwild (*Cervus elaphus*) das einem Anteil von 40 % entspricht und 80 Proben von Gemsen (*Rupricapra rupicapra*) mit einem relativen Anteil von 13 %.

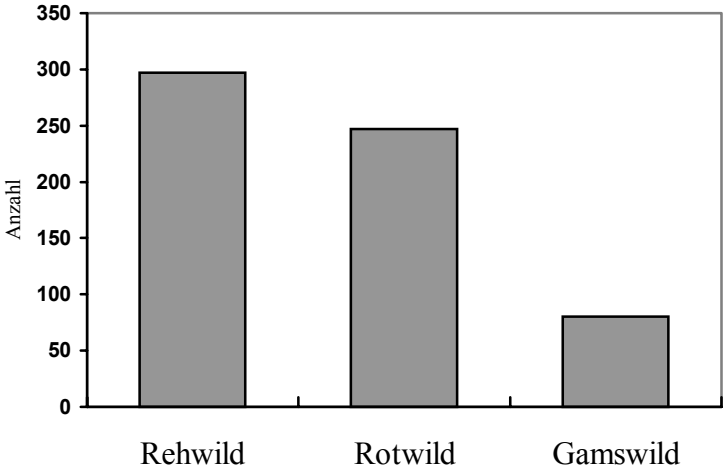


Abb. 12: Artspezifische Verteilung der Wildwiederkäuerproben

Die Proben stammten aus allen Revieren der Untersuchungsregion. Die Zahlen schwankten aber in Abhängigkeit des Abschusssolls, der Region und dem Vorkommen der einzelnen Arten in den einzelnen Jagdrevieren; ein Jäger aus einem Revier schickte mehr als die Hälfte der Rotwildproben. Insgesamt sechs Proben wurden aufgrund der sehr schlechten Probenqualität (putrider Geruch) verworfen. Sie sind in der Gesamtzahl von 624 nicht enthalten. Die Probenqualität der eingesandten Wildwiederkäuerseren wurde wie Oben beschrieben in vier Kategorien eingeteilt, die Verteilung ist in Tabelle 3 dargestellt. Insgesamt 43 % der Proben sind von guter bis mittlerer Qualität.

Tab. 3: Verteilung der Proben auf die Qualitätskategorien

Probenqualität	**Anzahl**	**relativer Anteil**
in Ordnung	114	18 %
schwach hämolytisch	154	25 %
hämolytisch	243	39 %
schlecht	113	18 %

3.2.1.1 Ergebnisse der ELISA- Testverfahren und der Serumneutralisationsteste

Zur Prüfung der Eignung der Testverfahren wurden drei ELISA-Tests zur Untersuchung der Wildseren verwendet. Zunächst wurden alle 624 Seren mit dem Blocking-Test der Firma IDEXX ausgewertet. Mit dem indirekten ELISA BVD-Sero II wurden anschließend alle Proben der Qualitätskategorie ‚in Ordnung' und ‚schwach hämolytisch' - um mit den qualitativ guten Proben eine eventuelle Korrelation mit dem SNT zu erhalten - sowie 44 Proben, die im IDEXX-ELISA fraglichen und im positiven Bereich lagen, erneut untersucht. Dieser Test umfasste 282 Proben. In einem dritten Ansatz mit dem ELISA CSF-Marker wurden die 44 Proben, die im IDEXX-Test vorselektiert wurden, und weitere 132 zufällig ausgewählte Proben guter und mittlerer Qualität berücksichtigt.

Da für die drei oben genannten ELISAs keine Erfahrungen bezüglich der Eignung zur Untersuchung von Wildwiederkäuerseren existierten, wurde nun im nächsten Schritt mit Hilfe von SNT gegen BVDV-1 und BVDV-2 versucht die bisherigen ELISA Ergebnisse zu verifizieren und differenzierten BVDV-Antikörpertiter der Wildseren zu bestimmen, um damit eine Aussage über die Sensitivität und Spezifität der ELISAs zur Untersuchung und Vorselektion der Wildwiederkäuerproben bezüglich spezifischen Antikörpern gegen BVDV zu erhalten.

Aufgrund der Toxizitäten qualitativ minderwertiger Seren gegenüber den Zellen im SNT, war beabsichtigt die insgesamt 57 % der Gesamtprobenzahl, die hämolytisch und schlecht sind, durch ein ELISA-Testverfahren zu bewerten. Minderwertige Proben sollten nur dann differenziert im SNT untersucht werden, wenn ein positives oder fragliches Signal im ELISA erzielt wurde.

In den anschließend durchgeführten Serumneutralisationstesten, in denen alle ELISA fraglichen und positiven Proben sowie alle Proben der Qualitätskategorie ‚in Ordnung' und

‚schwach hämolytisch' auf BVDV-spezifische Antikörper untersucht wurden, wurden zur Abdeckung der in der Rinderpopulation vorkommenden und relevanten BVD-Viren, ein BVDV-Typ1c (Stamm: PT 810) und ein BVDV-Typ2 (Stamm: CS 8644) verwendet, zur Abklärung anderer *Pestivirus*infektionen die BDV-Stämme BDV-Moredun und BDV 137/4. Die Ergebnisse der Neutralisationsteste sind in Tab. 4 aufgeführt. 15 Seren zeigten neutralisierende Aktivität gegenüber BVDV, 12 Seren gegenüber BDV. Die restlichen der 282 Seren waren ohne BVDV- oder BDV- neutralisierender Aktivität.

Die Verteilungen der Anzahl der Proben bezüglich der Extinktionen im indirekten ELISA oder dem Prozentsatz der Blockierung in den kompetetiven ELISAs ist in einem Histogramm dargestellt. Damit in Zusammenhang gebracht sind die BVDV-Antikörpertiter der jeweiligen Proben für beide BVDV-SNT und alle drei ELISA-Tests in den Abb. 13 bis Abb. 18 (die Zahlen neben den Tiersymbolen stellen die Titerangaben in 1:X dar). Abb. 13 und Abb. 14 zeigen den Zusammenhang zwischen SN-Titer und IDEXX-ELISA. Abb. 15 und 16 stellen die Beziehung zwischen ELISA CSF-Marker, Abb. 17 und Abb. 18 zwischen ELISA BVD-Sero II und BVDV-Antikörpertiter dar. Des weiteren zeigen die Tab. 5 bis 10 den Vergleich zwischen SNT und ELISA.

Tab. 4:

Ergebnisse der ELISAs und der SNT mit Angabe der Titer (1:X)

m/w : männlich / weiblich

io = in Ordnung; sh = schwach hämolytisch; h = hämolytisch; s = schlecht

Proben Nr.	Qualität	ELISA-OD IDEXX	ELISA BVD-Sero II	ELISA CSF - Marker	**SNT BVDV- 1**	**SNT BVDV-2**	**SNT 100 BDV Moredun**	**SNT 100 BDV 137/4**	Tierart	m / w	Alter in Jahren
201	io	35%	-2%	31%	**13,0**	**1,4**	**8,5**	**11,3**	Rotwild	m	0,25
195	io	11%	-8%	20%	**9,1**	**9,1**	**1,0**	**< 5,7** (tox)	Rotwild	m	0,25
315	io	14%	-5%	6%	**5,7**	**1,1**	**1,0**	**1,0**	Rotwild	w	0,5
346	io	51%	3%	57%	**115,0**	**2,3**	**4,2**	**17,0**	Rotwild	w	3,5
302	h	63%	22%	89%	**129,0**	**14,4**	**67,9**	**271,5**	Rotwild	m	7
439	sh	69%	48%	24%	**508,0**	**9,1**	**8,5**	**17,0**	Rotwild	m	8,5
492	h	56%	31%	73%	**302,0**	**2,3**	**11,3**	**22,6**	Rotwild	w	9
263	io	46%	28%	69%	**163,0**	**72,0**	**33,9**	**22,6**	Rotwild	m	9
324	h	35%	9%	47%	**51,0**	**2,3**	**2,8**	**11,3**	Rotwild	w	15
89	io	3%	-3%	19%	**1,0**	**5,7**	**362,0**	**135,8**	Reh	m	2,5
470	s	47%	3%	50%	**7,0**	**7,2**	**< 5,7**	**< 5,7**	Reh	m	3
274	h	80%	-9%	36%	**<= 8**	**5,7**	**> 362,0**	**362,0**	Gams	m	0,5
309	sh	35%	-5%	14%	**1,0**	**36,2**	**> 362,0**	**> 362,0**	Gams	w	0,5
258	io	84%	-6%	82%	**1613,0**	**724,0**	**135,8**	**135,8**	Gams	w	1
311	sh	35%	-2%	25%	**1,0**	**28,7**	**> 362,0**	**> 362,0**	Gams	m	1

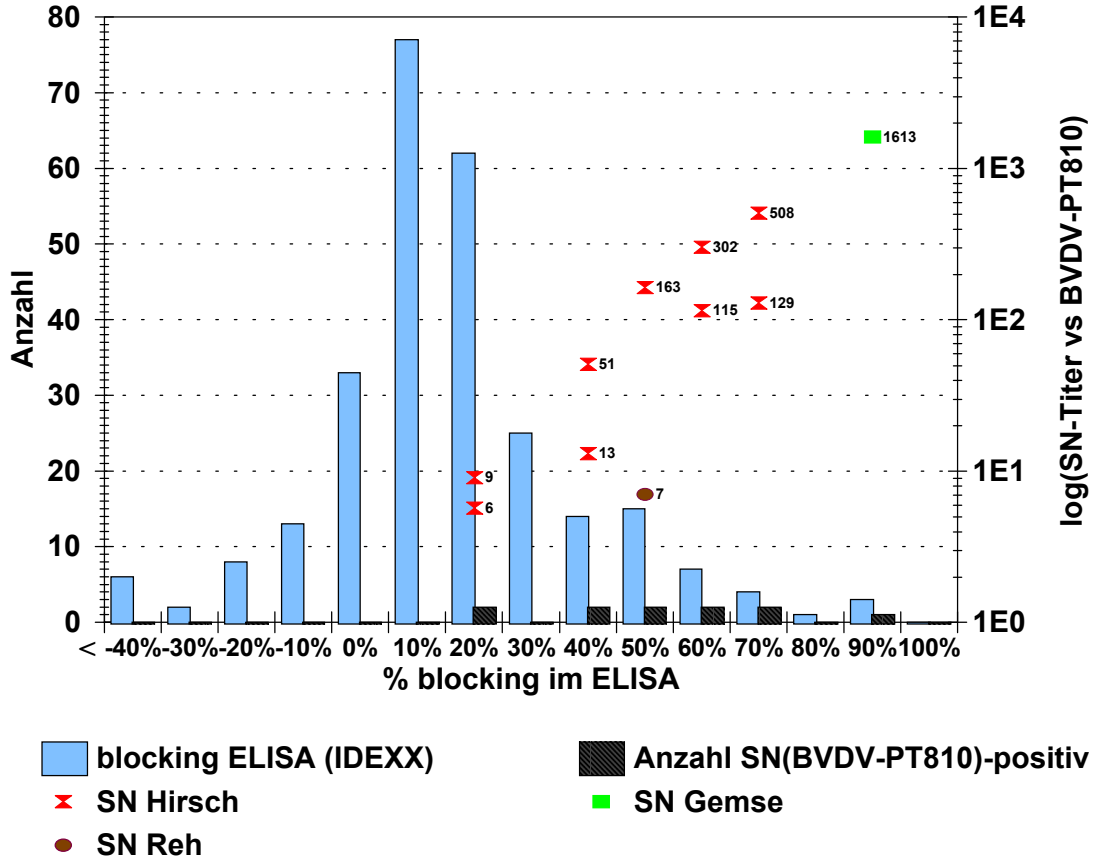


Abb. 13: Zusammenhang zwischen IDEXX-ELISA und SNT (Stamm: PT 810)

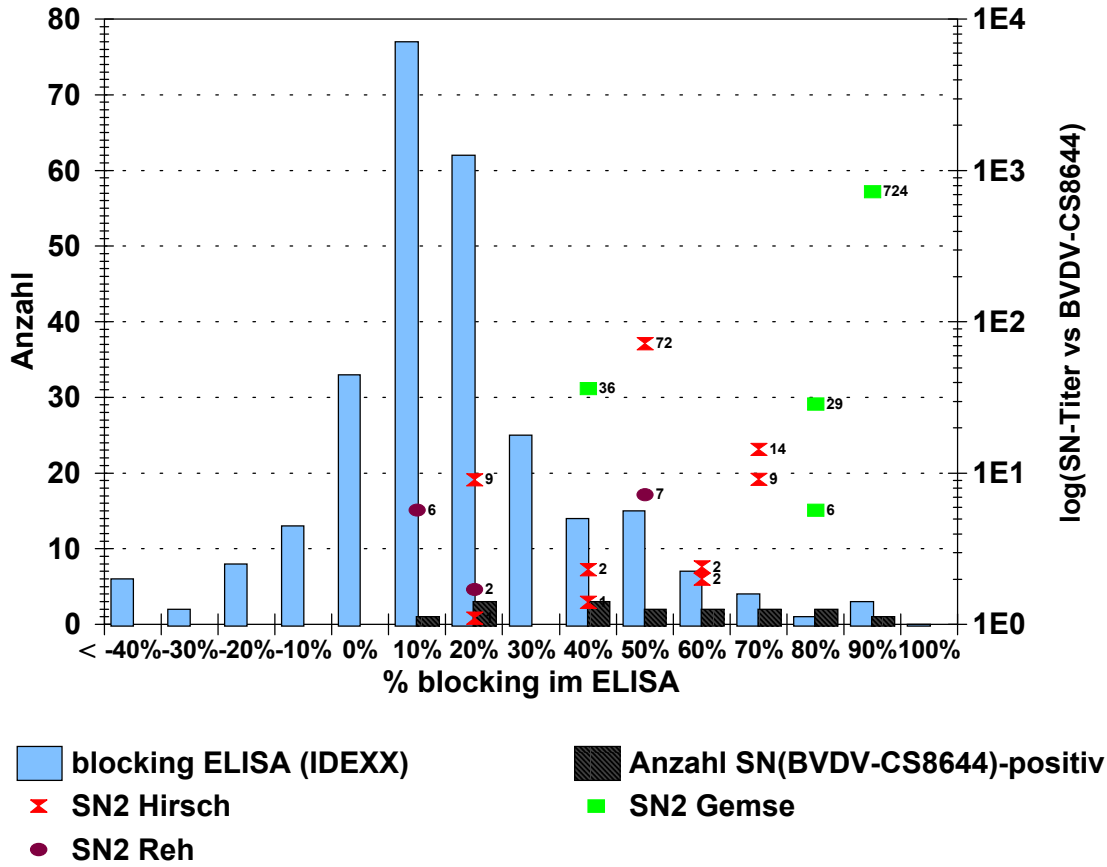


Abb. 14: Zusammenhang zwischen IDEXX-ELISA und SNT (Stamm: CS 8644)

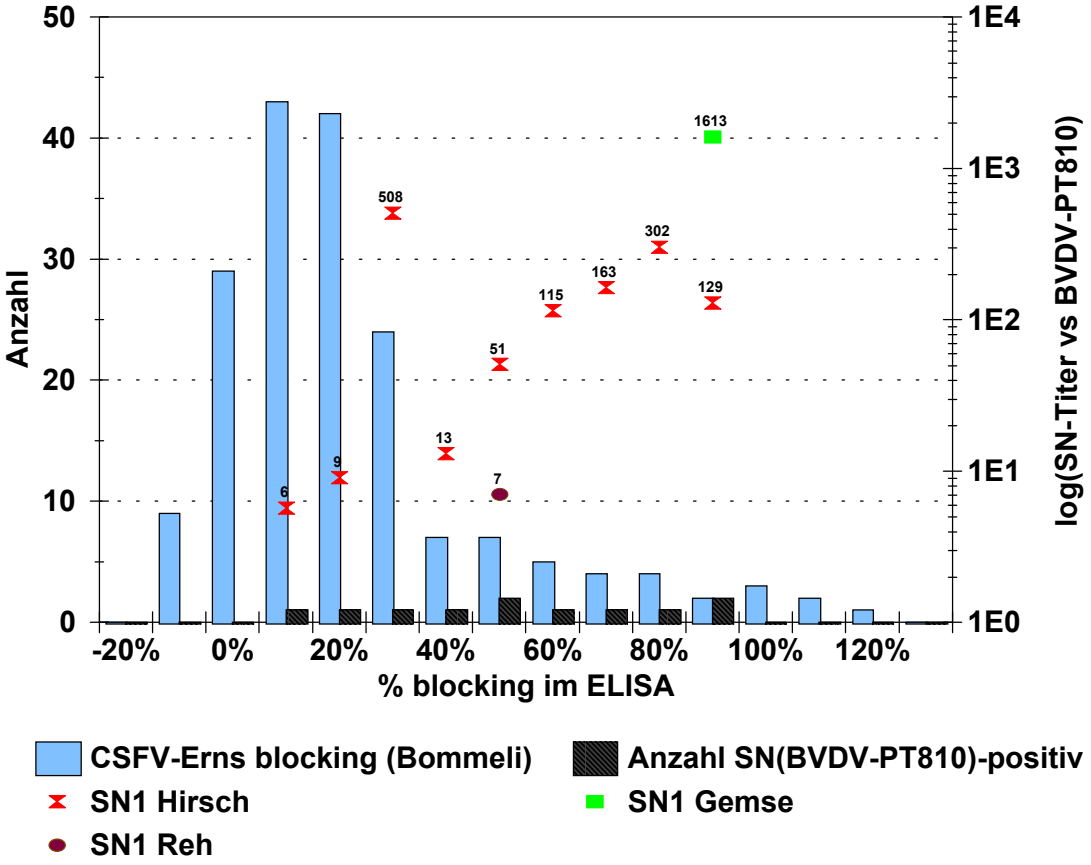


Abb. 15: Zusammenhang zwischen ELISA CSF-Marker und SNT (Stamm: PT 810)

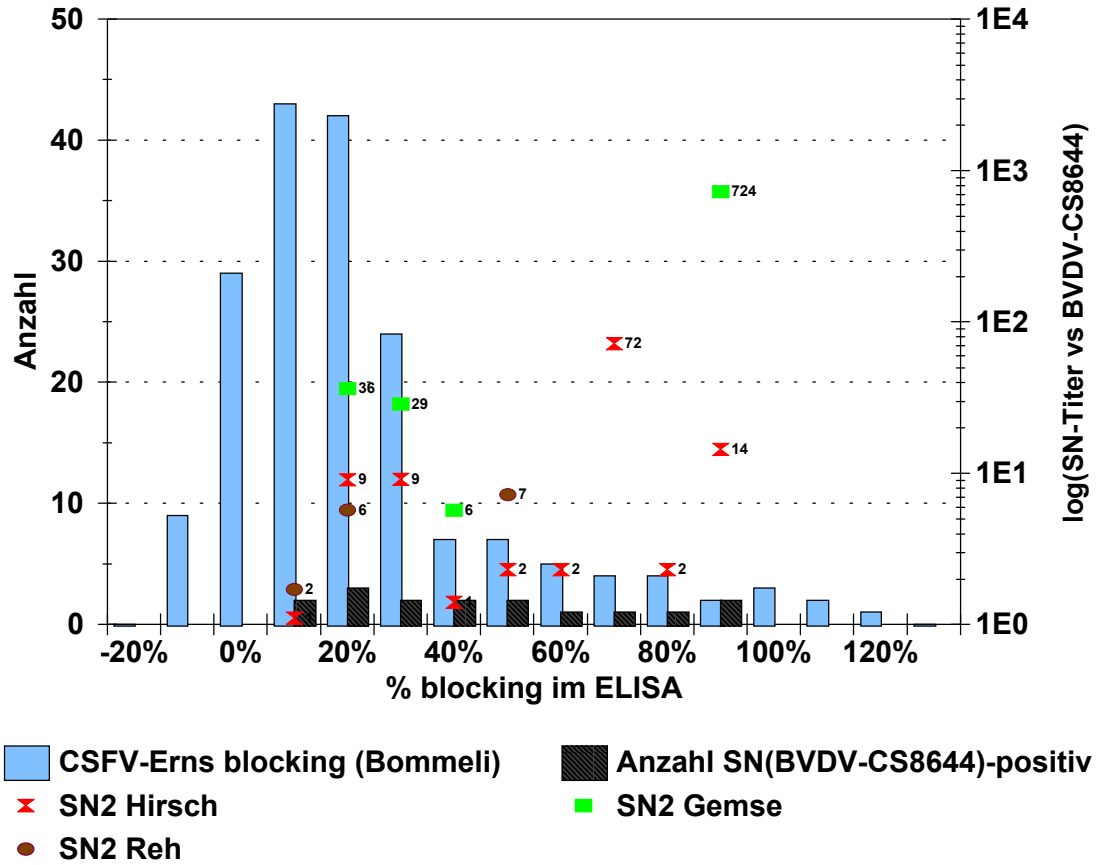


Abb. 16: Zusammenhang zwischen ELISA CSF-Marker und SNT (Stamm: CS 8644)

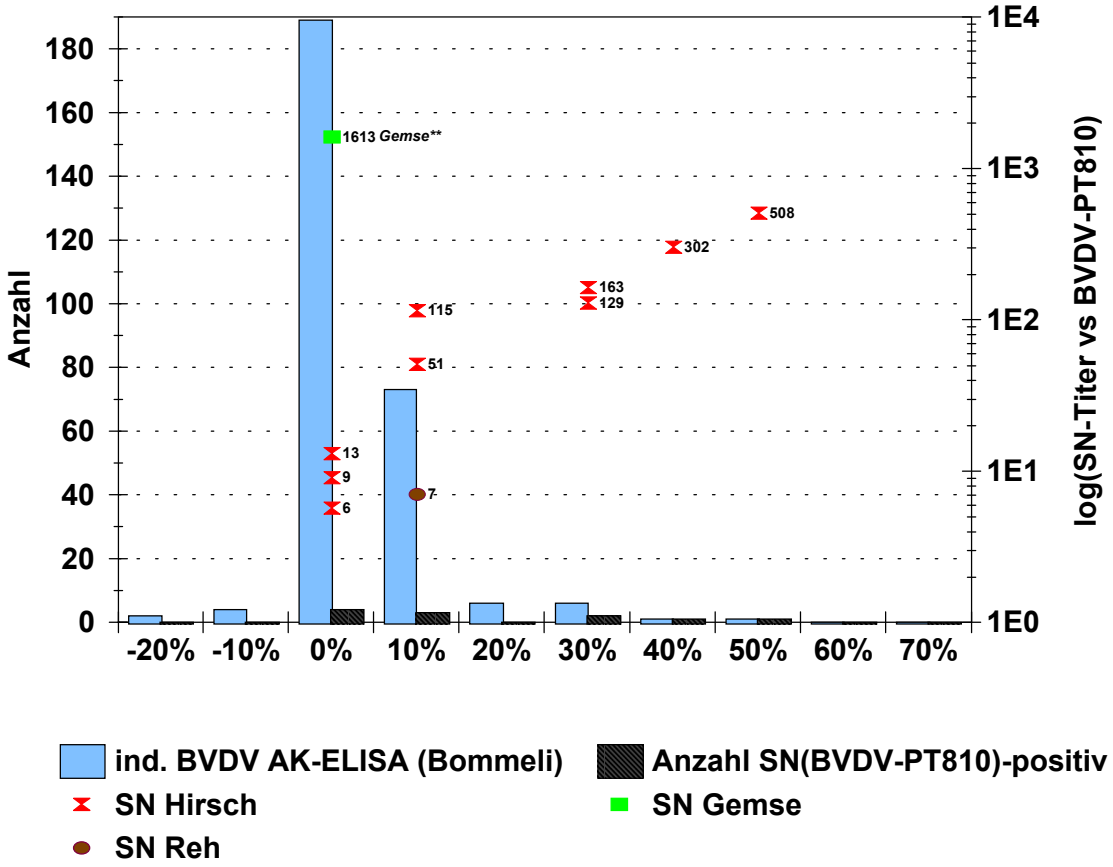


Abb. 17: Zusammenhang zwischen ELISA BVD-Sero II und SNT (Stamm: PT 810)

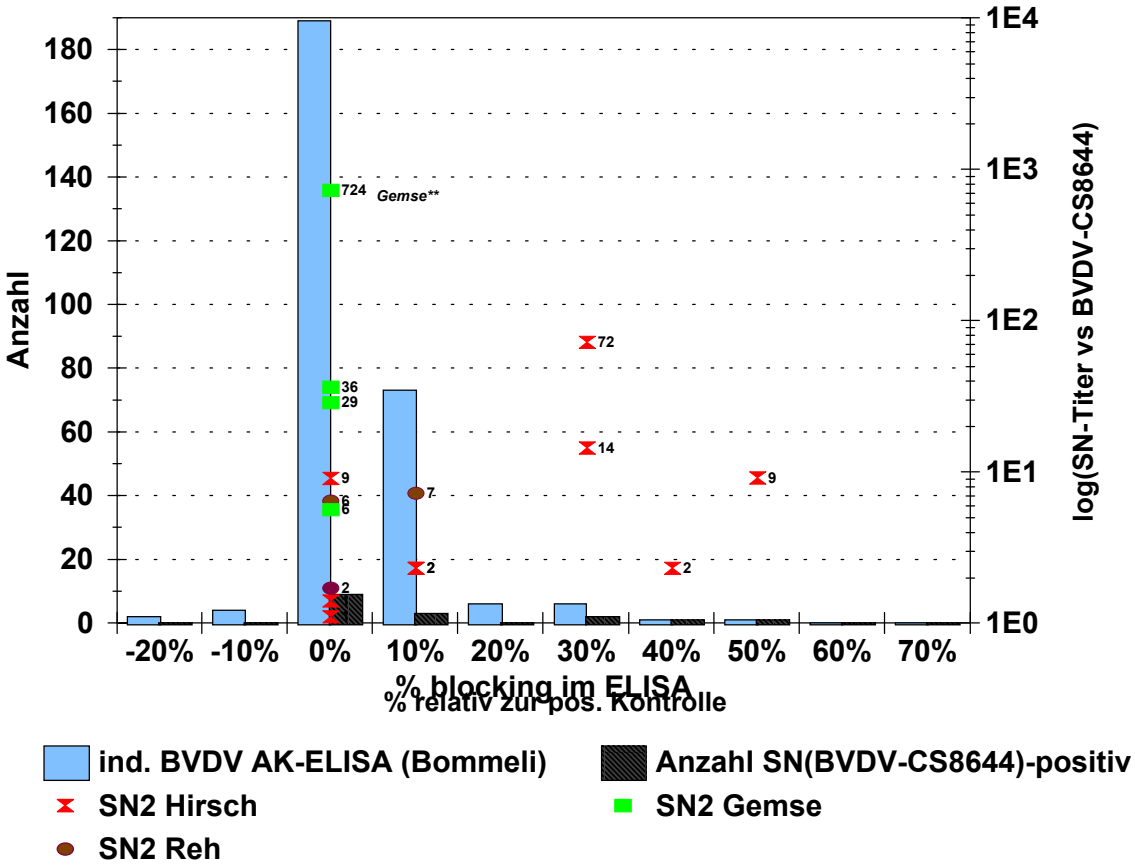


Abb. 18: Zusammenhang zwischen ELISA BVD-Sero II und SNT (Stamm: CS 8644)

Tab. 5 : Vergleich IDEXX-ELISA und SNT BVDV-1

		ELISA- IDEXX		
		negativ < 30%	fraglich 30-50%	positiv > 50 %
SNT BVDV- 1	< 1:2	236	25	9
	1:2 bis 1:8	1	1	1
	> 1:8	1	3	5

Tab. 6 : Vergleich IDEXX-ELISA und SNT BVDV-2

		ELISA- IDEXX		
		negativ < 30%	fraglich 30-50%	positiv > 50%
SNT BVDV- 2	< 1:2	236	24	9
	1:2 bis 1:8	0	2	2
	> 1:8	1	3	3

Tab. 7 : Vergleich ELISA BVD-Sero II und SNT BVDV-1

		ELISA- BVD Sero II		
		negativ < 20%	fraglich 20-30%	positiv > 30%
SNT BVDV- 1	< 1:2	266	3	1
	1:2 bis 1:8	3	0	0
	> 1:8	3	2	4

Tab. 8 : Vergleich ELISA BVD Sero II und SNT BVDV-2

		ELISA- BVD Sero II		
		negativ < 20%	fraglich 20-30 %	positiv > 30%
SNT BVDV- 2	< 1:2	265	0	0
	1:2 bis 1:8	5	0	1
	> 1:8	4	2	1

Tab. 9 : Vergleich ELISA CSF Marker und SNT BVDV-1

		ELISA- CSF Marker		
		negativ < 40%	fraglich 40-50%	positiv > 50%
SNT BVDV- 1	< 1:2	149	5	16
	1:2 bis 1:8	2	0	1
	> 1:8	3	1	5

Tab. 10 : Vergleich ELISA CSF Marker und SNT BVDV-2

		ELISA- CSF Marker		
		negativ < 40%	fraglich 40-50%	positiv > 50%
SNT BVDV- 2	< 1:2	148	5	16
	1:2 bis 1:8	2	1	3
	> 1:8	4	0	3

Die Bewertung der ELISA-Ergebnisse erfolgte nach Anweisung des Herstellers für die zugelassene Spezies. Da nur ein kleiner Teil der ELISA positiven Proben im SNT bestätigt werden konnte, ist aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass die ELISA Testverfahren bezüglich BVDV-Antikörper falsch positive Ergebnisse liefern, zum Beispiel der CSF-Marker-Test, der wie in Abb. 15 erkennbar im Bereich 100 % bis 120 % sechs positive Proben anzeigt, die aber keinen Titer gegenüber den getesteten BVDV-Stämme nachweisen lassen. Niedrige SN-Titer in der Größenordnung von 1:10 führten bei keinem ELISA zu einem ausreichend sicher positiven Ergebnis. Erst im Bereich höherer Reaktivitäten ist bei SN-positiven Proben eine Korrelation zwischen Antikörpertiter und ELISA Ergebnis erkennbar.

Betrachtet man die Korrelation schneidet der indirekte ELISA BVD-Sero II scheinbar am schlechtesten ab. Das Konjugat erkennt nach Angaben des Herstellers Rotwild- und Reh-IgG, nicht aber Gemsen Immunglobuline, so dass letztere aus der Betrachtung herausgenommen werden müssen. Zudem erkennt man, dass der Zusammenhang zwischen ELISA Ergebnis und dem Titer gegen BVDV-Typ1 deutlicher korreliert ist als mit dem Titer gegen BVDV-Typ2.

Vergleicht man die Anzahl der fraglichen und positiven Proben laut Testdefinition des IDEXX-ELISA aus dem Probenumfang mit guter Qualität mit der Zahl der Reagenten aus dem Probenumfang putrider Qualität, erkennt man, dass der ELISA bei schlechter

Probenqualität signifikant (p= 0,0005, Chi-Quadrat-Test) weniger testpositive Ergebnisse liefert. Das heißt der ELISA ist nicht geeignet zur Detektion aller positiver Proben, wenn die Probe hämolytisch oder sogar von schlechter Qualität ist, da die Probenqualität als unabhängig vom BVDV- Antikörperwert des Probanden angenommen werden kann.

3.2.1.2 BDV-Serumneutralisationstest

Die 15 Seren von Wildwiederkäuern, die eine neutralisierende Aktivität gegenüber BVDV-1 oder BVDV-2 aufwiesen, sowie 21 Seren, die im E^{rns} ELISA (CSF-Marker) Werte von größer gleich 40 % aufwiesen, wurden im BDV-SNT untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 mit dargestellt. Von den 21 Seren, die im CSF-Marker hohe Reaktionen zeigten, wurde in keiner Probe signifikante Titer gegen BDV gefunden.
Drei junge Gemsen wiesen sowohl gegen BDV Moredun als auch BDV 137/4 SN-Titer größer 362 auf, eine Gemse hatte einen BDV-Titer von 136 gegen beide Stämme. Ein Reh war im BDV-SNT deutlich positiv mit einem Titer von 362 gegen BDV Moredun und 136 gegen BDV 137/4, bei einem zweiten Reh war das Serum im Test bis zur Verdünnungsstufe 1:8 toxisch, ein niederer SN-Titer kann nicht ausgeschlossen werden. Beim Rotwild wies ein Tier gegen BDV 137/4 einen Titer von 272 und gegen BDV Moredun 68 auf, bei sechs weiteren Tieren lagen die BDV-Titer zwischen 3 und 34 für beide BDV-Stämme.

3.2.1.3 Vergleich zwischen SN-(BVDV-1)-Titer , SN-(BVDV-2)-Titer und BDV-Titer

Die Wildwiederkäuer, die Titer gegen BVDV-Typ1 hatten, zeigen ebenfalls eine Reaktion im SNT mit BVDV-Typ2 und BDV sowie umgekehrt. Der Vergleich der Titer ist in Abb. 19 bis Abb. 21 sowie in Tab. 11 dargestellt. In Tab. 11 sind die Faktoren zwischen den BVDV-Titern und den BDV-Titern in ganzen Zahlen dargestellt. Der kleinste Faktor errechnet sich aus dem Quotienten der Titer und verdeutlicht bei großen Unterschieden den Titersprung. Somit wird eine Zuordnung zu dem wahrscheinlichen *Pestivirus* ermöglicht. Man erkennt, dass in sieben Rotwildtieren die Antikörpertiter einer BVDV-1- bzw. BVDV-Infektion zugeordnet werden können, da die kleinsten Titersprünge zwischen BVDV-SNT- und BDV-SNT- Ergebnis im Bereich zwischen Faktor 2 und 30 liegen. Die Faktoren zwischen BVDV-1

und BVDV-2 liegen im Bereich von 5 bis 56. Der Titer zweier Rotwildtiere kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht weiter spezifiziert werden. Die niedrigen SN-Titer der drei Jungtiere lässt auf einen Rest einer kolostralen Immunität schließen.

Der Unterschied zwischen BVDV- und BDV-Titer eines Rehs liegt beim Faktor 64, was auf eine BDV-Infektion schließen lässt. Die Titer eines zweiten Rehes sind annähernd gleich, so dass die *Pestivirus*infektion nicht weiter festgelegt werden kann.

Drei Antikörpertiter der vier Gemsen lassen sich einer BDV-Infektion zuordnen, da der Faktor zwischen 10 und 64 liegt und damit für einen BDV-Titer spricht. Der Titer der vierten Gemse kann einer BVDV-1-Infektion zugeordnet werden, da der Unterschied zwischen BVDV-1 und BVDV-2 beim Faktor zwei liegt, der Unterschied zum BDV-Titer beim Faktor 12.

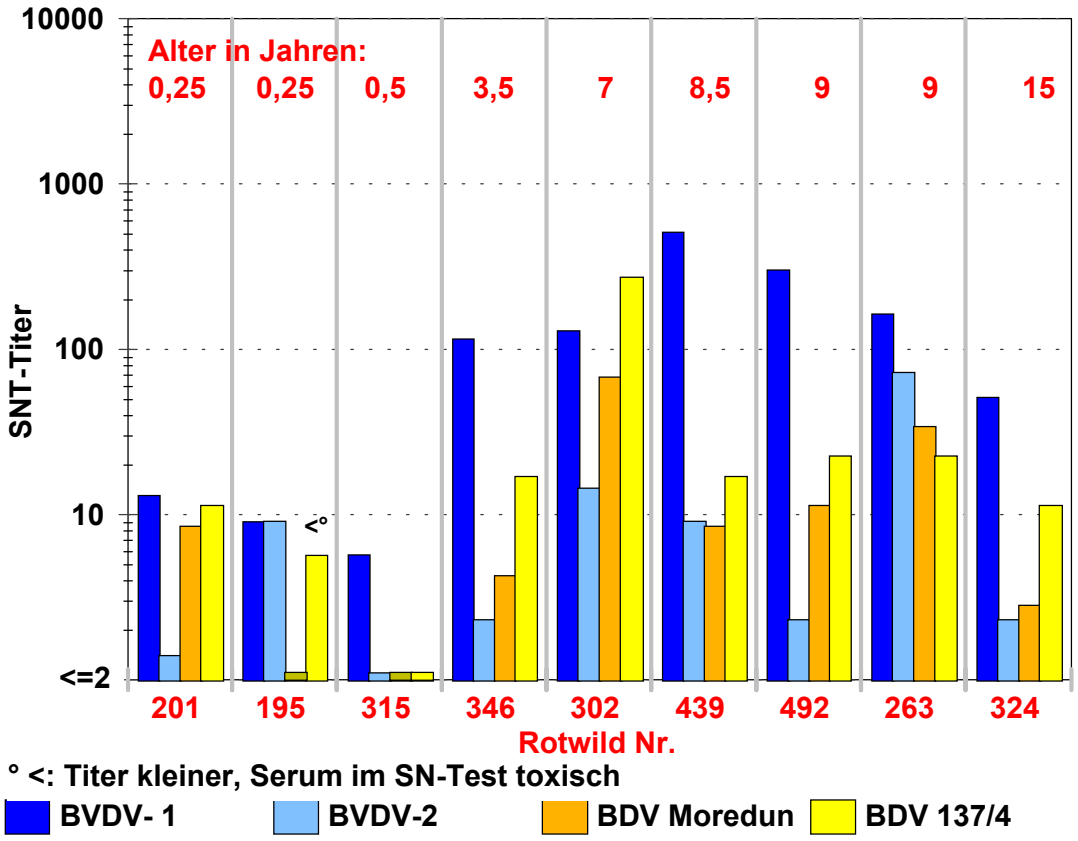


Abb. 19: Vergleich zwischen BVDV-SNT-Titer und BDV-SNT-Titer für Rotwild

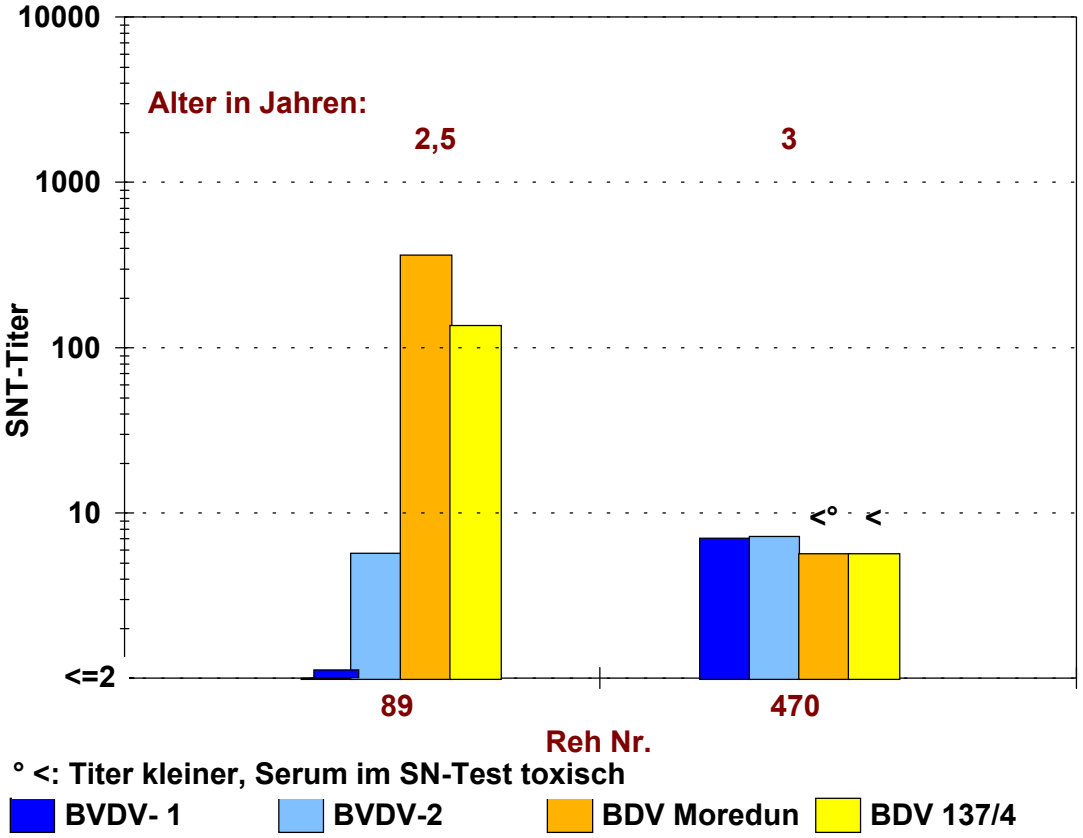


Abb. 20: Vergleich zwischen BVDV- SNT- Titer und BDV- SNT- Titer für Rehe

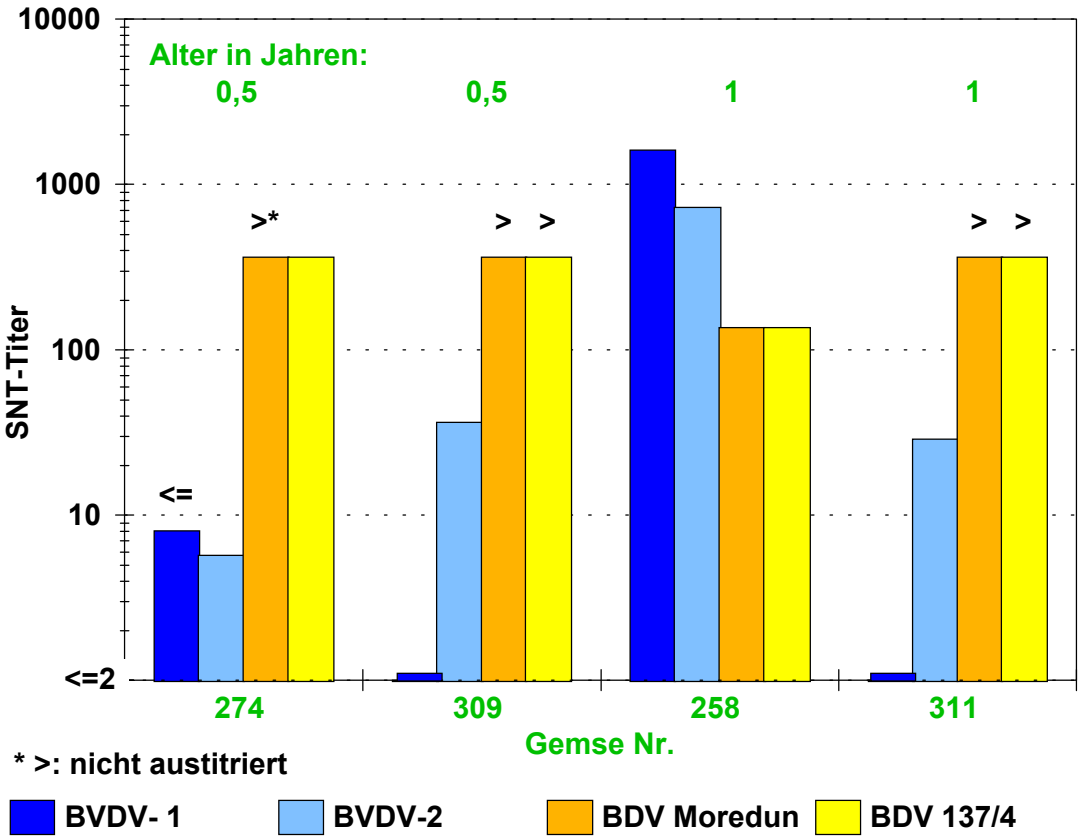


Abb. 21: Vergleich zwischen BVDV- SNT- Titer und BDV- SNT- Titer für Gemsen

Tab. 11:

BVDV-Titer, BDV-Titer, Titersprünge und Abschätzung des wahrscheinlichen *Pestivirus*

(kol. Rest = kolostraler Rest, indifferent = kann keinem Pestivirus zugeordnet werden)

Proben Nr.	SNT BVDV- 1	SNT BVDV-2	SNT 100 BDV Moredun	SNT 100 BDV 137/4	Tierart	Alter	wahrscheinliches *Pestivirus*		kleinster Faktor zw. BVDV-1; -2; BDV	Faktor zu BVDV-2 / BDV
201	**13,0**	1,4	8,5	11,3	Rotwild	0,25	indifferent	kol. Rest	1	
195	**9,1**	**9,1**	1,0	< 5,7	Rotwild	0,25	BVDV ; nieder	kol. Rest	2	
315	**5,7**	1,1	1,0	1,0	Rotwild	0,5	BVDV-1; nieder	kol. Rest	5	
346	**115,0**	2,3	4,2	17,0	Rotwild	3,5	BVDV-1		7	zu BVDV-2 50
302	**129,0**	14,4	67,9	**271,5**	Rotwild	7	indifferent		2	
439	**508,0**	9,1	8,5	17,0	Rotwild	8,5	BVDV-1		30	zu BVDV-2 56
492	**302,0**	2,3	11,3	22,6	Rotwild	9	BVDV-1		13	zu BVDV-2 131
263	**163,0**	72,0	33,9	22,6	Rotwild	9	BVDV (1)		2	zu BDV 5
324	**51,0**	2,3	2,8	11,3	Rotwild	15	BVDV-1		5	zu BVDV-2 22
89	1,0	5,7	**362,0**	135,8	Reh	2,5	BDV (Moredun)		64	
470	7,0	7,2	< 5,7	< 5,7	Reh	3	indifferent		1	
274	<= 8	5,7	**> 362,0**	362,0	Gams	0,5	BDV		64	>>
309	1,0	36,2	**> 362,0**	**> 362,0**	Gams	0,5	BDV		10	>>
258	**1613,0**	724,0	135,8	135,8	Gams	1	BVDV-1		2	zu BDV 12
311	1,0	28,7	**> 362,0**	**> 362,0**	Gams	1	BDV		13	>>

3.2.1.4 Altersverteilung der gefundenen SN-positiven Tiere

Das Alter der Alttiere wurde von den Jägern anhand des Zahnalters abgeschätzt und in den Probenbegleitschreiben mit angegeben, während das Alter der Jungtiere von den Jägern aufgrund der saisonalen Geburten der einzelnen Tierarten und dem Monat der Erlegung des Tieres auf ein viertel Jahr genau angegeben werden konnte. In Tab. 4 sind die gefundenen SN-positiven Tiere und das Alter des Wildwiederkäuers angegeben. Aus Tabelle 12, Abb. 22 und Abb. 23 ist der Zusammenhang zwischen dem Alter und dem SN-Titer gegen den jeweiligen BVDV-Stamm ersichtlich. Man erkennt bei den acht seropositiven von 118 Rothirschen, dass sich zwei Gruppen abzeichnen. Die erste Gruppe umfasst drei Jungtiere bis zu einem halben Jahr mit niedrigen Titern gegen BVDV, während in der zweiten Gruppe fünf Tiere mit hohen Titern vertreten sind, die alle älter als drei Jahre waren. Tab. 12 zeigt die Verteilung der Rotwild Seroreagenten bezüglich BVDV bezogen auf die drei Altersgruppen (Tiere bis zu einem halben Jahr, Tiere von einem bis 2,5 Jahren und Rotwildtiere ab drei Jahre).

Tab. 12:
Altersverteilung der Rotwildtiere und der Reagenten

Altersgruppe in Jahren	Gesamtzahl der Tiere	Anzahl Tiere mit BVDV-Titer
0 – 0,5	39	3
1 - 2,5	41	0
3 - 17	38	5

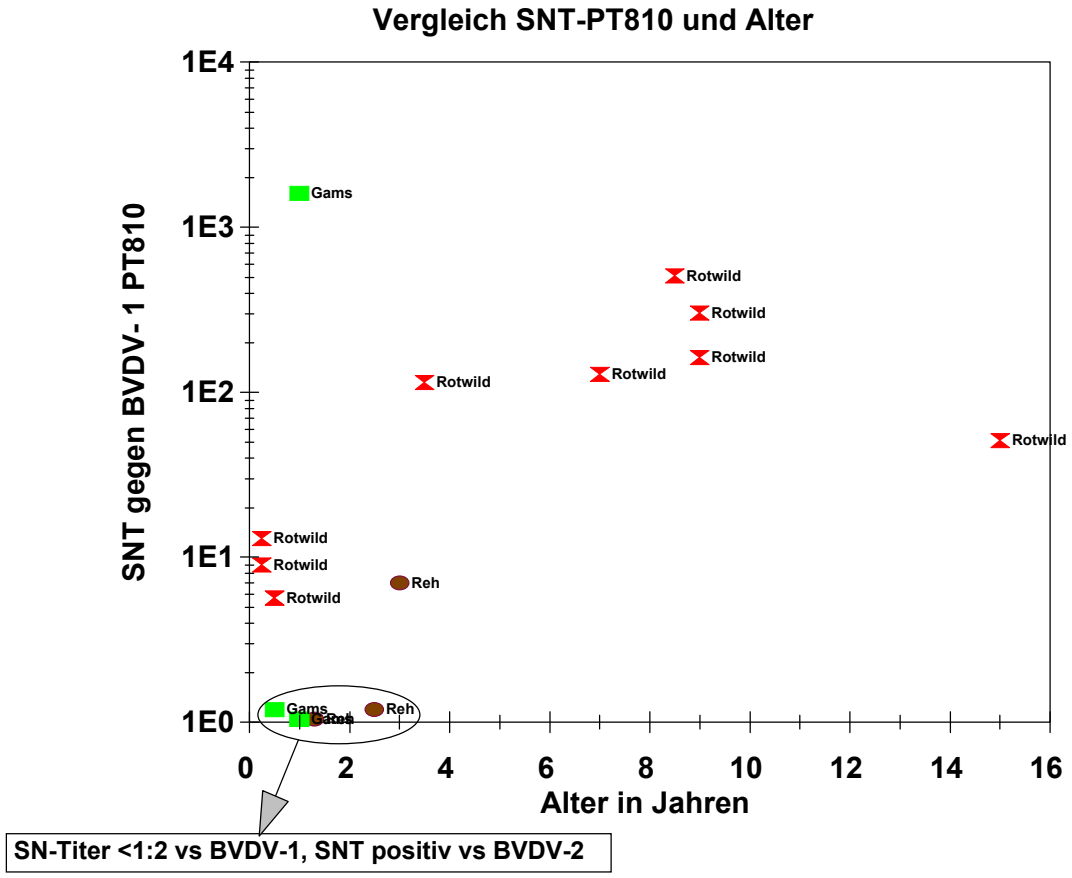


Abb. 22: Zusammenhang zwischen Alter der Tiere und SN-Titer (Stamm: BVDV-1, PT 810)

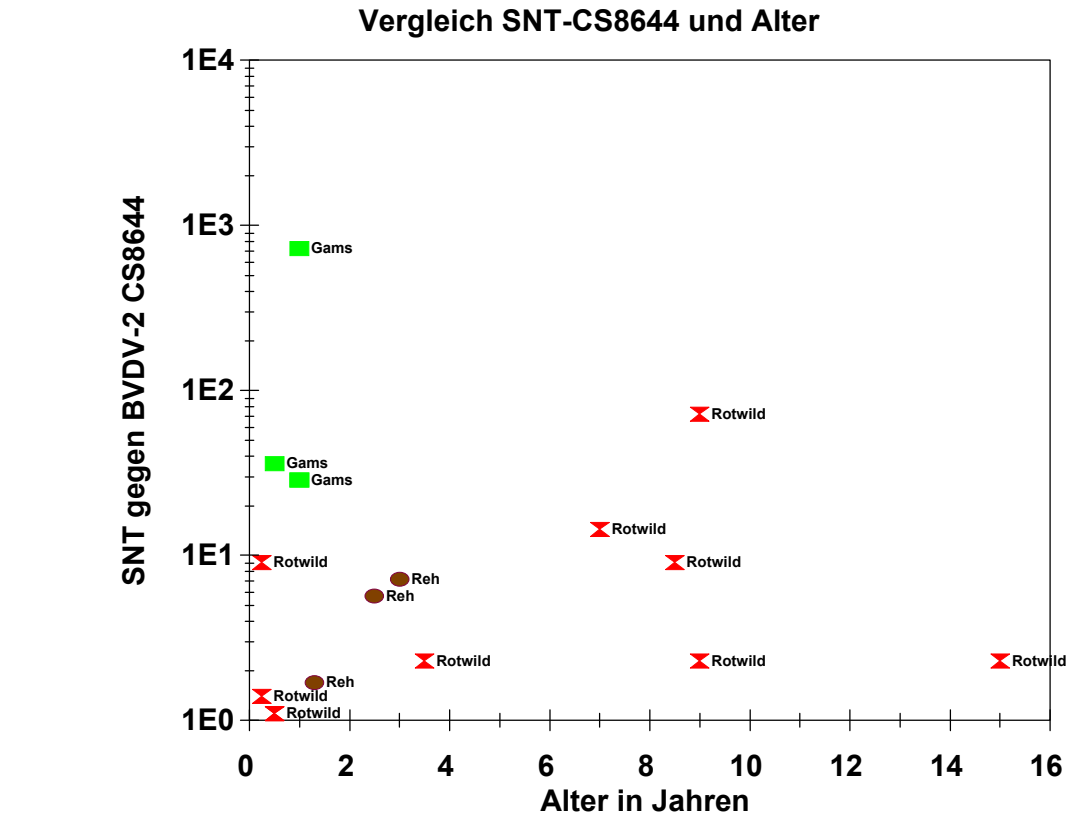


Abb. 23: Zusammenhang zwischen Alter der Tiere und SN-Titer (Stamm: BVDV-2, CS 8644)

Für die 130 Rehe ergibt sich keine auffällige Häufung. Dagegen fällt bei den 33 Gemsen auf, dass nur Jungtiere mit Antikörpertiten gefunden wurden. Die Altersverteilung der einzelnen Spezies sowie die Anzahl der SN-positiven Tiere in den einzelnen Altersklassen (Klasseneinteilung in halb-Jahres-Schritten) ist für das Rotwild in Abb. 24, für die Rehe in Abb. 25 und für die Gemsen in Abb. 26 dargestellt. Es wurden SN-positive gegen BVDV-Typ1, BVDV-Typ2 und BDV zusammengefasst. ‚SNT positiv indifferent` bedeutet, dass die Antikörpertiter bezüglich BVDV und BDV keine genaue Zuordnung zu einem der beiden *Pestiviren* möglich machen.

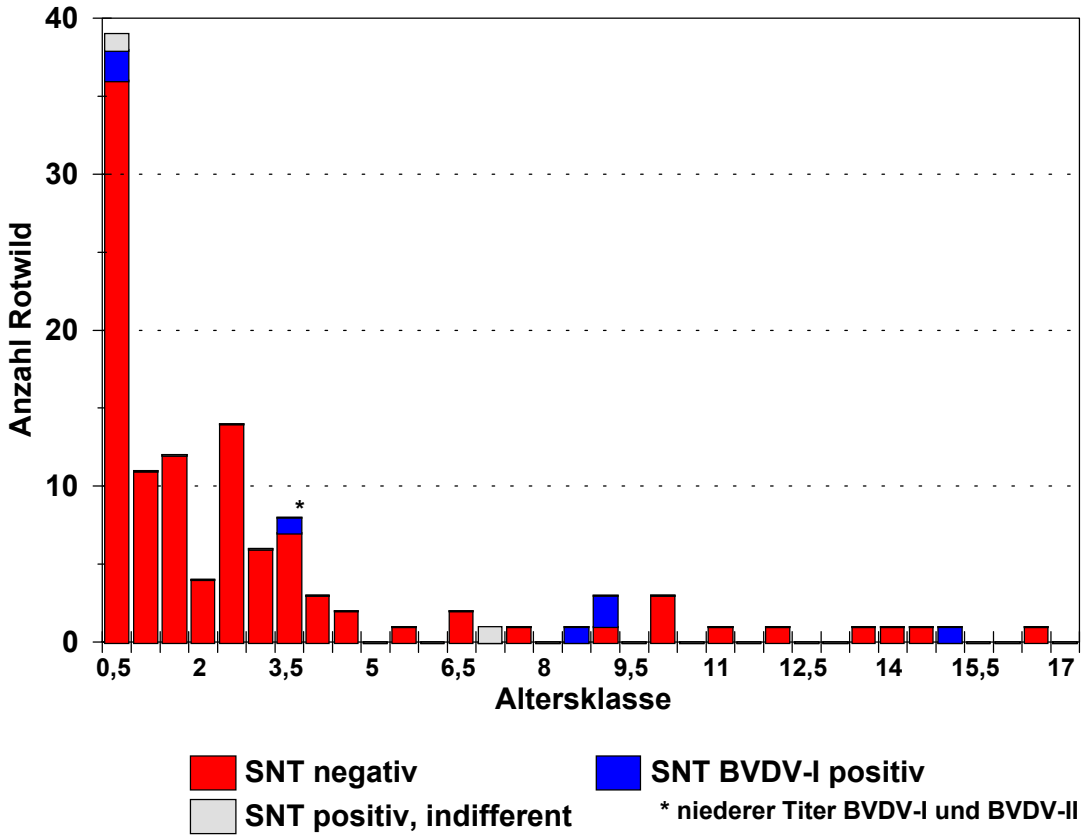


Abb. 24: Altersverteilung der SN-negativen und SN-positiven Rotwildtiere

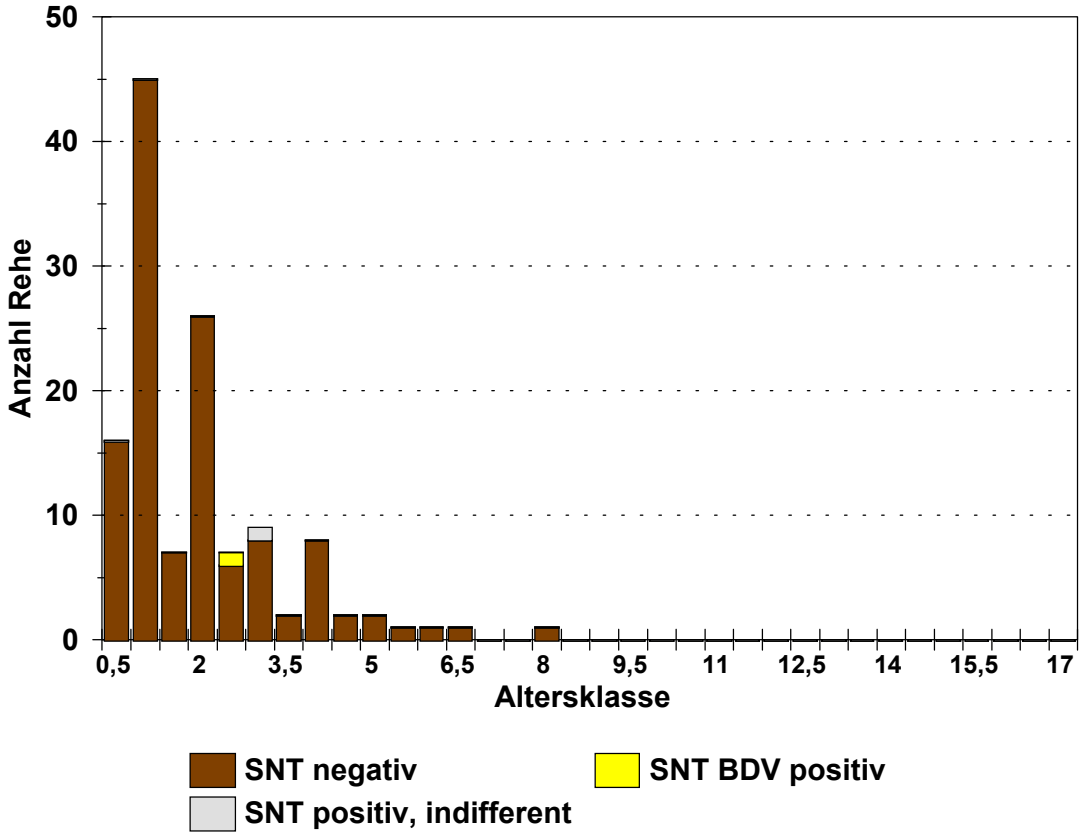


Abb. 25: Altersverteilung der SN-negativen und SN-positiven Rehe

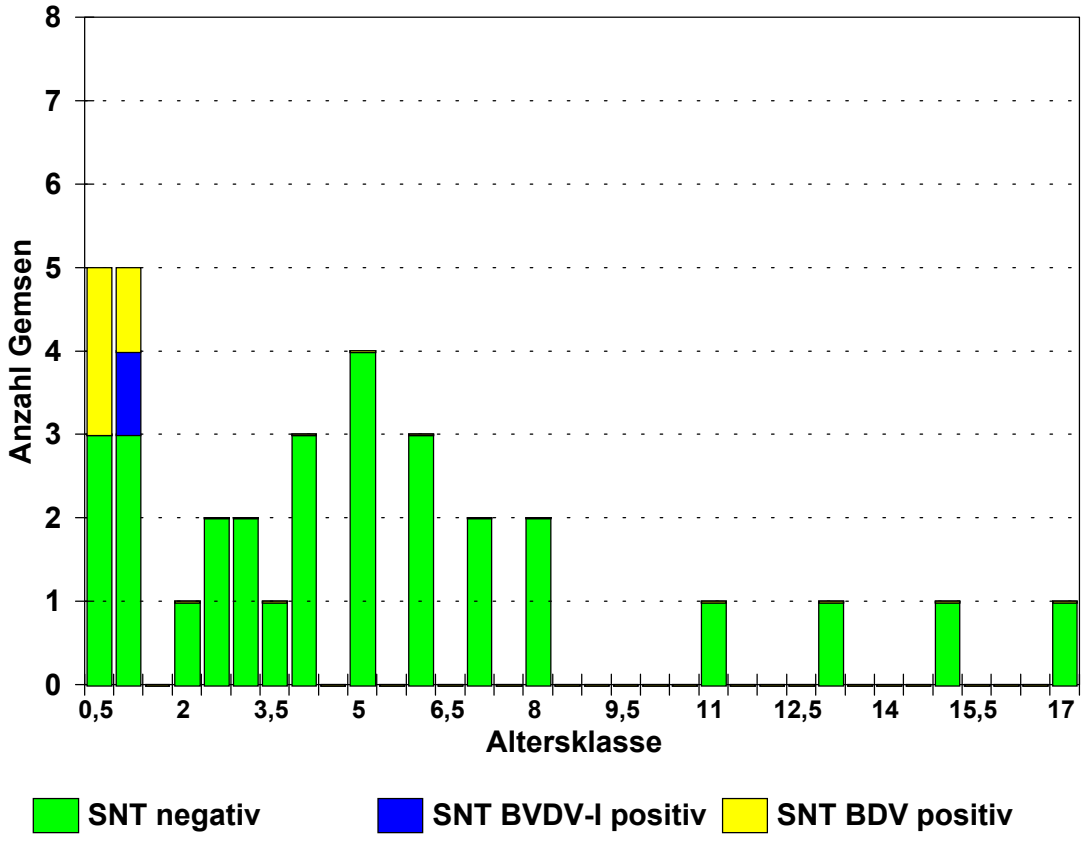


Abb. 26: Altersverteilung der SN-negativen und SN-positiven Gemsen

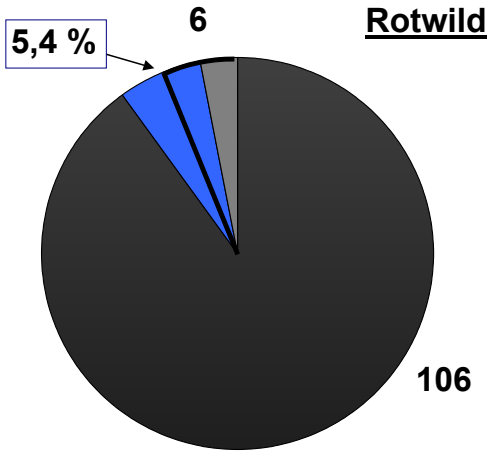
3.2.1.5 Prävalenz von BVDV- und BDV- Infektionen

In den Probenbegleitschreiben zu den eingesandten Wildwiederkäuerseren wurden die jeweiligen Jagdreviere mit angegeben, so dass die negativen und die positiven Tiere regional zugeteilt werden können. Die regionale Verteilung ist kartographisch in Abb. 27 dargestellt. Für die einzelnen Jagdreviere sind die Zahl der SN-negativen und die Zahl der SN-positiven Tiere für die einzelnen Tierarten getrennt angegeben.
Da die Prüfung der Testverfahren (Kapitel 3.2.1.1) keine zuverlässige Beurteilung der Proben schlechterer Qualität durch die ELISA-Teste ergab, stützt sich die Abschätzung der Prävalenz von BVDV-spezifischen Antikörpern in der Wildwiederkäuerpopulation aus dem Untersuchungsgebiet nur auf die in den SNT getesteten Proben der Qualitätskategorie ‚in Ordnung' und ‚schwach hämolytisch'.
Die damit für die Abschätzung zugrundegelegten 268 Wildwiederkäuerproben verteilten sich auf die einzelnen Spezies wie folgt:

Proben vom Rotwild:	112
Proben von Rehen:	126
Proben von Gemsen:	30

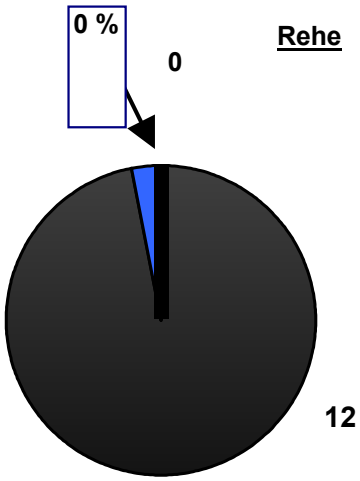
Bei den 112 Stück Rotwild wurden damit sechs SN-positive Tiere gefunden. Der relative Anteil von BVDV-Seroreagenten liegt bei 5,4 % mit einem Vertrauensbereich (α = 10%) zwischen 3,0% und 10,3% (Binomialverteilung). Keines von insgesamt 126 Rehen war serologisch positiv gegenüber BVDV, so dass nach der Binomialverteilung der Anteil unter 2,4% liegt (α = 5%) . Aufgrund der geringeren Zahl von untersuchten Gemsen, die mit einem BVDV- SN-positiven Tier aus 30 Gemsen einen realativen Anteil von 3,4 % Seroreagenten haben, liegt hier der Vertrauensbereich zwischen 1,2 % und 15 % (α = 10%). Diese Zahlen sind graphisch in der Abb. 28, der Abb. 29 und der Abb. 30 dargestellt.
Der Antikörpertiter eines Rehs war einer BDV-Infektion zuzuordnen; dies entspricht einer Seroprävalenz von 0,8 %. Im Serum zweier Gemsen (6,7 %) wurden ebenfalls deutliche BDV- Titer gefunden.

Abb. 27: Regionale Verteilung der BVDV-SN-negativen und –positiven Tiere nach Tierart getrennt. (BDV): Tiere mit BDV-Infektion



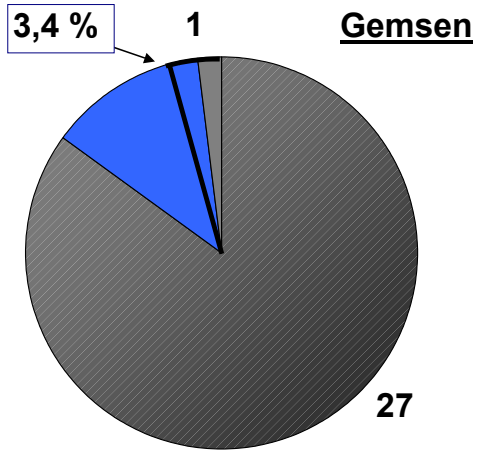
SN-negative	BVDV-SN-positive	relativer Anteil	Vertauens-$\alpha_{links\ 0,05}$	-bereich $\alpha_{rechts\ 0,05}$
106	**6**	**5,4 %**	**10,3 %**	**3,0 %**

Abb. 28: Prävalenz SN-positiver Rotwildtiere mit Vertrauensbereich



SN-negative	BVDV-SN-positive	rel. Anteil	Vertauens-$\alpha_{links\ 0,05}$	-bereich $\alpha_{rechts\ 0,05}$
125	**0**	**0 %**	**2,4 %**	**0 %**
	BDV-SN-positive			
	1			

Abb. 29: Prävalenz BVDV- SN-positiver Rehe mit Vertrauensbereich



SN-negative	BVDV-SN-positive	rel. Anteil	Vertauens-$\alpha_{links\ 0,05}$	-bereich $\alpha_{rechts\ 0,05}$
27	**1**	**3,4 %**	**15 %**	**1,2 %**
	BDV-SN-positive			
	2			

3.2.1.6 Gesundheitszustand der seropositiven Tiere

Als Abschussgrund der 15 SN-positiven Tiere wurde im Probenbegleitschreiben die Planerfüllung angegeben. Außer einem 15-jährigen Rotwild (siehe Tab. 4) zeigten alle restlichen Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine Krankheitsanzeichen oder Veränderungen an inneren Organen. Dieses eine oben genannte Tier war 15 Jahre alt, machte einen kranken Eindruck und war nach Angabe des Jägers altersbedingt abgemagert.

Abb. 30: Prävalenz BVDV-SN-positiver Gemsen mit Vertrauensbereich

Von den insgesamt 624 eingesandten Proben, wurde bei 604 Wildwiederkäuerseren das Probenbegleitschreiben vollständig ausgefüllt, so dass hier ein Überblick über die Angaben zum Gesundheitszustand der erlegten Tiere gegeben werden kann. 30 Tiere waren offensichtlich krank und zeigten Krankheitssymptome wie Abmagerung, Durchfall und Verletzungen. Bei Eröffnung der Tierkörper wurden ebenfalls Veränderungen an den inneren Organen festgestellt: Leber fleckig, Leber verhärtet, Verfärbungen am Darm, Lunge fleckig und Lunge mit Knoten.

574 Tiere waren allein von der äußeren Besichtigung zu urteilen nicht krank. Dennoch wiesen 30 dieser nicht kranken Tiere Veränderungen an inneren Organen auf. Diese Palette umfasst Parasiten (Lungenwürmer, Magen-Darmwürmer, Rachenbremsen, Leberegel), Lungenverhärtungen, Veränderungen der Leber (weißliche Punkte, 4 cm große klare Blase, Verfärbungen), Verwachsungen der inneren Organe, Knoten am Pansen und einmal eine mumifizierte Frucht.

Betrachtet man die Verteilung des Geschlechtes ergibt sich, dass von 583 Tieren 298 Wildwiederkäuer (51 %) weiblich, 285 Tiere (49 %) männlich waren. Bei den restlichen Proben wurden keine Angaben zum Geschlecht gemacht. Insgesamt war somit die Geschlechterverteilung annähernd gleich.

Unterteilt man die Altersverteilung in zwei Gruppen, Jungtiere und Adulte, sind von 574 Tieren mit Altersangabe 294 Tiere (51 %) unter 2 Jahre und 280 Tiere (49 %) über zwei Jahre. Darstellung siehe Abb. 31. Das älteste Tier war eine 17 Jahre alte Gämse. Die Verteilung der Proben auf Jungtiere und Alttiere ist ebenfalls gleich.

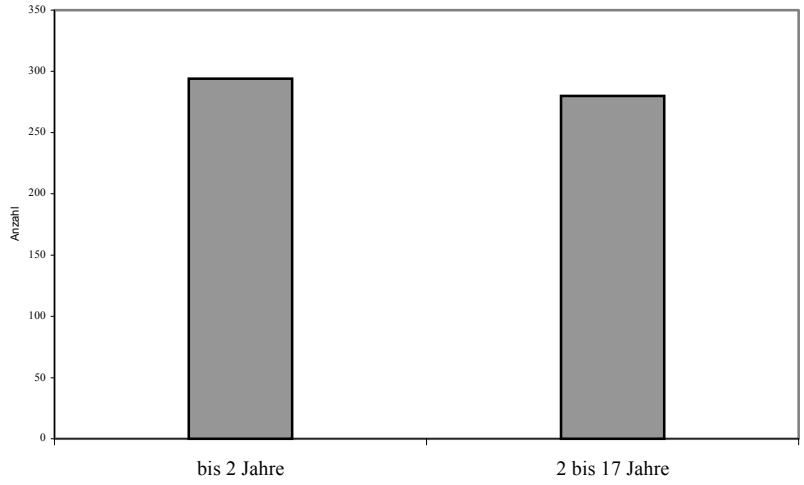


Abb. 31: Altersverteilung aller Wildwiederkäuer: Jungtiere bis zwei Jahre, Alttiere über zwei Jahre

Die Zahl der eingesandten Proben pro Monat war über die Jahre verteilt nicht homogen. So stiegen immer gegen Ende der Jagdsaison die Abschusszahlen und damit auch die Anzahl der eingesandten Proben. Rechnet man die Proben für Gämsen, Rehe, Rotwild und dem entsprechenden Monat über den Untersuchungszeitraum zusammen, so erhält man die Gesamtprobenzahl für den entsprechenden Monat (siehe Abb. 32). Die Jagdsaison umfasst nur zehn Monate des Jahres und beginnt immer im April und endet im Januar. Man erkennt einen zweigipfligen Verlauf mit einem kleinen Peak in den Monaten Mai und Juni. Der zweite höhere Gipfel ist im Zeitraum September bis Dezember zu erkennen.

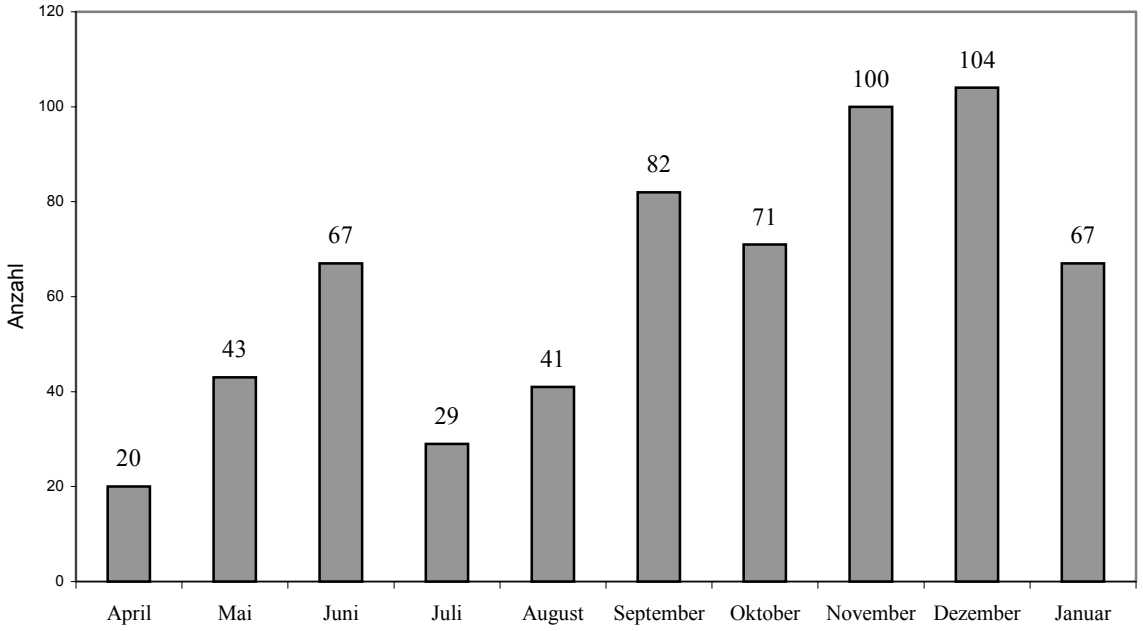


Abb. 32: Zahl der gewonnenen Wildwiederkäuerproben pro Monat über die Jagdsaison

3.2.2 BVDV-Seroreagenten in ausgewählten Weiderindern

Im Frühjahr 2001 wurden gemäß dem Auswahlverfahren (Abb. 11) die Weiderinder aus 185 Herden in die engere Wahl genommen. Die serologische Untersuchung dieser insgesamt 2040 Weiderinder diente zur Auswahl von seronegativen Weidetiergruppen, die dann im Verlauf der folgenden zwei Jahre weiteruntersucht wurden. Es wurden Weidetiergruppen aus 31 Herden als geeignet gefunden. Diese 31 seronegativen Weiderindergruppen – maximal zehn Prozent der Gruppe durfte serologisch positiv gegenüber BVDV sein – umfassten insgesamt 483 Tiere, von denen 27 Tiere spezifische Antikörper gegen BVDV aufwiesen, 456 Jungrinder waren zum Zeitpunkt der Selektion der Gruppen serologisch negativ. In 17 Gruppen fanden sich einzelne Seroreagenten. Damit umfasste die durchschnittliche Weiderindergruppe 15,6 Rinder mit 0,9 seropositiven Tieren. Die restlichen 1557 Tiere aus insgesamt 154 Herden hatten einen Anteil von 805 seropositiven Rindern (51,7 %). Ein großer Teil dieser 154 Herden wurde ebenfalls über zwei Jahre weiterbeobachtet.

3.2.2.1 Verlaufsuntersuchungen von seronegativen Weiderindergruppen aus dem Jahr 2001/2002

Um eine Bewertung des Infektionsgeschehens während der sommerlichen Weidephase machen zu können, wurden die seronegativen Weiderinder aus den obengenannten 31 Herden im Frühjahr zwei bis 14 Tage vor dem Weideauftrieb untersucht. 18 dieser Gruppen mit 252 Tieren wurden kurz vor dem Auftrieb erneut untersucht, da die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Weideauftrieb größer als zwei Wochen war. In diesen 18 Gruppen hatten sich bis dato keine BVDV-Serokonversionen ereignet.

Im Herbst 2001 wurden die seronegativen Weidetiergruppen erneut untersucht. Die Probennahme erfolgte in einer Zeitspanne zwischen ein und sieben Tagen nach dem Weideabtrieb. In vier der 31 Herden wurden die Aufstallungstermine vier bis sechs Wochen später erst gemeldet. Da in diesen vier Fällen die serologische Untersuchung im positiven Falle nicht mehr als Beweis für eine Weideinfektion verwendet werden kann, wurden diese vier Weiderrindergruppen nicht nachuntersucht. Die verbleibenden 27 Jungrindergruppen mit 432 Tieren aus 20 unterschiedlichen Alpungsweiden wurden beprobt.

Tab. 13 gibt die Anzahl der Weiderinder , sowie die Anzahl der Beschicker pro untersuchte Gemeinschaftsweide wieder. Die Anzahl der seronegativen Tiere wird im Verlauf der Jahre 2001 und 2002 dargestellt.

Tab. 13:
Anzahl der aufgetriebenen, untersuchten und initial seronegativen Tiere auf den untersuchten Weiden in den Jahren 2001 und 2002.

* : Tier mit niedriger OD im ELISA

			2001			***2002***		
Weide Nr.	Gesamt-zahl der Weide-rinder (circa)	Anzahl der Beschicker	Auftriebs-unters. sero-negative Prüftiere	Abtriebsunters. Anzahl Tiere serologisch		Auftriebs-unters. sero-negative Prüftiere	Abtriebsunters. Anzahl Tiere serologisch	
				negativ	positiv		negativ	positiv
1	35	2	32	32	0	20	20	0
2	45	12	10	10	0	8	8	0
3	115	12	58	58	0	57	57	0
4	130	30	13	13	0			
5	70	15	13	12	1*			
6	150	25	23	23	0	17	17	0
7	85	40	26	26	0	22	21	1*
8	25	10	6	6	0			
9	90	13	16	16	0	10	9	1*
10	180	20	31	30	1*	27	27	0
11	500	90	42	42	0			
12	50	4	10	10	0			
13	22	3	9	9	0	5	5	0
14	70	7	14	14	0			
15	450	50	32	32	0	29	29	0
16	85	27	15	6	9			
17	100	25	18	18	0	8	8	0
18	27	1	24	23	1*	17	17	0
19	25	1	19	15	4	13	13	0
20	70	6	11	0	11			

In 24 der 27 Weiderindergruppen war keine Zunahme der Anzahl seropositiver Tiere feststellbar, so das für diese 367 serologisch negativen Rinder gesagt werden kann, dass in diesen Jungrindergruppen über die Weidephase keine BVDV-Infektionen stattgefunden

haben. Die 24 Gruppen hatten durchschnittlich 16,3 Rinder mit initial 0,9 seropositiven Tieren.

Eine Gruppe, die 21 Weiderinder umfasste mit zwei seropositiven Tieren in der Frühjahrsuntersuchung, erhielt einen Zuwachs um vier Seroreagenten auf sechs seropositive Tiere im Herbst. Damit stieg der relative Anteil seropositiver Jungrinder innerhalb dieser Weiderindergruppe von 9,5 % auf 29 % .

In einer weiteren Gruppe, die im Frühjahr zehn seronegative trächtige Kalbinnen umfasste, wurden neun der zehn Tiere im Rahmen der Herbstnachuntersuchung als serologisch positiv detektiert.

Eine dritte Gruppe mit elf Jungrindern zeigte eine komplette Serokonversion der ganzen Gruppe. Alle Proben der elf Weidetiere dieser Gruppe reagiertem im Herbst nach der Weidephase im Antikörper-ELISA mit sehr hohen Extinktionen.

Die Ergebnisse der beiden zuletzt genannten Weiderindergruppen sprechen eindeutig für eine massive Durchseuchung mit BVD-Virus während des Sommers auf der Weide. Eine Ursachenabschätzung der Serokonversionen der drei genannten Weidtiergruppen, die sich auf drei unterschiedlichen Gemeinschaftsweiden befanden, wird in Kapitel 3.2.3. beschrieben.

Im darauffolgenden Frühjahr 2002 wurden erneut die Herden mit seronegativen Weidrindergruppen untersucht, um in einer zweiten Sömmerungsphase eventuelle Serokonversionen zu erfassen. Da die Auftriebszahlen rückläufig waren, reduzierte sich der Probenumfang auf 250 Tiere aus 16 Herden. So war in einigen Herkunftsbetrieben mit seronegativen Tieren, die im Frühjahr 2001 untersucht wurden, nur mehr eine geringe Anzahl von Tieren für den Weideauftrieb vorgesehen. Ein anderer Teil der Betriebe eignete sich nicht mehr für die Untersuchung, aufgrund vorangegangener Serokonversionen (s. O.).

Im Rahmen der pflichtgemäßen Weiderinderuntersuchung auf BVDV im Frühjahr 2002, die in einigen Herden auftriebsnahe durchgeführt wurde oder gegebenenfalls in einer weiteren serologischen Untersuchung kurz vor dem Auftrieb, konnte die erneute Eignung der seronegativen Weiderindergruppe kontrolliert werden, um so eventuelle Serokonversionen oder BVDV-Impfungen während der winterlichen Stallperiode auszuschließen. Diese 16 Weidetiergruppen befanden sich über den Sommer auf 15 verschiedenen Weiden. Außer in zwei Herden mit jeweils sechs und elf Tieren in denen je ein Einzeltier serokonvertierte, waren über die Alpungsphase 2002 keine weiteren Infektionen mit BVD-Virus in diesen 16 Jungrindergruppen feststellbar. Ein Teil dieser Einzelragenten zeigten schwache Reaktionen im ELISA (in Tab. 13 mit * gekennzeichnet). Die Gruppen umfassten durchschnittlich 15,6 Rinder mit initial 0,6 seropositiven Tieren.

3.2.2.2 Verlaufsuntersuchung 2001 bis 2002

Bei der Selektion zur Findung der seronegativen Weiderindergruppen wurden die serologischen Ergebnisse von 1557 Tiere aus 154 Herden erfasst. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurde den jeweiligen Hoftierärzten zugesandt, da sie vergleichbar einem Jungtierfenster wertvolle Abschätzungen über die Verbreitung von BVDV in den jeweiligen Herden liefern. In der Untersuchung im Frühjahr 2001 hatten 805 der 1557 Rinder (51,7 %) im ELISA nachweisbare Antikörper gegen BVDV. Im Frühjahr 2002 wurde ein Teil dieser Herden im Rahmen der BVDV-Antigen Untersuchung zum Weideauftrieb erneut serologisch untersucht. Aus 154 Herkunftsbetriebe aus dem Vorjahr wurden die Jungrinder von 103 Herden mit insgesamt 769 Tieren untersucht. In acht dieser Herden wurde bei der geforderten BVDV-Antigen Untersuchung der Weidetiere mindestens ein persistent virämisches Tiere diagnostiziert, so dass diese acht Herden zunächst nicht in die weitere Beobachtung mit einfließen, um vergleichbare Auswahlkriterien wie im Jahr 2001 zu gewährleisten (siehe Abb. 11). Die Seroprävalenz der Weiderindergruppen dieser 8 Herden lag im Vorjahr bei 100%. Im Jahr 2002 wurden somit 95 Herden mit insgesamt 693 Tieren, von denen 170 serologisch positiv waren, ausgewertet. Dies entspricht einem relativen Anteil von 24,5 %. Um einen Vergleich der Jahre 2001 und 2002 zu ermöglichen, wurden nur die Ergebnisse der 95 Herden aus dem Jahre 2001 berücksichtigt. Es ergibt sich somit für die 95 Herden im Jahr 2001, dass 471 von 963 Tieren seropositiv bezüglich BVDV sind, was einem relativen Anteil von 48,9 % entspricht. Vergleicht man nun den Anteil der Seroreagenten von 48,9 % im Jahr 2001 mit dem Anteil von 24,5 % seropositiver Tiere im Jahr 2002, sieht man eine deutliche Abnahme, ja sogar eine Halbierung der Seroprävalenz in dieser speziell ausgewählten Gruppe von Tieren. Die Häufigkeit von BVDV- Infektionen in dieser Teilmenge von der Gesamtheit der Weiderinder ist rückläufig. Aufgrund der BVDV-Seroprävalenz bei den Weidetieren wurden die einzelnen Betriebe in drei Gruppen eingeteilt (siehe Tab. 14):

Gruppe 1: 0 % - 30 % seropositive Tiere

Gruppe 2: 30 % - 70% seropositive Tiere

Gruppe 3: 70 % - 100 % seropositive Tiere

Aus der prozentuale Verteilung der Herden auf die einzelnen Gruppen (siehe Abb. 33) in den Jahren 2001 und 2002 kann ein deutlicher Unterschied abgelesen werden. So nimmt der Anteil von Herden, die zur Gruppe 1 gehören von 35 % auf 73 % zu, der Anteil von Herden,

die der Gruppe 2 zuzuordnen sind von 41 % auf 15 % ab. Ein Abfall ist auch für Herden der Gruppe 3 zu erkennen: von 24 % auf 12 %.

Tab. 14:
Absolute und relative Zahlen der Gruppenverteilung bezüglich 95 Herden

	2001		**2002**	
	Anzahl der Herden	relativer Anteil	Anzahl der Herden	relativer Anteil
Gruppe 1	33	35%	69	73%
Gruppe 2	39	41%	14	15%
Gruppe 3	23	24%	12	12%

Zur Abschätzung der Inzidenz innerhalb dieser Teilmenge von Weiderindern, die aus 95 Herden stammen, werden die Fluktuationen innerhalb der drei definierten Gruppen ausgewertet. Das Ergebnis ist in Tab. 15 dargestellt. Man erkennt, dass ein Großteil der Herden (28 +11) aus den Gruppen mit hoher und mittlerer Seroprävalenz in die Gruppe 1 gelangen.

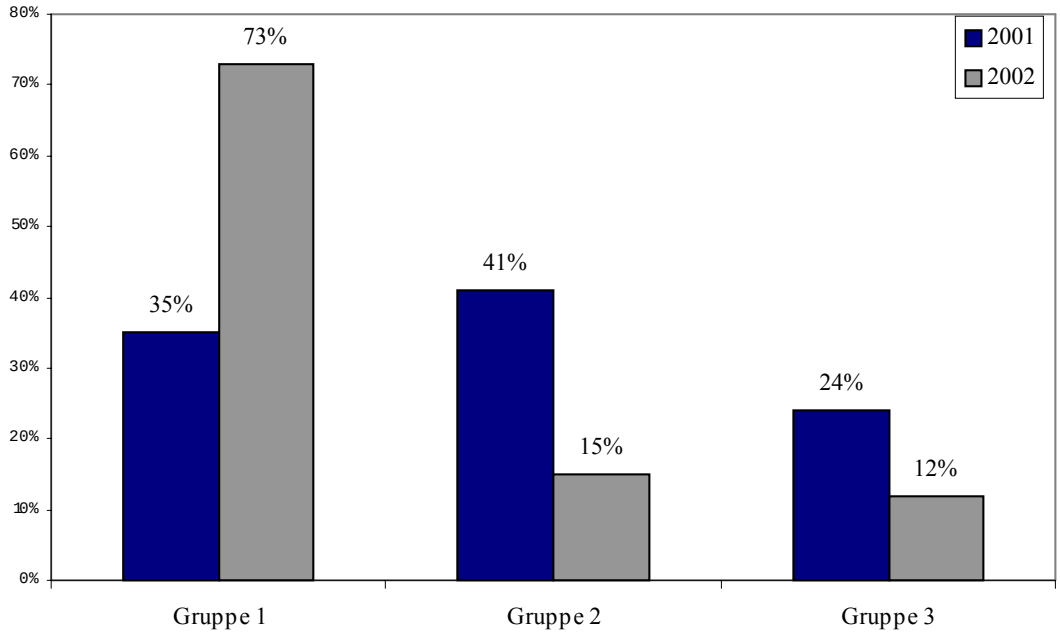


Abb. 33: Prozentuale Verteilung auf die einzelnen Gruppen im Vergleich der Jahre 2001 und 2002 (Auswertung von 95 Herden). Anteil der Seroreagenten in den Gruppen:
Gruppe 1: < 30 % / Gruppe 2: 30-70% / Gruppe 3: >= 70 %

Tab. 15:

Fluktuation innerhalb der Gruppen bezogen auf 95 Herden

Flussrichtung zwischen den Gruppen im Vergleich der Jahre 2001 und 2002	**Anzahl der Herden**
von Gruppe 1 zur Gruppe 2	**3**
von Gruppe 1 zur Gruppe 3	**0**
von Gruppe 2 zur Gruppe 1	**28**
von Gruppe 2 zur Gruppe 3	**3**
von Gruppe 3 zur Gruppe 1	**11**
von Gruppe 3 zur Gruppe 2	**3**

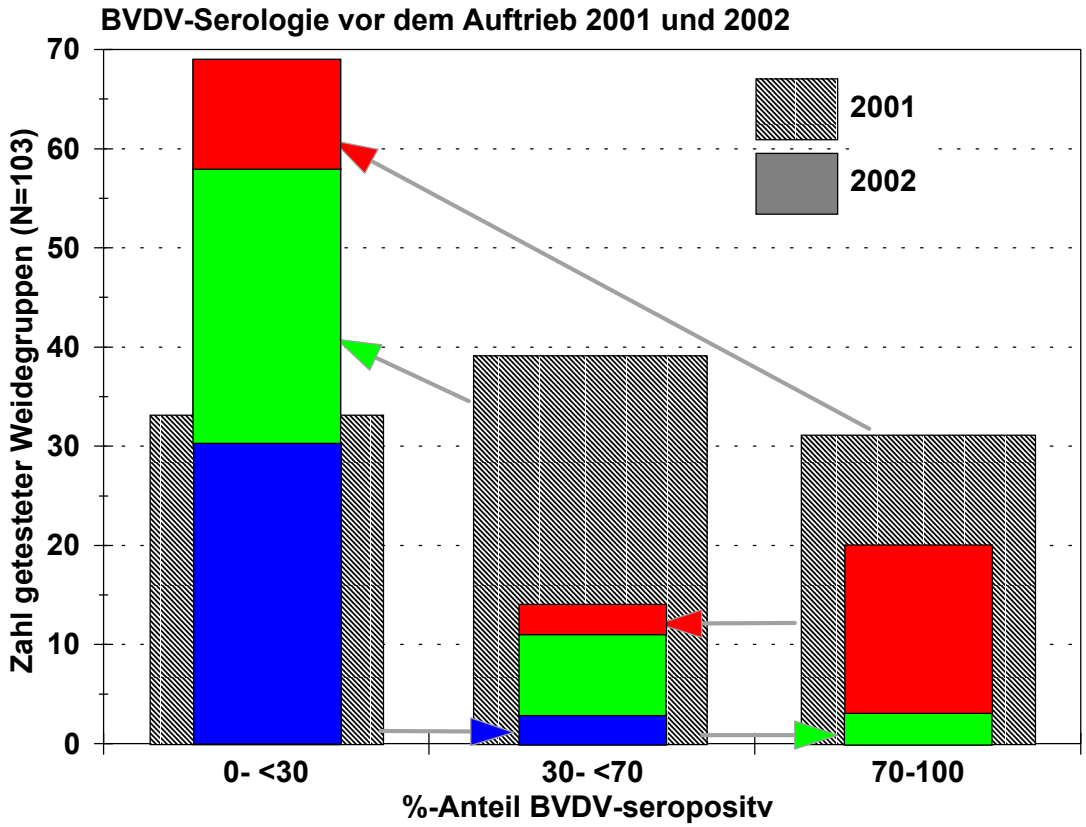


Abb. 34: Prozentuale Verteilung von 103 Herden (95 Herden + 8 Herden mit Pi) auf die einzelnen Gruppen mit Fluktuation innerhalb der Gruppen über die Jahre 2001 und 2002

In Abb. 34 werden die prozentualen Anteile der Verteilung auf die einzelnen Gruppen aller 103 Herden (95 Herden plus (Herden mit Pi) dargestellt. Dies zeigt wiederum, dass der Anteil der Herden, die der Gruppe 1 zuzuordnen sind, deutlich zunimmt.
Die gesamte Almauftriebsuntersuchung der Weiderinder auf BVD-Virusantigen, die dazu gedacht war, persistent virämische Tiere auf den Gemeinschaftsweiden aufzuschließen, wurde im LGL in Oberschleißheim durchgeführt. Speziell aus der Region Ostallgäu wurden im Jahr 2001 insgesamt 9143 Rinder auf BVDV-Antigen untersucht. Davon waren 77 Tiere positiv, was einem Prozentsatz von 0,85 % entspricht. Im Jahr 2002 wurden aus der selben Region 7244 Tiere auf BVDV-Virämie untersucht, von denen 43 Rinder positiv waren; dies sind 0,59% (Dr. Forster, LGL in OSH, persönliche Mitteilung). Aus diesen Zahlen kann die Prävalenz der PI-Tiere nicht exakt angegeben werden, da erforderliche Bestätigungsuntersuchungen für die Bestimmung der persistierenden Infektion nur zum Teil angefordert wurden.

3.2.3 Befunde und Ergebnisse zur Ursachenabklärung der BVDV- Infektionen bei Weiderindern

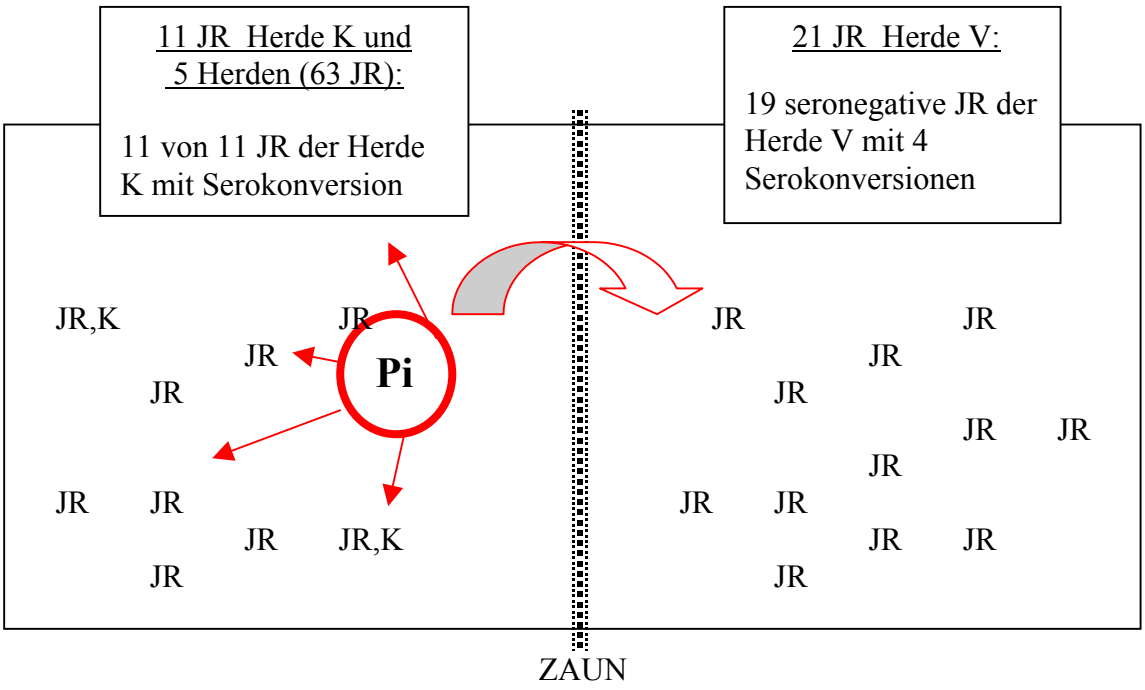
Während der Weidephase im Jahr 2001 sind in drei der untersuchten Weidetiergruppen teilweise oder vollständige Serokonversionen aufgetreten, im Folgenden mit Herde K, Herde V und Herde B bezeichnet.

Herde K:

Die Weiderindergruppe umfasste elf Jungtiere, die zwischen ein und zwei Jahre alt und nichtträchtig waren. Von diesen elf Tieren waren alle zum Zeitpunkt der Frühjahrsuntersuchung serologisch negativ, im Herbst zur Aufstallungsuntersuchung alle elf serologisch positiv. Die Weiderinder der Herde K befanden sich den ganzen Sommer über zusammen mit anderen Weiderindern von fünf weiteren landwirtschaftlichen Betrieben auf einer Gemeinschaftsweide. Die Serokonversion aller elf Weidetiere der Herde K legte den Verdacht nahe, dass sich ein persistent virämisches Tier in der Nähe der Rinder befand. Daraufhin wurden alle 63 Weiderinder der anderen fünf Herden auf BVD-Virusantigen

nachuntersucht. Der Antigennachweis erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenz aus Blutleukozyten aus gerinnungsgehemmten Blutproben. Eines der 63 wurde als Antigen positiv gefunden und drei Wochen später als persistent virämisch bestätigt. Als Ursache für das Vorhandensein des Virämikers (Ohrmarke: ...47019) auf der Gemeinschaftsweide wurde eine Verwechslung der Tiere angegeben. So wurde im Herkunftsbestand des Virusträgers die Frühjahrsuntersuchung durchgeführt und auch ein BVDV positives Tier diagnostiziert. Daraufhin wurde ein Jungrind (Ohrmarke: ...67079), dessen Ohrmarkennummer zufälligerweise auf dem Untersuchungsbefund in der gleichen Zeile mit der Ohrmarkennummer des Virämikers geschrieben stand, geschlachtet und alle anderen Tiere auf die Gemeinschaftsweide aufgetrieben. Aufgrund der undeutlichen Handschrift sahen die Endnummern der Ohrmarken sehr ähnlich aus.

Somit waren alle Weiderinder der sechs Beschläger (siehe Abb. 35) den ganzen Sommer über in engem Kontakt mit einem zwei Jahre alten persistent virämischen Jungrind. Eine hinreichende Erklärung für die Serokonversion aller Weiderinder der Herde K ist hiermit gegeben.


11 JR Herde K und
5 Herden (63 JR):
11 von 11 JR der Herde K mit Serokonversion
21 JR Herde V:
19 seronegative JR der Herde V mit 4 Serokonversionen
JR,K
JR
JR
JR

Herde V:

In der BVDV-Weiderinderuntersuchung und einer auftriebsnahen Nachuntersuchung der Herde V wurden beide male zwei Jungrinder von 21 Tieren als BVDV-serologisch positiv diagnostiziert. Bei der Herbstuntersuchung der 21 Rinder wurden bei sechs Tieren Antikörper gegen BVDV gefunden, d.h. vier Tiere waren über den Sommer neu infiziert worden. Damit stieg während der Weidephase die Seroprävalenz der Weiderindergruppe von 9,5 % auf 29 %. Die Weiderinder der Herde V waren auf keiner Gemeinschaftsweide untergebracht und hatten somit keinen direkten Kontakt zu Weiderindern aus anderen Herden. Eine Besichtigung der Sommerweide der Herde V ließ erkennen, dass sie direkt an die Weide der Herde K angrenzt. Die beiden Jungviehweiden waren nur durch einen einfachen Zaun voneinander getrennt. Da sich auf der Weide der Herde K – wie oben beschrieben – ein persistent virämisches Tier befand, konnten sich die Weiderinder der Herde V durch Infektionen über den Zaun mit BVD-Virus anstecken.

Herde B:

Zehn Jungrindern der Herde B wurde am 19.04.2001 Blut entnommen und im Rahmen der Weideuntersuchung auf BVDV untersucht. Alle zehn Tiere waren im Antigen-ELISA negativ. Eine anschließende serologische Untersuchung der Proben ergab, dass alle zehn Tiere keine Antikörper gegen BVDV hatten. Alle zehn Rinder waren zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung trächtig. Am 10.11.2001 waren neun der zehn Jungrinder bei der Herbstkontrolluntersuchung serologisch positiv, was auf eine Infektion im Zeitraum April bis November hinweist. Da wie im Fall der Herde K eine Infektion auf der Weide durch ein persistent virämisches Tier vermutet wurde, wurden allen Weidetieren der Gemeinschaftsweide, auf der sich auch die Rinder der Herde B über den Sommer befanden, wiederholt auf BVD-Virusantigen untersucht. Von den ursprünglich 77 weitern Weiderindern aus 28 Herkunftsbetrieben konnten zunächst nur 68 Tiere beprobt werden, da fünf Rinder mittlerweile geschlachtet waren und vier Tiere über einen Händler verkauft wurden. Der Antigennachweis aller 68 Rinder erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenz aus den Blutleukozyten; alle Tiere waren negativ. Eine serologische Untersuchung der 68 Proben ergab, dass 31 der 68 Tiere (46 %) serologisch positiv waren. Dies entsprach der durchschnittlichen Seroprävalenz im Jahr 2001, die im Rahmen dieser Untersuchung bei 1557 Rindern festgestellt wurde. Zudem waren von diesen 68 Rindern sieben Tiere im Rahmen der serologischen Frühjahrsuntersuchung im Frühjahr sowie im Herbst serologisch negativ. Diese

Ergebnisse sprechen gegen eine Infektion mit BVDV auf der Weide durch einen Virusträger. Daraufhin wurde in der Herde B weiter nach Ursachen gesucht. Aufgrund der Serokonversion der zehn Kalbinnen während der Trächtigkeit wurden alle zehn gesund geborene Kälber auf BVDV untersucht. Eines der zehn Kälber der zehn geälpten trächtigen Rinder war persistent virämisch. Dieses persistent virämische Kalb wurde am 20.10.2001 im Bestand geboren. Es wurden nicht alle zehn Weidetiere gleichzeitig aufgestallt, so dass in der Zeitspanne August bis Mitte Oktober neun der zehn Tiere in den Bestand zurückgeholt wurden, um sie abkalben zu lassen. Am 8.11. wurde das letzte Weidetier der Herde B aufgestallt und zwei Tage später die komplette Weidegruppe auf Antikörper untersucht. Bis auf das zuletzt aufgestallte Weiderind waren alle Tiere der Weidegruppe serologisch positiv. Da das persistent virämische Kalb bereits drei Wochen vor dem Blutentnahmetermin geboren wurde, konnte es in dieser Zeit die Jungrinder mit BVDV infizieren. Nur das zuletzt aufgestallte Weiderind hatte noch nicht genügend Zeit, um nachweisbare BVDV spezifische Antikörper zu bilden. Eine chronologische Zuordnung der Geschehnisse im Jahr 2001 ist in Abb. 36 dargestellt. Erst etwa zwei bis drei Wochen nach der Infektion können nach experimentellen Infektionen mit BVD-Virus Antikörper mit dem verwendeten ELISA BarVac nachgewiesen werden (Hofmann, 1998). Nimmt man als sensible Phase der Trächtigkeit den 0. bis 120. Tag an, in der nach BVDV-Infektion ein persistent virämisches Kalb induziert werden kann (Liess *et al.*, 1984), kann der Infektionszeitraum relativ eng umrissen werden. Das Pi- Muttertier befand sich am 19.04.2001 - dem Tag der Blutentnahme - am 95. Tag der Gravidität. Da das Muttertier am 19.04. noch keine messbaren Antikörper hatte, hätte die Infektion maximal zwei Wochen zurückliegen können. Um ein persistent virämisches Kalb zur Welt zu bringen hätte die BVDV-Infektion spätestens drei Wochen nach dem Blutentnahmetermin stattfinden müssen.

Der Infektionszeitpunkt lag somit zwischen Anfang April und Mitte Mai. Innerhalb dieser fünf Wochen befanden sich die Weiderinder im Stall und auf der Heimweide des Betriebes, auf der sie keinen Kontakt zu Rindern von anderen Herden hatten.

In der Herde B – in der seit vielen Jahren kein Tier mehr zugekauft wurde - sind laut Betriebsleiterin während des ganzen Jahres 2001 keine besonderen Vorkommnisse wie zum Beispiel Aborte, Totgeburten oder erhöhte Krankheitsanfälligkeit von Kälbern beobachtet worden.

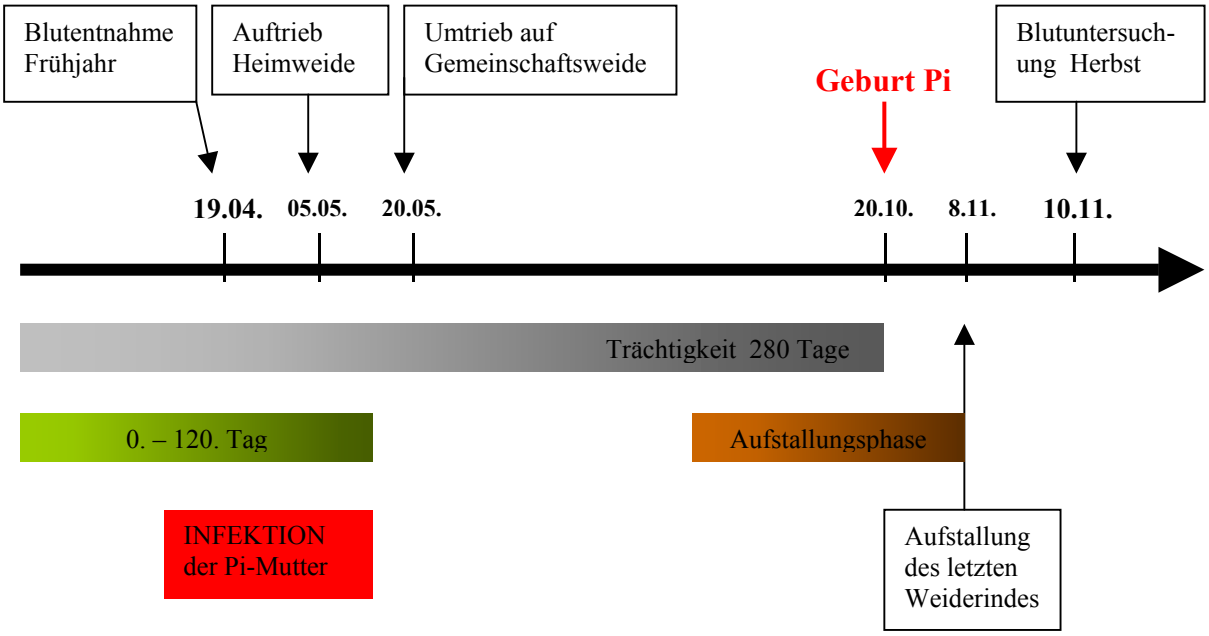


Abb. 36: Zeitlicher Ablauf der Ereignisse in Herde B im Jahr 2001 (Pi = Virämiker)

4 Diskussion

4.1 Probenanzahl und Verteilung

In Kapitel 3.2.1 ist die Verteilung der Wildwiederkäuerproben dargestellt. Die Verteilung der Arten bezüglich des jährlichen Abschuss in den vergangenen Jagdjahren von Reh-, Rot- und Gamswild hat in etwa das Verhältnis 6:2:1. Die größte Anzahl von Proben in dieser Arbeit stammt vom Rehwild mit 47 % (297 Proben). Es fällt auf, dass 40 % der untersuchten Proben (Anzahl: 247) vom Rotwild stammen. Dieser relativ hohe Anteil erklärt sich dadurch, dass ein Jäger, in dessen Revier hautsächlich Rotwild vorkommt, mit Beginn des Projektes mit großem Eifer Proben gezogen und eingesandt hat. Abzüglich dieser 158 Rotwildseren aus ein und demselben Jagdrevier, ergibt sich für die eingesandten Proben ein Verhältnis von zirka 6:2:2, dies entspricht ungefähr den relativen Abschusszahlen.

Abschusszahlen liefern eine Abschätzung für die Wildpopulationsdichten, da genaue Bestandserhebungen für die gesamte Wildwiederkäuerpopulation nicht existieren. Die regionale Verteilung der 624 eingesandten Wildwiederkäuerseren ist nicht durchgehend homogen auf die 25 beteiligten Jagdreviere verteilt. Zunächst sind nicht alle Jagdreviere gleich groß, wie dies in Abb. 4 und Abb. 27 zu erkennen ist. Mit der Größe des Reviers korreliert auch das Abschusssoll. An dem Projekt waren 40 Jäger beteiligt. Die Anzahl der eingesandten Proben pro Jäger war hauptsächlich davon abhängig, ob die Einsender Berufsjäger sind, ob sie selbst Jagdpächter sind, dem eigentlichen Beruf der Jäger und der Größe des Jagdreviers. So berichteten Jäger, die erst spät abends auf die Jagd gingen, dass sie vor allem in den Wintermonaten bedingt durch die Kälte und die früh eintretende Dunkelheit meist keine Probe gezogen haben. Dabei wird im Winter der größte Anteil des Abschuss getätigt. Eine Abhängigkeit der Antikörperprävalenz von diesen Variablen ist nicht zu vermuten, so dass aus der ungleichen Einsendedichte kein prinzipieller Fehler zu erwarten ist. Somit kann angenommen werden, dass die eingesandten Seren als Stichprobe repräsentativ für die Wildwiederkäuerpopulation in der Beobachtungsregion stehen.

4.2 Probenqualität der Wildwiederkäuerseren

Die Qualität des eingesandten Serums wird entscheidend von mehreren Faktoren beeinflusst. Darunter fallen die sachgemäße Entnahme an den in Kapitel 3.1.3. genannten Stellen, eine umgehende Versendung mit der Post, die Dauer des Postweges und die Lagerung der Proben bis zum Versand. Verunreinigte (z.B. Erde, Darm- oder Panseninhalt) Blutproben können aufgrund der mikrobiellen Kontamination verderben, die Auswertbarkeit der Proben ist in diesen Fällen in Frage gestellt. Daher wurden die putriden Seren verworfen und alle Seren schlechter Qualität (hämolytisch und schlecht) nicht in die Prävalenzberechnug miteinbezogen.
Eine Lagerung der Vollblutprobe bei 4 °C (Kühlschrank) bis zur Separation des Serums wurde angewiesen, um das übermäßige Wachstum von eventuell in der Probe befindlichen Mikroorganismen zu verhindern. Das Einfrieren der Vollblutprobe zur Verhinderung des mikrobiellen Verderbs wurde als nicht geeignet erachtet, da durch die Eiskristallbildung ein stark hämolytisches Serum resultiert, welches für die serologischen Teste nicht gut geeignet ist. Insgesamt wurden sechs Proben aufgrund des stark putriden Charakters bei Ankunft im Labor verworfen. 39 % der 624 Proben fielen in die Qualitätskategorie ‚hämolytisch' und 18% der Proben in die Kategorie ‚schlecht', letztere waren zusätzlich zur Hämolyse durch bakteriellen Fermentationsgeruch, hohe Viskosität oder auch grüne und braune Verfärbung aufgefallen. In anderen Untersuchungen wurden ebenfalls circa 25 % bis 30 % der Proben als nicht auswertbar beschrieben (Dedek *et al*., 1988; Frölich, 1993).

4.3 Bewertung der ELISA-Testverfahren zur Antikörperbestimmung der Wildwiederkäuerproben und Vergleich mit den SNT-Ergebnissen

Zum Nachweis *Pestivirus*-spezifischer Antikörper wurden drei kommerzialisierte ELISAs für Rinder- bzw. Schweineseren ausgewählt, die grundsätzlich eine spezifische Reaktion mit Wildwiederkäuer-Antikörpern erwarten lassen. Bei den zwei blockierenden Testen ist die Speziesunabhängigkeit anzunehmen, da das Konjugat jeweils nicht gegen die Serumantikörper der Probe gerichtet ist. Der *Blocking*-Test der Fa. IDEXX ist mit BVDV-

Antigen beschichtet und weist Antikörper gegen NS3 (p80) nach. Dieses Protein ist hoch konserviert, es sind Kreuzreaktionen mit allen Pestiviren bekannt sind (siehe Kapitel 2.1). Das Konjugat ist gegen NS3 der Plattenbeschichtung gerichtet und konkurriert im Test mit Antikörpern aus der Serumprobe. Der CSF-Marker E^{rns}-ELISA der Fa. Bommeli ist grundsätzlich anders aufgebaut und wird als ELISA zur Untersuchung von Schweineseren auf Antikörper gegen *Pestiviren* (CSF, BVDV und BDV) verwendet. Die ELISA-Platte ist mit einem monoklonalen Antikörper gegen Pestivirus E^{rns} beschichtet. Als Testantigen wird das ebenfalls bei Pestiviren stark konservierte Protein E^{rns} vom Virus der klassischen Schweinepest verwendet. Dieses wird in definierter Menge in Lösung zusammen mit der Probe auf die Platte gegeben. Sind E^{rns} –spezifische Antikörper in der Probe, wird das Antigen komplexiert und kann nicht mehr an den monoklonalen Antikörper gegen Pestivirus E^{rns} auf der Platte binden. Zum Nachweis wird dann ein E^{rns} –spezifisches Konjugat verwendet. Der dritte Test, BVD-Sero II der Fa. Bommeli, beruht auf dem indirekten Nachweis der Pestivirus-spezifischen Antikörper. Die ELISA-Platten sind mit BVDV-Vollantigen beschichtet, spezifische Antikörper der Serumprobe werden mit Hilfe eines anti-*Ruminant*-IgG Konjugates detektiert. Nach Angabe des Herstellers ist dieses Konjugat auch reaktiv gegen IgG von Rotwild und Rehen, nicht dagegen geeignet für den Nachweis von Gemsen-Immunglobulinen. Diese Aussage wurde nicht selbst überprüft. Diese Angabe kann aber durch das Serum einer Gemse unterstrichen werden, das mit einem hohen BVDV-SN-Titer von 1:1613 im ELISA ein negatives Testergebnis lieferte. Alle drei Teste sind nicht validiert für Wildwiederkäuerseren, sondern für Rinder- bzw. Schweineserum.

Vergleicht man nun die SNT- und die ELISA-Ergebnisse, erkennt man nur teilweise eine Korrelation der ELISA- Werte zu den SNT-Titern (Abb. 13 bis 18). BVDV-SNT-positive Seren sind insbesondere bezüglich der BVDV-1-SNT-Ergebnisse im Titer positiv korreliert mit den ELISA-Ergebnissen der drei ELISAs, wobei niedere SNT-Werte bis ca. 1:100 zu einem nach der Testdefinition für Rinderseren negativen Ergebnis in den ELISAs führen. Eine Änderung der *cut-off* Werte für Wildblute kann die mangelnde Sensitivität für die Seren mit niederen SNT-Werten nicht beheben, wie aus den Abb. 13 bis 18 zu ersehen ist. Auch resultiert ein hoher SN-Titer von 1:1613 bei einer Gämse nicht in einem positiven Ergebnis im BVDV-Sero II-Test. Dies steht im Einklang mit der Angabe des Herstellers, dass Gämsen IgG durch das Konjugat dieses Testes nicht erkannt wird. Auch waren bei diesem Test nur vier von zehn SNT-positiven Proben (neun Hirsch- und ein Rehserum) als positiv erkannt worden.

Der Nachweis spezifischer Antikörper in den SNTs bei den Seren, die in den *Blocking*-ELISA-Testen positiv reagierten, gelang in zahlreichen Fällen nicht, obwohl vier unterschiedliche Pestiviren in den SN-Testen verwendet wurden, repräsentativ für BVDV-Typ1, BVDV-Typ2 und zwei BDV-Typen. Dieses Ergebnis überrascht, da aufgrund des Testaufbaues nicht spezifische Bindungen von Bestandteilen der Probe keine Rolle spielen sollten. Ob Bestandteile der Wildseren das Konjugat in der Enzymaktivität inhibieren oder unspezifische Bindeeffekte zu diesen hohen *Blocking*-Werten führen, kann hier nur spekuliert werden. Auch ist an einen spezifischen *Blocking*-Effekt an die hoch konservierten Proteine NS2/3 und E^{rns} zu denken, der durch Antikörper gegen *Pestiviren* von Wildwiederkäuern hervorgerufen wurde, die im Serumneutralisationstest nicht zu einer Kreuzreaktion mit den BVDV- und BDV-Stämmen führten. Dagegen spricht, dass eine grundsätzliche serologische Kreuzreaktion aller bekannten *Pestiviren* gegeben ist (siehe Kap. 2.1) und hier auch Seren mit hohen *Blocking*-Werten zu keiner neutralisierenden Aktivität führten. Auch spricht dagegen, dass bei drei Seren mit annähernd gleichen, niederen SN-Titern gegen die getesteten SNT-Stämme möglicherweise ein anderes *Pestivirus*, das eigenständig in der Wildwiederkäuerpopulation existiert und nicht direkt mit BVDV oder BDV verwandt ist (Becher *et al*., 2001 und Abb. 2), zugrunde lag, da die Reaktionen in den ELISAs aber auch hier nicht einheitlich waren. Weitere Versuche mit BVDV und BDV entfernten *Pestivirus*stämmen könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.
Zusammenfassend sind damit die ELISAs für die Abschätzung der Seroprävalenz von BVDV-Infektionen bei Wildwiederkäuern nicht geeignet.
Putriden Proben, die sich im SNT toxisch verhalten, sind damit auch nicht mit diesen Testen realistsch bewertbar.

4.4 Prävalenz von BVDV- und BDV- Seroreagenten in der Wildwiederkäuerpopulation

Aus der Prävalenzschätzung der insgesamt 268 Wildwiederkäuerproben zu Grunde gelegt wurden ergab sich, dass bei 112 Rotwildtieren 5,4 % BVDV-Seroreagenten (Vertrauensbereich: 3,0 % - 10,3 %), bei 30 Gemsen 3,4 % seropositive Tiere (Vertrauensbereich: 1,2 % - 15%) und bei 126 Rehwildproben 0 % Seroreagenten mit einem Vertrauensbereich von 0 % bis 2,4 % gefunden wurden. Diese Zahlen korrelieren mit den Ergebnissen der Seroprävalenz in einer noch größer angelegten Studie im Land Brandenburg

Anfang der 90er Jahre, in der 4,74 % seropositive Hirsche gefunden wurden (Müller *et al*., 1997). Auch Frölich (1995) fand fünf Prozent Seroreagenten, wobei eine geringere Probenzahl zur Verfügung stand. Auch Weber *et al.* (1978) untermauern die Seroprävalenz beim Rotwild mit 6,6 % positive Tiere. Bei Cerviden wurden bei weltweiten Untersuchungen ebenfalls circa fünf Prozent Seroreagenten gefunden. So in Australien mit 4 % (McKenzie *et al.*, 1985), in Dänemark mit 5 % (Nielsen *et al*., 2000) und USA mit je 6 % (Kahrs *et al*., 1964, Friend und Haltermann, 1967). Die BVDV-neutralisierenden Titer waren in der Vergangenheit so weit angegeben im Bereich zwischen 1:16 bis 1:45 (Nielsen *et al*., 2000), 1:5 bis 1:80 (Weber *et al*., 1978) und 1:5 bis 1:125 (Frölich, 1995). Vergleichbare Titer wurden auch in dieser Arbeit gefunden und lagen bei einem Rotwild sogar bei 1:508. Homologe Testvirusstämme lassen die höchsten neutralisierenden Antikörpertiter im SNT erwarten, so dass bedingt durch die Vielzahl verschiedener BVD-Virustämme bzw. regional vorkommender Varianten unterschiedlich hohe neutralisierenden Antikörpertiter resultieren (Wolfmeyer *et al*., 1997), so dass der gemessene Antikörpertiter eines Tieres von der Verwandtschaft bzw. Identität des Testvirus mit dem Feldvirus abhängig ist. Titer von 1:4 bis 1:512 wurden in einer Schwarzwedelhirschpopulation gefunden, in der zuvor ein BVDV-Typ 1a aus einem weiblichen Jungtier isoliert wurde (Van Campen *et al*., 2001). Drei Wochen nach experimentellen Infektionen wurden in den Seren von Cerviden Titer von 1:4000 bis 1:8000 gemessen (Tessaro *et al*., 1999). Daraus lässt sich schließen, dass Cerviden mit BVDV infiziert werden können und eine Infektion mit BVDV einen messbaren Anstieg des Antikörpertiters zur Folge haben.

Für die Gemsen existieren wenige Zahlen zur Seroprävalenz. So fanden Baradel *et al*. (1988) 5,5 % der Gemsen in Frankreich als BVDV-seropositiv, was der Größenordnung der eigenen Ergebnisse entspricht, vor allem wenn man aufgrund der geringen Probenzahl den weiten Vertrauensbereich berücksichtigt. Da aufgrund der BVDV- und BDV-SNT Ergebnisse in der eigenen Untersuchung zwei Seroreagenten einer BDV-Infektion zugeordnet werden konnten, reduziert sich die Anzahl der scheinbar BVDV- seropositiven Tiere auf nur mehr ein Tier. Der Titer (1:1613) dieser einen Gemse bezüglich BVDV kann einer kurz zurückliegenden BVDV-Typ1 Infektion zugeordnet werden. Baradel *et al*. (1988) differenzierten bei den vier gefundenen Gemsen nicht weiter nach BDV und BVDV, so dass sich hier nur eine scheinbar höhere BVDV-Seroprävalenz errechnet haben könnte, da auch Liebermann *et al*. (1988, 1989) in etwa zehn Prozent der Cervidenproben aus der Deutschen Demokratischen Republik BDV-Titer im Bereich zwischen 1:4 bis 1:128 gefunden hatten. In der Gemsenpopulation der

Untersuchungsregion wurden sogar BDV-Titer größer als 1:362 gefunden, die sich relativ sicher einer BDV-Infektion zuordnen lassen.

Die Prävalenz von BVDV-Seroreagenten in der Rehpopulation differieren zum Teil sehr. Nur Bögel (1964) und Dedek *et al*. (1988) hatten in Deutschland vergleichbare Zahlen erhalten: 0% und 0,6 %. Auch in Frankreich fanden Baradel *et al*. (1988) 0,7 % seropositive Rehe. In drei weiteren groß angelegten deutschen Untersuchungen fanden Weber et al. (1978) 5,9 %, Frölich (1995) 9,8 %, Müller *et al*. (1997) 4,68 % positive Rehe. Entweder existieren im Norden von Deutschland eigene Pestivirus Infektionszyklen innerhalb der Rehpopulation oder es wurden aufgrund der Kreuzreaktivität der Pestiviren nur scheinbare BVDV-Titer gemessen. Dafür spricht, dass Weber *et al*. (1978) vor allem nur niedrige Titer (1:5 bis 1:80, sieben Seroreagenten, vier Tiere mit Titer 1:5) gefunden hatten, was entweder für eine lang zurückliegende oder eine Infektion mit anderen Pestiviren wie zum Beispiel BDV sprechen würde. In der Studie von Frölich (1993) kann aufgrund der niedrigen BVDV-Titer sowie der gleichzeitig gefundenen BDV-Titer der Rehe, nur in einem geringen Anteil der seropositiven Tiere eine direkte Zuordnung zu einer BVDV-Infektion gemacht werden. So fand Frölich (1993) ebenfalls nur BDV-Titer bei Rehen, der bei einem Reh mit 1:362 sehr hoch ist und auf eine BDV-Infektion schließen lässt.

4.5 Epidemiologische Abschätzung der Interaktion zwischen Wildwiederkäuern und Weiderindern

Ein Wildtier, das in einem Test reagiert, kann Kontakt mit dem Virus gehabt haben oder von einem antigenetisch verwandten Agens, das sich innerhalb der Wildpopulation getrennt von den Nutztierstämmen entwickelt hat, infiziert worden sein (Baradel et al., 1988).

Bei der Suche nach Übertragungen von solchen Infektionserregern, wie in dieser Arbeit dem BVD-Virus, ist der erste Schritt in der Abschätzung der epidemiologischen Bedeutung einer Spezies die Empfänglichkeit der Wildwiederkäuer gegenüber dem Virus zu klären. So wurden Ausbrüche von Krankheiten, die ähnlich der Krankheitssituation der BVD/MD innerhalb der domestizierten Wiederkäuer sind, in mehr als vierzig Spezies – freilebenden und in Gefangenschaft gehaltenen – beschrieben, wobei teilweise *Pestiviren* aus solchen Tieren isoliert wurden (Nettleton, 1990). Aufgrund der Seroprävalenz von BVDV-Antikörpern in den drei freilebenden Tierarten (Rotwild, Reh, Gams) in dieser Arbeit, kann gesagt werden,

dass sich Wildwiederkäuer mit BVDV oder eng verwandten *Pestiviren*, wie zum Beispiel BDV, infizieren können und anschließend detektierbare Antikörper gegen BVDV und BDV bilden.

Die Anwesenheit von Antikörpern im Serum von Tieren weist gewöhnlich auf eine mehr oder weniger lange zurückliegende Infektion mit dem Agens hin; folglich zeigt die Seroprävalenz bezüglich eines Erregers die Möglichkeit der Involvierung in die Epidemiologie der Krankheit. Die Rolle einer Spezies in der Epidemiologie einer Krankheit kann, nur basierend auf der Prävalenz von Antikörpern, nicht ausreichend beurteilt werden. Eine niedrige Prävalenz reflektiert nicht automatisch den Stellenwert im Infektionsgeschehen, da sie auf eine inadequate Exposition als ein Ergebnis einer geringen Populationsdichte von empfänglichen Tieren oder einer ungenügenden Übertragung als ein Ergebnis einer kleinen Population von Vektoren zurückzuführen ist. So ist eine hohe Prävalenz von Antikörpern gegen Virus, das durch Kontaktinfektionen übertragen wird, bei Tieren die gesellig sind und in großen Gruppen leben eher wahrscheinlich (Barnand, 1997). Die bei uns heimischen Wildwiederkäuer sind weit verbreitet, wie die Wildwiederkäuerdichte und die Entwicklung der Population in Deutschland (Claußen, 1986) und dem Untersuchungsgebiet zeigt. Hohe Populationsdichten sind ein prädisponierender Faktor in der Epidemiologie von Erkrankungen. Hinzu kommt, dass Reh-, Rot- und Gamswild, insbesondere in Gebieten Südbayerns, ihre Naturhabitate vielfach mit den landwirtschaftlich extensiv gehaltenen Rinderbeständen teilen. Damit sind günstige Bedingungen für den Austausch von Infektionserregern nicht auszuschließen.

Die heimischen Wildwiederkäuer können in drei Ernährungs-Typen eingeteilt werden. Der erste Typ sind die sogenannten Konzentratselektierer, zu denen das Rehwild gehört. Das Reh benötigt sowohl eiweißreiche als auch rohfaserreiche Futterpflanzen, worunter verschiedene Kräuter und Blätter fallen, die es in Waldrandnähe und in Buschgruppen findet. Das standorttreue Reh lebt den Sommer über als Einzelgänger (Ricke zusammen mit ihrem Kitz) und bildet erst im Winter kleinere Verbände. So hat das Reh aufgrund seines Ernährungstypes und seiner Sozialstruktur kaum Kontakt zu anderen Rehen und zum Rind (von Raesfeld *et al*., 1985). Das Rind als Gras- und Raufutterfresser kann als Typ drei angesehen werden. Ein dem Rind ähnliches Sozial- und Nahrungsverhalten zeigt das Rotwild und zum Teil das Gamswild. Als anpassungsfähiger Intermediärtyp (Typ zwei) haben die in Herden lebenden Cerviden Kontakt zum Rind, da sie mit ihm Weideflächen und Wasserstellen teilen. So dient dem Rotwild die Bodenflora mit Gräsern, Kräutern und Blättern als Nahrungsquelle. Rotwild lebt in größeren nach Geschlechtern getrennten Gruppen, so dass der Kontakt zu mehreren

Tieren der gleichen Art gegeben ist (von Raesfeld und Reulecke, 1988). Zudem ziehen Hirsche über weite Strecken und könnten so Infektionserreger über große Entfernungen verschleppen. Die Antikörpertiter der SN-positiven Tiere sind mit den beiden Virustämmen PT 810 als Vertreter der Gruppe BVDV-Typ1c und dem Stamm CS 8644 als Vertreter von BVDV-Typ2 durchgeführt worden. Sie repräsentieren damit die wichtigsten und am weitesten verbreiteten BVD-Virusstämme, die in der Rinderpopulation vorkommen, wobei Genotyp-2 BVDV-Stämme in der bayrischen Rinderpopulation einen geringen Anteil von circa fünf Prozent nehmen und somit die meisten Isolate dem Genotyp-1 zuzuordnen sind (Wolfmeyer *et al.*, 1997; Beer und Wolf, 1999).

Da die meisten Rotwildseren hohe Titer gegen BVDV-Typ1 zeigten, liegt der Verdacht nahe, dass aufgrund der ähnlichen Ernährungs- und Sozialstruktur, der gleichen Nahrungshabitate, der hauptsächlich vorkommenden BVDV-Typ1-Titer und der hohen Durchseuchung der Rinderpopulation mit BVDV, BVDV vom Rind auf das Rotwild übertragen wird.

Die bei Rehen nachgewiesenen Antikörpertiter lassen keine direkte Zuordnung zum BVDV-Genotyp zu und liegen zudem in einem niedrigen Bereich (Tab. 11). Es ist aber ein deutlicher Titersprung zu erkennen, der aufgrund der Kreuzneutralisation gegen die heterologen Genotypen der BVDV-Stämme oder gegenüber anderer *Pestiviren*, wie hier BDV, unterschiedlich hoch ausfallen. Da der Faktor größer 60 ist lässt sich eine gute Zuordnung zu einer BDV-Infektion machen (Wolfmeyer *et al*., 1997).

Der hohe Titer (1:1613) einer jungen Gams spricht ebenfalls für eine vom Rind ausgehende BVDV-Typ1-Infektion, während die drei anderen Gemsen sich aufgrund des BDV-Titers einer BDV-Infektion zuordnen lassen.

Abgesehen von der Populationsstruktur spielt der Erreger selbst eine entscheidende Rolle, da viele Infektionserreger mehr als eine Wirtsspezies infizieren. So definieren Haydon *et al*. (2002) ein Reservoir als eine oder mehrere epidemiologisch miteinander verbundene Populationen oder Naturhabitate, in welchen das pathogene Agens andauernd beherbergt wird und von welchen die Infektion auf die Zielpopulation übertragen wird. Die Existenz eines Reservoirs wird dadurch bekräftigt, dass Infektionen innerhalb der Zielpopulation nicht aufrecht erhalten werden können, nachdem alle Übertragungsmöglichkeiten zwischen Zielpopulation und Nicht-Zielpopulation eliminiert wurden.

Betrachtet man die Gruppe von SN-positiven Rotwildtieren bezüglich der Alterverteilung (siehe Tab. 12) so erkennt man das bei drei Jungtieren niedrige Titer gefunden wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hier um kolostrale Antikörper handelt und diese Jungtiere selbst nicht mit BVDV infiziert worden sind. Die restlichen fünf Stück Rotwild

zeigen hohe Titer gegen BVDV-Typ1, wobei die Tiere alle älter als drei Jahre sind. Die BVDV-Weideuntersuchung der Rinder wird in der Region Ostallgäu seit drei Jahren flächendeckend und konsequent durchgeführt. Dies lässt den Schluss zu, dass durch die Wegnahme der Infektionsquelle – in dem Fall die persistent virämischen Rinder auf der Weide – in der Rotwildpopulation keine BVDV-Infektionen mehr stattfinden. Das dennoch vereinzelt BVDV-Infektionen in der Wildwiederkäuerpopulation der Untersuchungsregion auftreten, liegt daran, dass immer noch vereinzelt Pi-Rinder auf die Weiden gelangen (siehe Kapitel 3.2.2) und zudem bisher nur die Gemeinschaftsweiden der BVDV-Antigen Untersuchungspflicht unterliegen. Dies wiederum sowie die BVDV-Seroprävalenz von 5,4 % in der Rotwildpopulation spricht gegen eine Existenz eines persistent virämischen Wildwiederkäuers, der die Durchseuchung der Wildpopulation weiterführen würde. So lag die Seroprävalenz unter freilebenden Schwarzwedelhirschen bei 60 % mit SN-Titern zwischen 1:32 und 1:512. Die Stichprobe umfasste 124 Tiere, nachdem aus einem weiblichen Tier ein nzp BVDV-Typ 1a isoliert wurde (Van Campen *et al*., 2001), d.h. ein persistent virämisches Rotwild würde aufgrund der Sozialstruktur in der Population zu einer wesentlich höheren Durchseuchung führen. Rothirsche können mit BVDV-Typ1 und BVDV-Typ2 infiziert werden und scheiden das Virus ebenfalls aus (Tessaro *et al.*, 1999), so dass die Population bei genügendem Kontakt der Tiere durchseucht wäre. Selbst bei einer geringen Populationsdichte wie zum Beispiel bei Elenantilopen im Südosten von Zimbabwe (Vilcek *et al*., 2000) wurde eine Seroprävalenz von 32 % gefunden, nachdem ein persistent infiziertes Tier diagnostiziert werden konnte.

Die Entstehung eines persistent virämischen Wildwiederkäuers ist unter den Bedingungen im Untersuchungsgebiet zudem sehr unwahrscheinlich. Geht man davon aus, dass die Entstehung eines Pi-Wildwiederkäuers ähnlich wie beim Rind abläuft, müsste das gravide Muttertier im ersten Drittel der Gravidität mit BVDV infiziert werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Embryo erst nach dem Schlupf aus der *Zona pellucida,* d.h. frühestens mit der Implantation durch BVDV infiziert werden kann, um eine spezifische Immuntoleranz zu entwickeln. Die Weiderinder die als Quelle von BVDV in Frage kommen befinden sich nur in der Zeit von Mai bis Mitte September, je nach Höhenlage teilweise bis Ende Oktober auf den Weiden, auf denen eine Infektion mit dem Wildtier stattfinden könnte. Betrachten wir zunächst das Reh. Die Brunftzeit liegt zwischen dem 20.07. und dem 15.08.. Nach der Befruchtung macht der Embryo eine 4 ½ Monate dauernde Keimruhe durch, um sich dann Mitte Dezember zu implantieren (von Raesfeld und Reulecke, 1988). Im Dezember ist der Kontakt zu Weiderindern aber nicht mehr gegeben. Beim Rotwild ist die Brunftzeit zwischen

Mitte September und Mitte Oktober, wobei sich der Embryo am zehnten Tag nach der Befruchtung implantiert. Für das Gamswild wird für die Brunftphase die Zeit zwischen Mitte November und Mitte Dezember angegeben (Knaus und Schröder, 1983). Auch bei den beiden zuletzt genannten Tierarten ist die Wahrscheinlichkeit einer BVDV-Infektion ausgehend vom Rind im ersten Drittel der Trächtigkeit sehr unwahrscheinlich.

Es ist bekannt, dass Wildtiere als Frühwarnsysteme für Seuchenzüge dienen können (Dedek *et al*., 1988). Einerseits gilt es die Wildbestände vor Krankheiten zu schützen, andererseits muss die Bildung von Virusreservoiren bei Wildtieren verhindert werden. Eine Wechselbeziehung besteht zum Beispiel zwischen Hausschwein und Wildschwein bezüglich des Infektionsgeschehens der europäischen Schweinepest (Laddomada, 2000).

Naturherdinfektionen können lange Zeit unabhängig von Mensch und Haustier existieren. Die entsprechenden Infektionserreger können unter den im Territorium ständig lebenden Wildtieren über längere Zeit oder dauernd zirkulieren (Bengis *et al*., 2002). So laufen Seuchen und Parasitosen unter den wildlebenden Tieren häufig verdeckt und entgehen meist einer breiten Aufmerksamkeit. Teilweise ist das mit dem Verhalten der Wildtiere zu begründen, die sich bei Erkrankungen in der Regel in Verstecke und schwer zugängliche Einstände einschieben und häufig auch dort verenden. Das Auffinden der verendeten oder erkrankten Wildtiere durch den Menschen ist oft zufallsabhängig, soweit diese Tiere inzwischen nicht Fressfeinden oder Aasfressern zum Opfer gefallen sind (Dedek, 1992). Die Rolle die das BVD-Virus in der Auslösung von Krankheitssymptomen innerhalb der freilebenden Wildwiederkäuer spielt, ist damit unsicher, obwohl bei den untersuchten Wildwiederkäuern mit nachgewiesenen Antikörpern keine oder zumindest keine auffälligen klinischen Symptome beschrieben wurden. Wie in Kapitel 2.1.2 aufgeführt, wurde in der Literatur nur in wenigen Fällen von klinisch kranken Tieren in Zusammenhang mit BVDV-Infektionen berichtet. Zusammenfassend weißt dies auf eine geringe Bedeutung von BVDV in der Wildwiederkäuerpopulation hin.

Aus der serologischen Untersuchung der Weiderinder konnten alle drei Weideinfektionen mit BVDV, die während der Weidephase stattgefunden haben auf eine Quelle in der Rinderpopulation zurückgeführt werden. Damit waren die unerwünschte Virusverbreitung und Virusverschleppung bei den Rindern auf populationsinterne Lücken und Fehler in System und Management sowie Unachtsamkeiten zurückzuführen.

Bei einzelnen Rindern wurde nach der Weidephase eine schwache Reaktion im ELISA (BarVac, Fa. Svanova) gemessen (siehe Tab. 13), die aber nicht als infektionsbedingt gewertet wurde. Eine frische Infektion, die aufgrund der kurzen Weidephase maximal sechs

Monate zurückliegen könnte, würde basierend auf dem damit verbundenen hohen Antikörpertiter zu einem hohen Wert im ELISA führen.

Die Herden V und K waren durch einen Zaun getrennt, so dass die vier Tiere mit Serokonversion über den Zaun infiziert wurden. Da dieser Ansteckungsweg bei weitem nicht so effizient ist wie der direkte und dauernde Kontakt mit dem Virämiker, ist nur ein Teil der Weiderindergruppe der Herde V infiziert worden. Diese Tatsache führte dazu, dass im Rahmen des dänischen BVDV-Bekämpfungsverfahrens die Zäune zweier benachbarter Rinderweiden mindestens 1,5 Meter voneinander entfernt sein müssen (persönliche Mitteilung, Hans Houe, 2001).

Im Fall der Herde B ist eine BVDV-Infektion ausgehend von einem Wildwiederkäuer auszuschließen. Ein Wildkontakt der Weiderinder auf der Heimweide ist äußerst unwahrscheinlich, da sich die Tiere in Hofnähe auf einer eingezäunten Weide befanden. Zudem ist das Futterangebot im Mai so gut, dass die Wildwiederkäuer Habitate in Zivilisationsnähe nicht mit den Rindern teilen. Somit liegt der Verdacht nahe, dass in diesem Fall BVD-Virus durch Vektoren oder andere Rinder in den Bestand gelangt ist und auf diesem Wege die Pi-Mutter infiziert wurde. Es ist davon auszugehen, dass das anschließend im Herbst geborene Pi-Kalb dann alle anderen Weiderinder der Herde B infizierte.

In der Verlaufsuntersuchung der Jahre 2001 bis 2002 (Kap. 3.2.2.1) konnte ein deutlicher Rückgang der Seroprävalenz beobachtet werden. Dieser Erfolg lässt zwei Interpretationen zu. Zunächst ist die Infektionshäufigkeit durch die Schaffung Pi-freier Weiden drastisch reduziert worden. Zweitens hat die Befundung (BVDV-Antigennachweis im Rahmen der Weideauftriebsuntersuchung; serologische Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit) zu einer nicht abschätzbaren Konsequenz in den jeweiligen Herkunftsbetrieben geführt. Wie groß die Anteile dieser beiden Maßnahmen am Gesamterfolg sind lassen sich nicht genau festlegen, aber es lässt die Aussage zu, dass die BVD-Bekämpfung zu einer deutlichen Reduktion der Seroprävalenz führt.

Somit ist für effektive Kontrollprogramme das Wissen über die Dynamik von komplexen Infektionen aus Reservoiren von Bedeutung, falls Krankheiten ausschließlich durch Bekämpfungsprogramme innerhalb der Zielpopulation beherrscht werden. Abschließend kann gesagt werden, dass in der Untersuchungsregion die Wildwiederkäuerpopulation in der Epidemiologie der BVD/MD des Rindes bei den derzeitigen Verhältnissen keine bedeutende Rolle spielt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Prävalenz von Antikörpern gegen das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) und das Border Disease Virus (BDV) in der Wildwiederkäuerpopulation in der südlichen Hälfte des Ostallgäus untersucht. Außerdem wurde versucht, die Existenz von BVDV-Infektionen zwischen Weiderindern und Wildwiederkäuern zu klären. Von November 2000 bis Januar 2003 wurden 624 Wildseren von Rehen, Gemsen und Rotwild gesammelt. Um die Eignung kommerzieller, potentiell Tierart-unabhängiger ELISA-Testverfahren für Wildwiederkäuerseren zu prüfen, wurden alle Seren im Herd-Check-ELISA (IDEXX), 282 Seren im BVD-SeroII (Bommeli) und 176 Proben im E^{rns}-ELISA CSF-Marker (Bommeli) untersucht und mit den Ergebnissen der Serumneutralisationsteste (SNT) (Testviren: BVDV-Typ1c PT 810, BVDV-Typ2 CS 8644; BDV Moredun und BDV 137/4 Riems) verglichen. Alle drei ELISAs waren aufgrund ihres hohen Anteils an falsch positiven Ergebnissen nicht zur Schätzung der Prävalenz von BVDV und BDV-Antikörpern in Wildwiederkäuerseren geeignet. Zur Beurteilung der Seroprävalenz wurden daher nur die SNT-Ergebnisse der nicht zelltoxischen Seren herangezogen; die Zuordnung der Antikörper zu den zugrundeliegenden Pestivirus-Typen erfolgte durch den Vergleich der Titerhöhen. Von 112 Rotwildseren waren sechs (5,4%) BVDV-seropositiv. Keines der 126 Rehseren enthielt BVDV-spezifische Antikörper, ein Serum war BDV-Antikörper positiv (0,8%). Eine von 30 Gemsen (3,3%) war bezüglich BVDV, zwei (6,7%) waren bezüglich BDV serologisch positiv.

Parallel zu den Wildwiederkäuern wurden in den Alpungsphasen der Jahre 2001 und 2002 432 bzw. 250 seronegative Weiderinder aus 27 bzw. 16 Herden über die Weidephase untersucht. Auf die ausgewählten Weiden durften nur BVDV-Antigen negative Tiere verbracht werden. Bei drei Weiden wurden BVDV-Serokonversionen während der Weideperiode beobachtet. In allen drei Fällen war ein Kontakt zu nachgewiesen BVDV-persistent infizierten (PI-) Rindern aufgrund von Managementfehlern gegeben. Der Anteil BVDV-seropositiver Weiderinder vor dem Austrieb aus BVDV-PI-freien Herden mit insgesamt 963 Tieren sank von 2001 bis 2002 von 48,9% auf 24,5%. Dies kann als Effekt der seit 2001 durchgeführten Freihaltung der Gemeinschaftsweiden von BVDV-PI-Tieren bewertet werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Wildwiederkäuer im südlichen Ostallgäu derzeit nicht als BVDV-Infektionsquelle für Rinder zu betrachten sind. Die sehr geringe Prävalenz

BVDV-spezifischer Antikörper deutet darauf hin, dass hier keine persistierenden BVDV-Infektionen in Wildwiederkäuern vorkommen, sondern in der Vergangenheit sporadische BVDV-Infektionen vom Rind auf Wildwiederkäuer stattgefunden haben.

6 Summary

Prevalence of infections with the virus of the bovine virus diarrhoea in the population of wild ruminants connected with cattle on pasture.

The aim of this study was to examine the prevalence of antibodies against the virus of bovine virus diarrhoea and border disease in the population of wild ruminants in the southern part of Ostallgäu (Bavaria, Germany). In addition it has been investigated if there exist any BVD-virus infections between cattle on pasture and wild ruminants of this area. From November 2000 till January 2003 624 serum samples from roe deer, red deer and chamois were collected. To check the suitability of commercial, potentially species independent ELISAs from serum samples of wild ruminants, all serum samples were tested with the Herd-Check-ELISA (IDEXX), 282 serum samples with the BVD-Sero II (Bommeli) and 176 samples with the E^{rns}-ELISA CSF-Marker (Bommeli) and compared with results of serum neutralisation tests. A fairly high amount of every three ELISA test results were false positive and therefore not suitable for assessment of seroprevalences of BVDV- and BDV- antibodies in serum samples of game ruminants. To estimate the seroprevalence only SNT-results of non-zytotoxic serum samples were used and the categorisation of antibodies into belonging types of pestiviruses was made by comparing the levels of antibody-titres. Out of 112 serum samples from red deer only 6 (5.4 %) samples were serologically positive for BVD-virus. None of 126 serum samples from roe deer contained BVD-virus specific antibodies, one serum was positive for BDV antibodies (0.8 %). One of 30 chamois (3.3 %) showed BVDV antibodies, two (6.7 %) reacted serologically positive to BD-virus.

Parallel to game ruminants 432 and 250 seronegative cattle of 27 and 16 herds were investigated during being out on alpine pasture in the years 2001 and 2002. Only BVDV-antigen-negative cattle were allowed to be driven up to selected alpine meadows. During pasture season BVDV-seroconversion was observed in animals of three different fields. In all three cases mistakes in management led to contact with cattle, who were already confirmed as persistent-infected with BVD-virus. Numbers of cattle reacting BVD-seropositive before being turned out on the alpine pasture and coming from BVDV-Pi-free herds with totally 962 animals decreased since 2001 till 2002 from 48,9 % to 25,4 %. This can be seen as an effect of efforts to keep animals with persistent BVD-virus-infections away from commonly used pasture.

In conclusion wild ruminants in the southern part of Ostallgäu, don't have to be considered as a source of BVDV-infections for cattle. The really low prevalence of BVD-virus specific antibodies points out, that there don't exist persistent infections with BVDV in wild ruminants, but that there was sporadic transmission of BVD-virus infections from cattle to game ruminants.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BD	Border Disease
BDV	Border Disease Virus
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten (Insel Riems)
BVD	Bovine Virus Diarrhö
BVDV	Bovine Virus Diarrhö Virus
° C	Grad Celsius
CSF	Classical Swine Fever
d	Tag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
ESP	Europäische Schweinepest
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat
FSME	Frühsommer Meningoenzephalitis
gp	Glykoprotein
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
JR	Jungrind
JTF	Jungtierfenster
kB	Kilobasen
KID_{50}	50 % kulturinfektiöse Dosis
lat.	lateinisch
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LKV	Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredlung in Bayern e.V.
MD	Mucosal Disease
N	Anzahl
Nr.	Nummer
nzp	nicht zytopathogen
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
Pi	persistent infiziert
RNS	Ribonekleinsäure
SNT	Serumneutralisationstest
Tab.	Tabelle
zp	zytopathogen

8 Literaturverzeichnis

Aguire, A.A., D.E. Hansen, E.E. Starkey, R.G. McLean, 1995:
Serologic survey of wild cervids for potential disease agents in selected national parks in the United States.
Preventive Veterinary Medicine 21, 313-322.

Anderson, E.C., L.W. Rowe, 1998:
The prevalence of antibody to the viruses of bovine virus diarrhoea, bovine herpes virus 1, rift valley fever, ephemeral fever and bluetongue and to Leptospira sp in free-ranging wildlife in Zimbabwe.
Epidemiology and Infection 121, 441-449.

Avalos-Ramirez, R., M. Orlich, H.-J. Thiel, P. Becher, 2001 :
Evidence for the Presence of Two Novel Pestivirus Species.
Virology 286, 456-465.

Backer, J.C., 1995:
The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection.
The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice 11, 425-445.

Baradel, J.M., J. Barrat, J. Blaunchou, J.M. Boutin, C. Chastel, G. Dannacher, D. Delmore, Y. Gerard, J.M. Gourreau, V. Kihm, B. Larenaudie, C. Legoff, P.P. Pastoret, P. Perreau, A. Schwers, E. Thiry, D. Trap, G. Uilenberg, P. Vannier, 1988:
Results of a serological survey of wild mammals in France.
Revue Scientifique et Technique 7, 873-883.

Barnard, B.J., 1997:
Antibodies against some viruses of domestic animals in southern African wild animals.
Onderstepoort Journal of Veterinary Research 64, 95-110.

Barrett, M.W., G.A. Chalmers , 1975:
A serologic survey of pronghorns in Alberta and Saskatchewan, 1970-1972.
Journal of Wildlife Diseases 11, 157-163.

Baule, C.; M. van Vuuren, J.P. Lowings, M. Belak, 1997:
Genetic heterogenity of bovine diarrhoea virus isolated in South Africa.
Virus Research 52, 205-220.

Bayrische Landestierärztekammer, 2000:
BVD/ MD- eine Information der Bayrische Landestierärztekammer.
2. Auflage

Becher, P., M. König, D. Paton, H.-J. Thiel, 1995:
Further Characterisation of Border disease virus isolates : evidence of the presence of more than three species within the genus Pestivirus.
Virology 209, 200-206.

Becher, P., M. Orlich, A.D. Shannon, G. Horner, M. König, H.-J. Thiel, 1997:
Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants.
Journal of General Virology 78, 1357-1366.

Becher, P., M. Orlich, A. Kosmidou, M. König, M. Baroth, H.-J. Thiel, 1999:
Genetic Diversity of Pestiviruses: Identifikation of Novel Groups and Implikations for Classifikation.
Virology 262, 64-71.

Becher, P., M. König, H.-J. Thiel, 2001:
Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease: Molekularbiologie des Erregers, Pathogenese, Labordiagnostik und Bekämpfung.
Tierärztliche Praxis 29(G), 266-275.

Beer, M., G. Wolf, 1999:
Selektion von BVDV- Genotyp-II- Isolaten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers und FACS- Analyse.
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 112, 345-350.

Beer, M., G. Wolf, O.-R. Kaaden, 2002:
Phylogenetic Analysis of the 5'-Untranslatet Region of German BVDV Type II Isolates.
Journal of Veterinary Medicine 49, 43-47.

Behlert, C., 1979:
Immobilisation und Krankheiten der Hirsche.
Dissertation, Vet. Med., FU Berlin

Bengis, R.G., R.A. Kock, J. Fischer, 2002:
Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface.
Revue Scientifique et Technique 21, 53-65.

Bögel, K., 1964:
Über die Verbreitung eines Virus der MD-Gruppe in Schafherden Süddeutschlands.
Zentralblatt für Veterinärmedizin 11, 687-692.

Bolin, S.R., W. McClurkin, R.C. Cutlip, M.F. Coria, 1985a:
Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus to vaccination for bovine viral diarrhea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhea virus.
American Journal of Veterinary Research 46, 2467-2470.

Bolin, S.R., W. McClurkin, M.F. Coria, 1985b:
Frequency of persistant bovine viral diarrhea virus infection in selected cattle herds.
American Journal of Veterinary Research 46, 2385-2387.

Bolin, S.R., J.F. Ridpath, 1989:
Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified live bovine viral diarrhea virus vaccines.
American Journal of Veterinary Research 50, 263-271.

Borchers, K., J. Brackmann, O. Wolf, M. Rudolph, P. Glatzel, M. Karsinska, Z.A. Karsinski, K. Frölich, 2002: Virologic Investigastions of free-living European Bison (Bison Bonasus) from the Bialowieza Primeval.
Journal of Wildlife Diseases 38, 533-538.

Boulanger, D., S. Waxweiler, L. Karelle, M. Loncar, B. Mignon, J. Dubuisson, E. Thiry, P.P. Pastoret, 1991 :
Characterisation of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum.
J. Gen. Virol. 72, 1195-1198.

Boye, M., S. Kamstrup, K. Dalsgard, 1991:
Specific sequence amplification of bovine virus diarrhea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequenzing of BVDV nucleic acid.
Veterinary Microbiology 29, 1-13.

Brass, W., L.C. Schulz LC, S. Überschär , 1966:
The occurrence of mucosal-disease-like diseases in zoo ruminants.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 73,155-158.

Brownlie, J., M.C. Clarke, C.J. Howard, 1984:
Experimental production of fetal Mucosal disease in cattle.
The Veterinary Record 114(22), 535-536.

Brownlie, J., 1990a:
Pathogenesis of Mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus.
Vet. Microbiol. 23, 371-382.

Brownlie, J., 1990b:
The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections.
Rev. Sci. Tech. 9, 43-59.

Brownlie, J., 1991:
The pathway of bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease.
Archiches of Virology Suppl. 3, 79-96.

Brownlie, J., M.C. Clarke, 1993:
Experimental and spontaneous mocosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis.
Intervirology 35, 51-59.

Brownlie, J., I. Thompson, A. Curwen, 2000:
Bovine Virus diarrhoea virus – strategic decisions for diagnosis and control.
In Practice, April 2000, 176- 187.

Carlson, U., 1991:
Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus.
The Veterinary Record 128, 145-147.

Carbrey, E.A., W.C. Stewart, J.I. Kresse, 1976:
Natural infection of pig with bovine viral diarrhea virus and its differential diagnosis from hog cholera.
Journal of the American Veterinary Medical Association 169, 1217-1219.

Carman, S., T. van Dreumel, J. Ridpath,M. Hazlett, D. Alves, E. Dubovi, R. Tremblay, S. Bolin, A. Godkin, N. Anderson, 1998:
Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 10, 27-35.

Castrucci, G., G. Avellini, V. Cilli, B. Pedini, D.G. McKercher, C. Valente, 1975:
A study of immunologic relationship among serologically heterologous strains of bovine virus diarrhea virus by cross immunity tests.
Cornell. Vet. 65, 65-72.

Clark, R.K.; D.A. Jessup; M.D. Kock; R.A. Weaver, 1985:
Survey of desert bighorn sheep in California for exposure to selected infectious diseases.
Journal of the American Veterinary Medical Association 187, 1175-1179.

Clark, R.K., W.M. Boyce, D.A. Jessup, L.F. Elliott, 1993:
Survey of pathogen exposure among population clusters of bighorn sheep (Ovis canadensis) in California.
Journal of Zoo and Wildlife Medicine 24, 48-53.

Claußen, G., 1986:
Der Jäger und sein Wild: Wildkunde und Wildkrankheiten.
Berlin, Verlag Paul Parey.

Collett, M.S., R. Larson, S.K. Belzer, E. Retzel, 1988:
Proteins encoded by Bovine Viral Diarrhea Virus: The Genomic Organisation of a Pestivirus.
Virology 165, 200-208.

Corapi, W.V., R.O. Donis, E.J. Dubovi, 1988:
Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopatic viruses from fatal bovine viral diarrhea virus infections.
Journal of Virology 62, 2823-2827.

Corapi, W.V., R.D. Elliott, T.W. French, E.J. Dubovi, 1990:
Thrombozytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus.
Journal of the American Veterinary Medical Association 196, 590-596.

Couvillion, C.E., E.W. Jenney, J.E. Pearson, M.E. Coker, 1980:
Survey for antibodies to viruses of bovine virus diarrhea, bluetongue, and epizootic hemorrhagic disease in hunter-killed mule deer in New Mexico.
Journal of the American Veterinary Medical Association 177, 790-791.

Couvreur, B., C. Letellier, A. Collard , P. Quenon, P. Dehan, C. Hamers, P.P. Pastoret, P. Kerkhofs, 2000: Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium.
Virus Research 85, 17-28.

Cuteri, V., S. Diverio, P. Carnieletto, C. Turilli, C. Valente, 1999:
Serological survey for antibodies against selected infectious agents among fallow deer (Dama dama) in central Italy.
Zentralblatt für Veterinärmedizin B 46, 545-549.

Dahle, J., B. Liess, H.-R. Frey, 1987:
Übertragung von Pestiviren zwischen Tierarten: Experimentelle Infektion von Schweinen mit der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) und von Rindern mit dem Virus der Europäischen Schweinepest (ESP).
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 94, 590-594.

Dahle, J., Th. Pazelt, G. Schagemann, B. Liess, 1993:
Antibody prevalence of hog cholera, bovine viral diarrhoea and Aujezky's Disease virus in wild boars in Northern Germany.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 100, 330-333.

Darbyshire, J.H., 1960:
A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle.
The Veterinary Record 72, 331.

Davidson, W.R., J.L. Blue, L.B. Flynn, S.M. Shea, R.L. Marchinton, J.A. Lewis, 1987:
Parasites, diseases and health status of sympatric populations of Sambar deer and white-tailed deer in Florida.
Journal of Wildlife Diseases 23, 267-272.

Dedek, J., H. Loepelmann, R. Kokles, C. Kretschmar, M. Müller, H. Bergmann, 1988:
Ergebnisse serologischer Untersuchungen auf Antikörper gegen das Virus der bovinen Virusdiarrhoe/ Mucosal Disease beim Rot-, Reh-, Dam- und Muffelwild.
Monatshefte für Veterinär Medizin 43, 63-65.

Dedek, J., 1992:
Untersuchungen zur Analyse und Wertung der epizootiologischen Situation beim jagdbaren Wild. Erarbeitung von Grundlagen für ein Wildlife Monitoring.
Habilitationsschrift, Humboldt-Universität Berlin.

Diaz, R., M. Steen, C. Rehbinder, S. Alenius, 1988:
An outbreak of a disease in farmed fallow deer (Dama dama) resembling bovine virus diarrhea/mucosal disease.
Acta Vet Scand 29, 369-376.

Donis, R.O., 1995:
Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interaction with the host.
The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice 11, 171-181.

Doyle L.G., W.P. Heuschele, 1983:
Bovine viral diarrhea virus infection in captive exotic ruminants.
Journal of the American Veterinary Medical Association 183, 1257-1259.

Drew, T.W., T. Sandwik, P. Wakeley, T. Jones, P. Howard, 2002:
BVD virus genotype 2 detected in British cattle.
The Veterinary Record, November 2002, 551.

Dunbar , M.R., R. Velarde, M.A. Gregg, M. Bray, 1999:
Health evaluation of a pronghorn antelope population in Oregon.
Journal of Wildlife Diseases 35, 496-510.

Edwards, S., J.J. Sands, J.W. Harkness, 1988:
The application of monoclonal antibody panels to characterize Pestivirus isolates from ruminants in Great Britain.
Archives of Virology 102, 197-206.

Edwards, S., V. Moennig, G. Wensvoort, 1991:
The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses.
Vet. Microbiol. 29, 101-108.

Edwards, S., 1996:
Pestivirus diversity: progress report on the international collaborative study.
Proc. of the 3rd ESVV Symposium on Pestivirus infections, 71-75.

Elazhary, M.A.S.Y., J.L. Frechette, A. Silim, R.S. Roy, 1981:
Serological evidence of some bovine viruses in the caribou (Rangifer tarandus caribou) in Quebec.
Journal of Wildlife Diseases 17, 609-612.

Elbers, K., N. Tautz, P. Becher, T. Rümenapf, H.-J. Thiel, 1996:
Processing in the Pestivirus E2-NS2 region; identification of the nonstructural proteins p7 and E2-p7.
Journal of Virology 70, 4131-4135.

English, A.W., 1982:
Serological survey of wild fallow deer (Dama dama) in New South Wales, Australia.
The Veterinary Record 110, 153-154.

Fay, L.D., A.P. Boyce, 1955:
A new disease of deer ?
Presented at 17th Midwest Wildlife Conference.

Fernelius, A.L., W.C. Amtower, G. Lambert, 1973:
Bovine viral diarrhoea virus in swine: Characterics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine.
Can J Comp Med 37, 13-20.

Fischer, S., E. Weiland, K. Frölich, 1998:
Characterization of a bovine viral diarrhea virus isolated from roe deer in Germany.
Journal of Wildlife Diseases 34, 47-55.

Frey, H.-R., U. Flebbe, B. Liess, 1996:
Prävalenz und klinische Symptomatik persistierender BVD-Virusinfektionen in Rinderbeständen Niedersachsens.
Der praktische Tierarzt, 1 / 1996, 49-52.

Friend, M., L.G. Haltermann, 1967:
Serologic survey of two deer herds in New York State.
Bulletin of Wildlife Diseases Ass. 3, 32-34.

Fritzemeier, J., I. Geiser-Wilke, L. Haas, V. Moennig, B. Liess, 1995:
Experimental induced „late-onset" Mucosal Disease – characterisation of the cytopathogenic viruses isolated.
Vet. Microbiol. 46, 285-294.

Frölich, K., 1993:
Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease bei Cerviden in unterschiedlichen Freiland- und Gehegepopulationen: Seroepizootologie und Virusisoloierung.
Dissertation, Freie Universität Berlin

Frölich, K., 1995:
Bovine virus diarrhea and mucosal disease in free-ranging and captive deer (Cervidae) in Germany.
Journal of Wildlife Diseases 31, 247-250.

Frölich, K., M. Hofmann, 1995:
Isolation of bovine viral diarrhea virus-like pestiviruses from roe deer (Capreolus capreolus).
Journal of Wildlife Diseases 31, 243-246.

Frölich, K., E.J. Flach, 1998:
Long-term viral serology of semi-free-living and captive ungulates.
Journal of Zoo and Wildlife Medicine 29, 165-170.

Ganheim, C., S. Alenius, K. Persson-Waller, 2002:
More severe respiratory diseases in calves experimentally infected with Mannheimia hemolytica following BVDV infection compared to single M. hemolytica infection.
Proceedings of XXII World Buiatrics Congress Hannover , 171 – 491.

Goens, S.D., 2002:
The evolution of bovine viral diarrhea: a review.
Canadian Veterinary Journal 43, 946-954.

Gillespie, J.H., J.A. Baker, K. McEntee, 1960:
A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus.
Cornell Vet. 50, 73-79.

Giovannini, A., F.M. Cancellotti, C. Trilli, E. Randi, 1988:
Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (Cervus dama) and wild boar (Sus scrofa) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy.
Journal of Wildlife Diseases 24, 127-132.

Goyal, M.M., M. Bouljihad, S. Haugerrud, J.F. Ridpath, 2002:
Isolation of bovine viral diarrhea virus from an alpaca.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 14, 523-525.

Gruber, A.D., M. Hewicker-Trautwein, B. Liess, G. Trautwein, 1995:
Brain Malformations in Ovine Fetuses Associated with the Cytopathogenic Biotyp of Bovine Viral-diarrhoea Virus.
Zentralblatt für Veterinärmedizin B 42, 443-447.

Guenter, S.E., 1954:
An epizootic among white tailed deer.
Zitiert nach Richards et al., 1956.

Hamblin, C., E.C. Anderson, M. Jago, T. Mlengeya, K. Hirji, 1990:
Antibodies to some pathogenic agents in free-living wild species in Tanzania.
Epidemiology and Infection 105, 585-594.

Hamblin, C., R.S. Hedger, 1979:
The prevalence of antibodies to bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus in African wildlife.
Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2, 295-303.

Harrasawa, R., 1996:
Phylogenetic analysis of Pestivirus based on the 5'-untranslated region.
Acta Virologica 40, 49-54.

Harrasawa, R., M. Giangaspero, 1998:
A novel method for Pestivirus genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region.
J. Virol. Methods 70, 225-230.

Harrasawa, R., M. Giangaspero, G. Ibata, G.J. Paton, 2000:
Giraffe strain of pestivirus: Its taxonomic status based on the 5'-untranslated region.
Microbiol. Immunol. 44, 915-921.

Haydon, D.T., S. Cleveland, L.H. Taylor, M.K. Laurenson, 2002 :
Identifying reservoirs of infection: a conceptual and partical challenge.
Emerg Infect Disease 8, 1468-1473.

Heinz, F.X., M.S. Collett, R.H. Purcell, E.A. Gould, C.R. Howard, M. Houghton, R.J.M. Moormann, C.M. Rice, H.-J. Thiel, 2000:
Family Flaviviridae. In: Virus Taxonomy, Seventh Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses.
Van Regenmotel, M.H.V. et al., eds. San Diego: Academic Press pp. 859-878.

Hewicker-Trautwein, M., B. Liess, H.-R. Frey, G. Trautwein, 1994:
Virological and Pathological Findings in Sheep Fetuses Following Experimental Infektion of Pregnant Ewes with Cytopathogenic-bovine-virus Diarrhoea Virus.
Zentralblatt für Veterinärmedizin B 41, 264-276.

Hoff, H.S., R.O. Donis, 1997:
Induktion of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection.
Virus Res. 49, 101-113.

Hofmann, M.A., K. Brechtbühl, N. Stäuber, 1994:
Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequenzing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region.
Archives of Virology 139, 217-229.

Hofmann, M.J., 1998:
Risikoabschätzung für den Einsatz der BVDV-Lebendvakzine Oregon C24V nach vorheriger Applikation einer Vakzine aus inaktiviertem BVD-Virus: Laborstudie und Feldversuch.
Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Horzinek, M., E. Reczko, K. Petzoldt, 1967:
On the morphology of hog cholera virus.
Arch. Gesamte Virusforschung 21, 475-478.

Houe, H., 1999:
Epidemiological featers and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections.
Veterinary Microbiology 64, 89-107.

Howard, C.J., M.C. Clarke, J. Brownlie, 1985:
An enzym- linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in cattle sera.
Vet. Microbiol. 10, 359-369.

Howard, C.J. , J. Brownlie, M.C. Clarke, 1987:
Comparison by the neutralisation assay of pairs of non-cytopathogenic strains of bovine viral diarrhea virus isolated from cases of Mucosal disease.
Vet. Microbiol. 13, 361-369.

Hulst, M.M., R.J. Moormann, 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 difernent receptors.
J. Gen. Virol. 78, 2779-2787.

Hyera, J.M.K., J. Dahle, B. Liess, V. Moenning, H.-R. Frey, 1987:
Gewinnung hochtitriger Antiseren gegen BVD-Virus aus Schweinen und ihrer Verwendung für direkte Immunfluoreszenz- und Immunperoxidase Techniken.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 94, 576-580.

Kahrs, R., G. Atkinson, J.A. Baker, L. Carmichal, L. Coggins, J. Gillespie, P. Langer, V. Marshall, D. Robson, B. Sheffy, 1964:
Serological studies on the incidence of bovine virus diarrhea, infektious bovine rhinotracheitis, bovine myxovirus parainfluenza-3 and Leptospira pomona in New York State.
Cornell Vet. 54, 360-369.

Karesh, W.B., J.A. Hart, T.B. Hart, C. House, A. Torres, E.S. Dierenfeld, W.E. Braselton, H. Puche, R.A. Cook, 1995: Health evaluation of five sympatric duiker species (Cephalophus sp)
Journal of Zoo and Wildlife Medicine 26, 485-502.

Karesh, W.B., M.M. Uhart, E.S. Dierenfeld, W.E. Braselton, A. Torres, C. House, H. Puche, R.A. Cook, 1998: Health evaluation of free-ranging guanaco (Lama guanicoe).
Journal of Zoo and Wildlife Medicine 29, 134-141.

Kingscote, B.F., W.D.G. Yates, G.B. Tiffin, 1987:
Diseases of wapiti utilizing cattle range in south western Alberta.
Journal of Wildlife Diseases 23, 86-91.

Kingscote, B.F., J.G. Bohac, 1986:
Antibodies to bovine bacterial and viral pathogens in pronghorns in Alberta, 1983.
Journal of Wildlife Diseases 22, 511-514.

Knaus, W., W. Schröder, 1983:
Das Gamswild: Naturgeschichte, Verhalten, Ökologie, Hege u. Jagd, Krankheiten.
3. Auflage; Berlin: Verlag Paul Parey.

Kocan, A.A., A.W. Franzmann, K.A. Waldrup, G.J. Kubat, 1986:
Serologic studies of select infectious diseases of moose (Alces alces L.) from Alaska.
Journal of Wildlife Diseases 22, 418-420.

König M., T. Lengsfeld, T. Pauly, R. Stark, H.-J. Thiel, 1995:
Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins.
Journal of Virology 69, 6479-6486.

Kreienbrock, L., S. Schach, 2000:
Epidemiologische Methoden
3. Auflage, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag

Kümmerer, B.M., N. Tautz , P. Becher , H.-J. Thiel, G. Meyers, 2000:
The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses.
Veterinary Microbiology 77,117-128.

Kümper, H., M. König, H.-J. Thiel, A. Armien, 2000:
Atypische ZNS- Veränderungen infolge diaplazentarer BVD-Virusinfektion.
Tierärztliche Praxis 28(G), 74-79.

Laddomada, A., 2000:
Incidence and control of CSF in wild boar in Europe.
Veterinary Microbiology 73, 121-130.

Lawman, M.J., D. Evans, E.P. Gibbs, A. McDiarmid, L. Rowe, 1978:
A preliminary survey of British deer for antibody to some virus diseases of farm animals.
Br Vet J 134, 85-91.

Lee, K.M., J.H. Gillespie, 1957:
Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture.
Am. J. Vet. Res. 18, 952-953.

Leila, S., R. Joyal, M. St.Georges, L. Lamontagne, 1991:
Serological survey of white tailed deer on Anticosti Island Quebec for Bovine Herpesvirus 1, Bovine viral Diarrhea and Parainfluenza-3 .
Journal of Wildlife Diseases 27, 569-577.

Liebermann, H., J. Dedek, H. Loepelmann, 1988:
Zur verbreitung des Border Disease- Virus bei Wildwiederkäuern in einem Bezirk der DDR.
Monatshefte der Veterinärmedizin 43, 718-720.

Liebermann, H., D. Tabbaa, J. Dedek, H. Loepelmann, J. Stubbe, H.J. Selbitz, 1989:
Serologische Untersuchungen auf ausgewählte Virusinfektionen bei Wildwiederkäuern in der DDR.
Monatshefte für Veterinärmedizin 44, 380-382.

Liebler, E., U. Johannsen, J. Pohlenz, 1995:
Die hämorrhagische Verlaufsform der akuten Bovinen Virusdiarrhö: Literaturübersicht und Fallbericht.
Tierärztliche Praxis 23, 18-25.

Liess, B., 1967:
Die äthiologische Abgrenzung selbstständiger Virusinfektionen, insbesondere der Virusdiarrhöe- Mucosal Disease, im sog. „MD-Komplex“ bei Rindern.
Deutsche Tierärztlich Wochenschrift 46-49.

Liess, B., H. Blindow, S. Orban, B. Sasse-Patzer, H.-R. Frey, D. Timm, 1982:
Aborte, Totgeburten, Kümmern, Lämmersterben in zwei Schafherden Nordwestdeutschlands-Border Disease in der Bundesrepublik?
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 89, 6-11.

Liess, B., S. Orban, H.-R. Frey, G. Trautwein, W. Wiefel, H. Blindow, 1984:
Studies on transplazental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51^{st} to 190^{th} day of gestation).
Zentralblatt für Veterinärmedizin B 31, 669-681.

Liess, B., H.-R. Frey, G. Trautwein, W. Peters, 1987a:
Häufigkeit des Auftretens persistierender BVD-Virusinfektionen und ihre Auswirkung in der Rinderpopulation.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 94, 583-585.

Liess, B., S. Orban, H.-R. Frey, G. Trautwein, 1987b:
Folgen transplazentarer Übertragung von BVD-Virus auf Rinderföten.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 94, 584-587.

Loehr, B.I., H.-R. Frey, V. Moennig, I. Geiser-Wilke, 1998:
Experimental induction of Mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus.
Archives of Virology 143, 667-679.

Loken, T., I. Bjerkas, 1991:
Experimental pestivirus infections in pregnant goats.
J Comp Pathol 105, 123-140.

Loken, T., J. Krogsrud, I. Bjerkas, 1991:
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., 1992:
Pestivirus infections in ruminants in Norway.
Revue Scientifique et Technique 11, 895-899.

Lowings, P., G. Ibata, J. Needham, D. Paton, 1996:
Classical swine fever virus diversity and evolution.
J. Gen. Virol. 77, 1311-1321.

Matschullat, G., J. Dahle, B. Roder, V. Moennig, B. Liess, 1994:
Feldinfektion mit BVD-Virus beim Schwein: Epidemiologie und Diagnostik.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 101, 22-26.

Mayer, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann, 1977:
Virologische Arbeitsmethoden Band II.
Stuttgart: VEB Gustav Fischer Verlag.

McClurkin, A.W., E.T. Littledike, R.C. Cutlip, G.H. Frank, G.H. Coria, S.R. Bolin, 1984:
Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus.
Can. J. Comp. Med. 48, 156-161.

McDiarmid, A., 1975:
Some diseases in wild deer in the United Kingdom.
The Veterinary Record 97, 6-9.

McKenzie, R.A., A.R. Mackenzie, D.H. Cybsinski, 1985:
Diseases of deer in south eastern Queensland.
Australian Veterinary Journal 62: 424.

McMartin, D.A., D.R. Snodgrass, W. Corrigall, 1977:
Bovine virus diarrhoea antibody in a Scottish red deer.
The Veterinary Record 100, 187.

Meyers, G., H.-J. Thiel , 1996:
Molecular characterization of pestiviruses.
Adv Virus Res 47, 53-118.

Moennig, V., S.R. Bolin, C.O.Z. Coulibaly, N.E. Kelso Gourley, B. Liess, A. Mateo, W. Peters, I. Greiser-Wilke, 1987:
Untersuchugen zur Antigenstruktur von Pestiviren mit Hilfe monoklonaler Antiköper.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 94, 572-576.

Moennig, V., H.-R. Frey, E. Liebler, J. Pohlenz, B. Liess, 1990:
Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro.
The Veterinary Record 127, 200-203.

Morton , J.K., J.F. Evermann, R.A. Dieterich, 1990:
Experimental infection of reindeer with bovine viral diarrhea virus.
Rangifer 10, 75-77.

Müller, T., M. Kramer, D. Beier, 1997:
Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen ausgewählte bovine und ovide Viruserkrankungen bei Reh- (Capreolus capreolus), Rot- (Cervus elaphus), Dam- (Dama dama) und Muffelwild (Ovis musimon) im Bundesland Brandenburg.
Zeitschrift für Jagdwissenschaft 43, 166-175.

Munday, B.L., F.B. Ryan, S.J. King, A. Corbould, 1966:
Preparturient infections and other causes of foetal loss in sheep and cattle in Tasmania.
Australian Veterinary Journal 42, 189-193.

Munday, B.L., 1972:
A serological study of some infectious disease of Tasmania wildlife.
Journal of Wildlife Diseases 8, 169-175.

Murphy, F.A., E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek, M.J. Studdert, 1999:
Flaviviridae. In Veterinary Virology, Third Edition Academic Press, pp. 555- 569

Neumann, W., J. Buitkamp, G. Bechmann, W. Plöger, 1980:
BVD/MD- Infektion bei einem Damhirsch.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 87, 94.

Nettleton, P.F., J.A. Herring, 1980:
Isolation of bovine virus diarrhea virus from Scottish red deer.
The Veterinary Record 107, 425-426.

Nettleton, P.F., 1990:
Pestivirus infections in ruminants other than cattle.
Revue Scientifique et Technique 9, 131-150.

Nettleton, P.F., J.A. Gilray , P. Russo, E. Dlissi, 1998:
Border disease of sheep and goats.
The Veterinary Research 29, 327-340.

Nielsen, S.S., L. Roensholt, V. Bitsch, 2000:
Bovine virus diarrhea virus in free-living deer from Denmark.
Journal of Wildlife Diseases 36, 584-587.

Parks, J.B., J.J. England, 1974:
A serological survey for selected viral infections of Rocky Mountain bighorn sheep.
Journal of Wildlife Diseases 10, 107-110.

Paton, D.J., U. Carlsson, J.P. Lowings, J.J. Sands, S. Vilcek, S. Alenius, 1995a: Identifikation of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolated from infected cattle and sheep.
Veterinary Microbiology 43, 283-294.

Paton, D.J., J.J. Sands, J.P. Lowings, J.E. Smith, G. Ibata, S. Edwards, 1995b:
A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing.
The Veterinary Research 26, 92-109.

Pellerin, C., J. Van Den Hurk, J. Lecomte, P. Tijssen, 1994:
Identification of a New Group of Bovine Viral Diarrhea Virus Strains Associated with severe Outbreaks and high Mortalities.
Virology 203, 260-268.

Plant, J.W., I.E. Littlejohns, A.C. Gardiner, J.T. Vantsis, R.A. Huck, 1973:
Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever.
The Veterinary Record 92, 455.

Plowright, W., 1969:
Zitiert nach Hamblin und Heger, 1979.

Prieto, L., M.C. Gil, T.J. Roy, 1999:
Detection of antibodies to IBR and BVD in Iberian deer (Cervus elaphus hispanicus) in Caceres province (Spain), where cattle are kept under extensive husbandary.
ITEA Production Animal 20, 399-400.

Radostits, O.M., I.R. Littlejohns, 1988:
New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus.
Canadian Veterinary Journal 29, 513-528.

Rebhuhn, W.C., T.W. French, J.A. Perdrizet, E.J. Dubovi, S.G. Dill, L.F. Karcher, 1989:
Thrombozytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle.
J Am Intern Med 3, 42-46.

Renard, A., C. Guiot, D. Schmetz, L. Dageneis, P.P. Patoret, D. Dina, J.A. Martial, 1985:
Molecular cloning of bovine viral diarrhea virus sequences.
DNA 4, 429-438.

Richards, S.H., I.A. Schippers, D.F. Eveleth, R.F. Shumard, 1956:
Mucosal disease of deer.
Veterinary Medicine 51, 358-362.

Ricula, U., I. Laamanen, P. Veijalainen, L. Sihvonen, 2002 :
Transmission of BVDV via semen from transiently infected (TI) bull.
Proceedings of XXII World Buiatrics Congress Hannover , 170 – 463.

Ridpath, J.F., S.R. Bolin, E.J. Dubovi, 1994:
Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes.
Virology 205, 66-74.

Ridpath, J.F., S.R. Bolin, 1995a:
The Genomic Sequence of a virulent Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) from Type 2 Genotyp: Detection of a large Genomic Insertion in a Noncytopathic BVDV.
Virology 212, 39-46.

Ridpath, J.F., S.R. Bolin, 1995b:
Delayed onset Mucosal Disease as a result of genetic recombination between genotyp 1 and genotype 2 BVDV.
Virology 212, 259-262.

Ridpath, J.F., Bolin S.R., 1998:
Differntiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR.
Mol. Cell. Probes 12, 101-106.

Ridpath, J.F., J.D. Neill, M. Frey, J.G. Landgraf, 2000 :
Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America.
Veterinary Microbiology 77, 145-155.

Riemann, H.P., R. Ruppanner, P. Willeberg, E. Franti, W.H. Elliott, R.A. Fisher, O.A. Brunetti, J.A. Howarth, D.E. Behymer, 1979:
Serologic Profile of Exotic Deer at Point Reyes National Seashore.
Journal of American Veterinary Medical Association 175, 911-913.

Rithie, A.E., A.L. Fernelius, 1968:
Direct immuno-electron microscopy and some morphological features of hog cholera virus.
Arch. Gesamte Virusforschung 23, 292-298.

Romvary, J., 1965:
Incidence of virus diarrhoea among roes.
Acta Vet Acad Sci Hung 15, 451-455.

Rümenapf, T., G. Unger, J.H. Strauss, H.J. Thiel, 1993:
Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses.
Journal of Virology 67, 3288-3294.

Sakoda, Y., S. Ozawa, S. Damrongwatanapokin, M. Sato, K. Ishikawa, A. Fukusho, 1999:
Genetic heterogeneity of porcine and ruminant Pestivirus mainly isolated in Japan.
Veterinary Microbiology 65, 75-86.

Schellner, H. P., 1977:
Untersuchungsergebnis von Fallwild und anderen ausgewählten Tierarten v0n 1973 bis 1976 in Bayern.
Tierärztliche Umschau 32, 225-228.

Schellner, H.P., 1982:
Krankheiten des Damwildes (Cervus dama): Untersuchungsergebnisse von 1977-1982.
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift 95, 293-294.

Scherer, C.F., E.F. Flores, R. Weiblen, L. Caron, L.F. Irigoyen, J.P. Neves, M.N. Maciel, 2001: Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus.
Veterinary Microbiology 79, 285-299.

Scott, F.W., R.F. Kahrs, I.M. Parsonson, 1972:
A cytopathic strain of bovine viral diarrhea- Mucosal disease virus isolated from a bovine fetus.
Cornell Vet. 62, 74-84.

Shope, R.E., L.G. Macnamara, R. Mangold, 1955:
Deer mortalità/ epizootic hemorrhagic disease of deer.
New York Outdoors 6, 16.

Stauber, E.H., R. Autenrieth, D.O. Markham, V. Whitbeck, 1980:
A seroepidemiologic survey of three pronghorn (Antilocapra americana) populations in southeastern Idaho, 1975-1977.
Journal of Wildlife Diseases 16, 109-115.

Steger, G., 1973:
Untersuchungsergebnisse an 1500 Objekten aus der Gruppe wildlebender Wiederkäuer.
Verhbar. Erkrg. Zootiere 15, 25-34.

Stewart, W.C., E.A. Carbrey, E.W. Jenny, 1971:
Bovine viral diarrhea infection in pigs.
Journal of American Veterinary Medical Association 159, 1556-1563.

Stewart, W.C., L.D. Miller, J.I. Kresse, M.L. Snyder, 1980:
Bovine viral diarrhea infection in pregnant swine.
American Journal of Veterinary Research 41, 459-462.

Swasdipan, S., H. Bielefeldt-Ohmann, N. Phillips, P.D. Kirkland, M.R. McGowan, 2001:
Rapid transplacental infection with bovine pestivirus following intranasal inoculation of ewes in early pregnancy.
Veterinary Pathology 38, 275-280.

Tajima, M., H.R. Frey, O.Yamato, Y. Maede, V. Moennig, H. Scholz, I. Greiser-Wilke, 2001:
Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany.
Virus Research 76, 31-42.

Taniyama, H., T. Ushiki, M. Tajima, T. Kurosawa, N. Kitamura, K. Takahashi, K. Matuskawa, C. Itakura, 1995: Spontaneous diabetes mellitus associated with persistent bovine viral diarrhea (BVD) virus infection in young cattle.
Veterinary Pathology 32, 221-229.

Tarry, D.W., L. Bernal, S. Ewards, 1991:
Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood flies.
The Veterinary Record 128, 82-84.

Tautz, N., H.-J. Thiel, E.J. Dubovi, G. Meyers, 1994:
Pathogenesis of Mucosal disease: a cytopathogenic Pestivirus generated by an internal deletion.
Journal of Virology 68, 3289-3297.

Taylor, S.K., V.M. Lane, D.L. Hunter, K.G. Eyre, S. Kaufman, S. Frye, M.R. Johnson, 1997:
Serologic survey for infectious pathogens in free-ranging American bison.
Journal of Wildlife Diseases 33, 308-311.

Tessaro, S.V., P.S. Barman, D. Deregt, 1999:
Viremia and virus shedding in elk infected with type 1 and virulent type 2 bovine viral diarrhea virus.
Journal of Wildlife Diseases 35, 671-677.

Thierauf, 1993:
Untersuchungen zur Epidemiologie, Diagnose und Immunprophylaxe von BVD/MD-Virusinfektionen in Milch zuchtbetrieben.
Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig Maximilians Universität München.

Thorsen, J., J.P. Henderson, 1971:
Survey for antibody to infectious IBR, BVD and parainfluenza-3 in moose sera.
Journal of Wildlife Diseases 7, 93-95.

Tijssen, P.,C. Pellerin, J. Lecomte, J. van den Hurk, 1996:
Immunodominate E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhea group 2 viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses.
Virology 217, 356-361.

Trautwein, G., M. Hewicker, B. Liess, S. Orban, W. Peters, 1987:
Kleinhirnhypoplasie und Hydrabenzephalie beim Rind nach transplazentarer Boviner Virusdiarrhoe- Infektion.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 94, 588-590.

Turner, J.C., J.B. Payson, 1982:
Prevalence of antibodies of selected infectious disease agents in the peninsular desert bighorn sheep (Ovis canadensis cremnobates) of the Santa Rosa Mountains, California.
Journal of Wildlife Diseases 18, 243-245.

Van Campen, H., E.S. Williams, J. Edwards, W. Cook, G. Stout, H. Van Campen, 1997:
Experimental infection of deer with bovine viral diarrhea virus.
Journal of Wildlife Diseases 33, 567-573.

Van Campen, H., J. Ridpath, E. Williams, J. Cavender, J. Edwards, S. Smith, H. Sawyer, 2001: Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming.
Journal of Wildlife Diseases 37, 306-311.

Van Rijn, P.A., H.G. van Gennip, C.H. Leendertse, C.J. Bruschke, D.J. Paton, R.J. Moormann, J.T. van Oirschot, 1997:
Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2.
Virology 237, 337-348.

Vilcek, S., S. Belak, 1997:
Organisation and diversity of the 3'-noncoding region of classical swine fever virus genome.
Virus Genes 15, 181-185.

Vilcek, S., P.F. Nettleton, D.J. Paton, S. Belak, 1997:
Molecular characterisation of ovine pestiviruses.
Journal of General Virology 78, 725-735.

Vilcek, S., H.V. Björklund, G.W. Horner, J. Meers, S. Belak, 1998:
Genetic typing of pestivirus from New Zealand.
N. Z. Vet. J. 46, 35-37.

Vilcek, S., S. Alenius, D.J. Paton, C. Mittelholzer, S. Belak, 1999a:
Genetic clustering of bovine viral diarrhoea viruses in cattle farms: genetic identification and analysis of viruses directly from cattle serum.
The Veterinary Journal 158, 33-38.

Vilcek, S., T.W. Drew, A. McGoldrick, D.J. Paton, 1999b:
Genetic typing of bovine Pestivirus from England and Wales.
Veterinary Microbiology 69, 227-237.

Vilcek, S., D.J. Paton, P. Lowings, H. Björklund, P. Nettleton, S. Belak, 1999c:
Genetic analysis of pestiviruses at the 3' end of the genome.
Virus Genes 18, 107-114.

Vilcek, S., D.J. Paton, L.W. Rowe, E.C. Anderson, 2000:
Typing of pestiviruses from eland in Zimbabwe.
Journal of Wildlife Diseases 36, 165-168.

Vilcek, S., I. Greiser-Wilke, B. Durkovic, W. Obritzhauser, A. Deutz, J. Kofer, 2003:
Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria).
Vet Microbiol 91: 285-291.

Von Raesfeld, F., A.H. Neuhaus, K. Schaich, 1985:
Das Rehwild: Naturgeschichte, Hege u. Jagd.
9. Auflage; Berlin, Verlag Paul Parey.

Von Raesfeld, F., K. Reulecke, 1988:
Das Rotwild: Naturgeschichte, Hege, Jagdausübung.
9. Auflage; Berlin, Verlag Paul Parey

Weber, A., J. Paulsen, H. Krauss, 1978:
Seroepidemiologische Untersuchung zum Vorkomen von Infektionskrankheiten bei einheimischen Schalenwild.
Praktischer Tierarzt 59, 353-358.

Weber, K.H., K.-P. Hürter, C. Commichau, 1982:
Über das Vorkommen des Virusdiarrhoe / Mucosal Disease Virus bei Cerviden in Rheinland-Pfalz.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 89, 1-3.

Weidenmüller, H., 1971:
Fallwilduntersuchung 1950-1970.
Tierärztliche Umschau 26, 201-203.

Weiland, E., R. Stark, B. Haas, T. Rümenapf, G. Meyers, H.-J. Thiel, 1990:
Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies form part of a disulfide linked heterodimer.
Journal of Virology 64, 3563-3569.

Weiland, E., R. Ahl, R. Stark, F. Weiland, H.-J. Thiel, 1992:
A second envelope glycoprotein mediates neutralisation of a Pestivirus, hog cholera virus.
Journal of Virology 66, 3677-3682.

Weiss, M., C. Hertig, M. Strasser, H.-R. Vogt, E. Peterhans, 1994:
Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease: eine Übersicht.
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 136, 173-185.

Wolfmeyer, A., G. Wolf, M. Beer, W. Strube, H.-R. Hehnen, N. Schmeer, O.-R. Kaaden, 1997: Genomic (5' UTR) and serological differences among German BVDV field isolates.
Archives of Virology 142, 2049-2057.

Zarnke, R.L., 1983:
Serologic survey for selected microbial pathogens in Alaskan wildlife.
Journal of Wildlife Diseases 19, 324-329.

Zhang, G., S. Aldridge, M.C. Clarke, J.W. McCauley, 1996:
Cell death induced by cytopathogenic viral diarrhea virus is mediated by apoptosis.
J. Gen. Virol. 77, 1677-1681.

9 Lebenslauf

Name:	Markus Johannes Kleinschmidt
Geburtsdatum:	18.02.1975
Geburtsort:	Mussenhausen (Markt Rettenbach)

Schulausbildung:	1981 - 1985	Grundschule in Ottobeuren
	1985 - 1991	Gymnasium in Ottobeuren
	1991 - 1994	Bernhard- Strigel- Gymnasium in Memmingen
	1994	Abitur
Zivildienst:	1994 - 1995	15 Monate im Kreiskrankenhaus Ottobeuren
Studium:	1995 - 1997	Studium an der Universität Ulm Fachrichtung: Diplom Physik
	1997	Diplomvorprüfung Physik
	1997 - 2003	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians- Universität München
	März 2003	Approbation als Tierarzt

10 Danksagung

An dieser Stelle soll all denen gedankt werden, die maßgeblich an der Durchführung des Projektes beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Besonders danke ich Herrn Dr. Georg Wolf für seine wertvollen Anregungen, die freundschaftliche Unterstützung und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Danken möchte ich Frau Dr. Sabine Kühne und allen Mitarbeiterinnen des BVDV-Labors für die Unterstützung bei der Durchführung der SN-Teste.

Frau Hilke Hubert gilt mein besonderer Dank für die tatkräftige Unterstützung beim Klopfen der tausenden ELISAs sowie bei der Probengewinnung.

Allen Mitarbeitern des LGL in OSH und besonders Herrn Dr. Gerbermann, Frau Dr. Forster und Herrn Dr. Birlbauer durch deren Hilfe die Erfassung und Auswertung der BVDV-Serologie der Weiderinder ermöglicht wurde.

Für die Mithilfe in der Organisation des Projektes danke ich Herrn Dr. Ludwig und Herrn Dr. Götz im Veterinäramt in Markt Oberdorf.

Herrn Dr. Martin Beer und Mitarbeitern der BFAV (Insel Riems) danke ich für die Durchführung der BDV-SN-Teste.

Zu guter letzt gilt mein besonderer Dank allen Jägern, Landwirten, Weidebetreibern und Tierärzten im Landkreis Ostallgäu, durch deren Mithilfe die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht wurde. Herrn Anton Dilger, Herrn Dieter Hopf und Herrn Werner Schlichting danke ich für die wunderschönen Rehfotos.