

Untersuchungen zu Infektionen mit dem
Bovinen Alphaherpesvirus 2 in Bayern

von Stefanie Singer

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

Untersuchungen zu Infektionen mit dem
Bovinen Alphaherpesvirus 2 in Bayern

von Stefanie Singer

aus Forchheim

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und
Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim

Mentorin: PD Dr. Antonie Neubauer-Juric

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring

Tag der Promotion: 25.07.2020

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Das Bovine Alphaherpesvirus 2 (BoHV-2).....	2
1.1.	Taxonomie und Morphologie des BoHV-2	2
1.2.	Klinische Symptomatik der BoHV-2-Infektionen	4
1.3.	Latenz des BoHV-2.....	7
1.4.	Verbreitung der BoHV-2-Infektionen	9
1.5.	BoHV-2-Infektionen bei kleinen und Wildwiederkäuern	12
1.6.	Übertragung von BoHV-2-Infektionen.....	13
2.	Problematik unspezifischer Reaktionen in BoHV-1 (Bovines Alphaherpesvirus 1)-Antikörper-ELISAs	16
3.	Nachweismethoden für BoHV-2-Infektionen	19
3.1.	Serologische Nachweismethoden.....	19
3.2.	Virologische Nachweismethoden	20
III.	PUBLIKATION	23
IV.	DISKUSSION	54
1.	Untersuchungen zur Seroprävalenz von BoHV-2-Infektionen in Bayern.....	54
1.1.	Auswahl von Serumproben zur Untersuchung auf BoHV-2-Antikörper.	54
1.2.	Regionaler Vergleich von BoHV-2-Seroprävalenzen	58
1.3.	BoHV-2-Seroprävalenz innerhalb bayerischer Betriebe	60
1.4.	Untersuchungen zu unspezifischen Reaktionen von Rinderseren in BoHV-1-Antikörper-ELISAs	65
1.4.1.	Statistischer Zusammenhang zwischen der BoHV-2-Seroprävalenz und nicht-negativen Reaktionen in der BoHV-1-Überwachung	65
1.4.2.	Problematik der nicht-negativen BoHV-1-Reaktionen im regionalen Vergleich.....	72
1.4.3.	Zusammenhang zwischen der BoHV-2-Seroprävalenz und der Reaktivität von Seren im Trachitest	78

2.	Untersuchungen zu aktuellen BoHV-2-Infektionen in Bayern.....	79
2.1.	Etablierung von BoHV-2 spezifischen PCR-Formaten.....	79
2.2.	Untersuchung von Gewebeproben von Rindern mit Veränderungen im Bereich des Euters oder des Flotzmauls.....	83
2.3.	Detektion von Herpesviraler DNA in Haut- und Organproben.....	86
2.4.	Untersuchung von Nasentupfer-Proben auf BoHV-2-Genom.....	89
2.5.	Virologische Untersuchung von Rotwild-Organproben auf BoHV-2-Genom.....	90
V.	ZUSAMMENFASSUNG	93
VI.	SUMMARY	95
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	97
VIII.	DANKSAGUNG.....	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
Abb.	Abbildung
BHM	Bovine Herpesmammillitis
BLAST	Basic local alignment search tool
BoHV-1	<i>Bovines Alphaherpesvirus 1</i>
BoHV-2	<i>Bovines Alphaherpesvirus 2</i>
BoHV-5	<i>Bovines Alphaherpesvirus 5</i>
BoHV-6	<i>Bovines Gammaherpesvirus 6</i>
bp	Base pair, dt. Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CI	Confidence interval, dt. Konfidenzintervall
CpHV	Caprines Alphaherpesvirus
Cq	Quantification cycle
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EHV	<i>Equides Alphaherpesvirus</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FeHV	<i>Felides Alphaherpesvirus</i>
gB	Glykoprotein B
gE	Glykoprotein E
gG	Glykoprotein G
ggf.	Gegebenenfalls
gH	Glykoprotein H
ICP	Infected-cell protein
IR	Internal Repeat
LAT	Latency-associated transcript
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LSD	Lumpy Skin Disease
nAk	Neutralisierende Antikörper
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NT	Neutralisationstiter
OD	Optische Dichte
OvHV	<i>Ovines Gammaherpesvirus</i>
PCR	Polymerase chain reaction, dt. Polymerase-Kettenreaktion
PLSD	Pseudo Lumpy Skin Disease

S/P%	Sample/Positive-Value
SNT	Serumneutralisationstest
Tab.	Tabelle
TR	Terminal Repeat
vgl.	Vergleiche
z.B.	Zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Infektionen mit dem *Bovinen Alphaherpesvirus 2* (BoHV-2) sind bei Rindern weltweit beschrieben. In gemäßigten Klimazonen werden sie primär mit dem Krankheitsbild der Bovinen Herpesmammillitis (BHM), einer vesikulären bis ulzerativen Hauterkrankung des Euters von Milchkühen, assoziiert. Ob BoHV-2-Infektionen auch in Deutschland klinisch eine große Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt. Allerdings steht die Präsenz von BoHV-2-spezifischen Antikörpern in Rinderseren statistisch in Zusammenhang mit unspezifischen, aber reproduzierbaren Reaktionen in BoHV-1 (*Bovines Alphaherpesvirus 1*) - ELISAs. Die Ursache ist bislang noch nicht geklärt, eine klare Kreuzreaktivität besteht jedoch nicht. Diese „nicht-negativen“ BoHV-1-Reaktionen fallen im Rahmen der Überwachung der BoHV-1-Freiheit auf. Zur Aufrechterhaltung des Status gemäß Artikel 10 der Richtlinie 64/432/EWG werden im Freistaat Bayern Rinder regelmäßig auf BoHV-1-Antikörper untersucht und nicht-negative Reaktionen gehäuft im Südwesten Bayerns beobachtet. Problematisch ist, dass in jedem Fall eine mögliche BoHV-1-Infektion ausgeschlossen werden muss und daraus nicht nur ein zusätzlicher Zeit- und Kostenaufwand resultiert, sondern dass es sogar zur einstweiligen Sperrung der betroffenen Betriebe kommen kann. Informationen über das BoHV-2-Infektionsgeschehen in der bayerischen Rinderpopulation sowie über grundlegende epidemiologische und genetische Eigenschaften von BoHV-2 fehlen, sind aber wichtige Voraussetzung für ein Verständnis und eine Vermeidung der nicht-negativen BoHV-1-Reaktionen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher einen Überblick über zirkulierende BoHV-2-Infektionen in Bayern zu erhalten. Neben einer Schätzung der BoHV-2-Seroprävalenz sollte auch die Relation zu den nicht-negativen BoHV-1-Reaktionen beurteilt werden. Zur Identifikation von akuten oder latenten BoHV-2-Infektionen sollten Proben von Rindern mit ausgewählter klinischer Symptomatik auf BoHV-2-Genom untersucht werden. Zudem sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass Rotwild oder andere, nicht-bovine Wiederkäuer als Reservoirwirte für BoHV-2 in den besonders betroffenen südbayerischen Regionen dienen könnten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Bovine Alphaherpesvirus 2 (BoHV-2)

1.1. Taxonomie und Morphologie des BoHV-2

Die Familie der *Herpesviridae*, welche zusammen mit den *Alloherpesviridae* und den *Malacoherpesviridae* zur Ordnung der *Herpesvirales* gehört (ANONYMUS, 2018), umfasst die drei Unterfamilien *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae*. Mitglieder dieser Unterfamilien unterscheiden sich in ihren biologischen und genetischen Eigenschaften voneinander (BARTHOLD et al., 2011a). Das *Bovine Alphaherpesvirus 2* (BoHV-2) wurde ursprünglich auch als Bovines Herpesvirus 2, Bovines Mammillitis Virus, Allertonvirus oder Pseudo Lumpy Skin Disease Virus bezeichnet. Es wird, wie auch die Bovinen Alphaherpesviren 1 und 5 (BoHV-1, BoHV-5), den Alphaherpesviren zugeordnet (ANONYMUS, 2018). Während BoHV-1 und -5 jedoch dem Genus *Varicellovirus* angehören, ist BoHV-2 ein *Simplexvirus* und sowohl genetisch als auch antigenetisch enger verwandt mit den *Humanen Alphaherpesviren 1* und *2* (Herpes Simplex Viren 1 und 2) als mit BoHV-1 (STERZ et al., 1974; HAMMERSCHMIDT et al., 1988; SHEPPARD und MAY, 1989; EHLERS et al., 1999b). Ein Vergleich des Gesamtgenoms ist jedoch zum derzeitigen Stand nicht möglich, da noch keine vollständige Sequenz des BoHV-2-Genoms veröffentlicht ist.

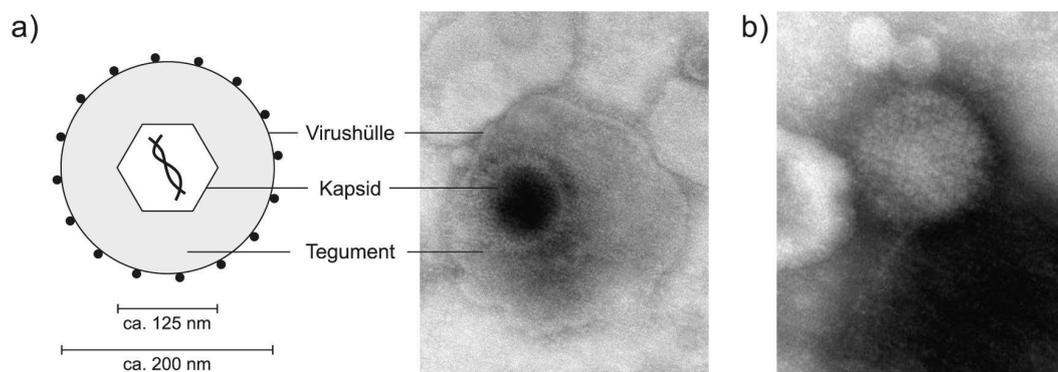


Abbildung 1: (a) Vergleichende Darstellung eines BoHV-2-Virions schematisch und im Elektronenmikroskop (b) Elektronenmikroskopische Struktur eines BoHV-2-Kapsids

Herpesviren sind behüllte Viren, deren Genom als doppelsträngige, lineare DNA vorliegt. Es wird in Form eines sogenannten „Core“ von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen (BARTHOLD et al., 2011a; siehe Abb. 1). Das Kapsid ist aus 162 Kapsomeren zusammengesetzt und wird nach außen vom Tegument und von einer Lipiddoppelmembran, in welche Glykoproteine in Form sogenannter „Spikes“ eingelagert sind, umgeben (BARTHOLD et al., 2011a).

Das Genom von BoHV-2 besteht aus zwei singulären, kovalent verbundenen DNA-Sequenzen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge als „U_L“ (Unique long-Region) und „U_S“ (Unique short-Region) bezeichnet werden (Abb. 2) (BUCHMAN und ROIZMAN, 1978a). An den Enden beider Regionen sind jeweils kurze, sich wiederholende Sequenzen, die sogenannten „Repeats“ zu finden, die sowohl die gesamte genomische DNA an den Rändern („Terminal Repeats“, TR) als auch die U_L- und U_S-Region voneinander („Internal Repeats“, IR) abgrenzen (BUCHMAN und ROIZMAN, 1978b; BARTHOLD et al., 2011a). Die TR und IR der jeweiligen Region liegen in gegensinniger Orientierung zueinander vor (BUCHMAN und ROIZMAN, 1978b). Die Replikation der dazugehörigen U_L- und U_S-Region kann ebenfalls in beide Richtungen erfolgen, sodass in Abhängigkeit der Ausrichtung beider Regionen zueinander vier verschiedene Isomere des Genoms entstehen (BUCHMAN und ROIZMAN, 1978a).

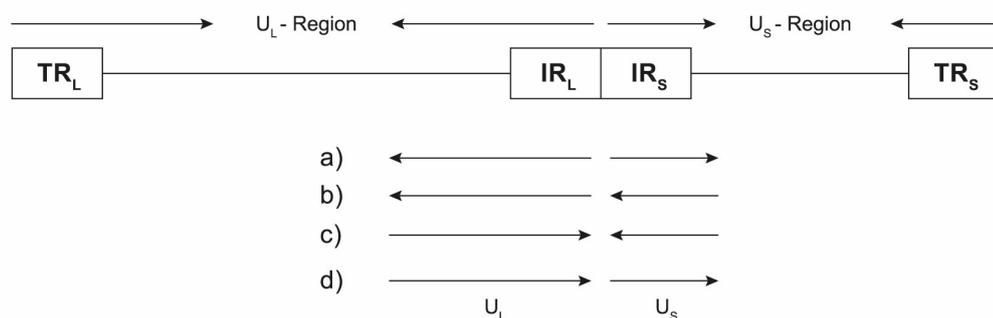


Abbildung 2: Schematische Darstellung des BoHV-2-Genoms. Die Pfeile im oberen Bereich der Abbildung entsprechen der Orientierung der Terminal (TR) und Internal Repeats (IR) zueinander. Entsprechend der Replikationsrichtung der U_L- und U_S-Region können vier verschiedene Isomere des BoHV-2-Genoms entstehen (a, b, c, d)

Die vollständige Sequenz des BoHV-2-Gesamtgenoms steht bisher noch nicht zur Verfügung, jedoch einige Teilsequenzen. In Tabelle 1 sind Informationen zu den veröffentlichten Sequenzen zusammengefasst. Die Bezeichnung „UL“ bzw. „US“ erfolgte in Analogie zur Nomenklatur der Gene des *Humanen Alphaherpesvirus 1*-Genoms und spiegelt dort die Lokalisation der jeweiligen Sequenz im Gesamtgenom wider. Einige der aufgeführten Sequenzen (*) wurden als Basis für BoHV-2-spezifische, konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Protokolle zu Grunde gelegt (siehe Kapitel II.3.2).

Tabelle 1: Überblick über ausgewählte, publizierte Teilsequenzen des BoHV-2-Genoms

Bekannte Teilsequenz des BoHV-2-Genoms	Literatur (Sequenzbestimmung)	Bezeichnung und Herkunft des verwendeten BoHV-2-Stammes	Literatur (Isolat)
DNA-Polymerase* (UL30)	EHLERS et al. (1999b)	BMV, nicht bekannt	BUCHMAN und ROIZMAN (1978a)
Glykoprotein G (US4)	EHLERS et al. (1999b)	NY-1, USA	WEAVER et al. (1972)
Glykoprotein B* (UL27)	HAMMERSCHMIDT et al. (1988)	BMV, nicht bekannt	BUCHMAN und ROIZMAN (1978a)
Major DNA binding protein* (infected-cell protein (ICP) 8; UL29)	HAMMERSCHMIDT et al. (1988)	BMV, nicht bekannt	BUCHMAN und ROIZMAN (1978a)
ICP 18.5 (UL28)	HAMMERSCHMIDT et al. (1988)	BMV, nicht bekannt	BUCHMAN und ROIZMAN (1978a)
Thymidin Kinase (UL23)	SHEPPARD und MAY (1989)	BHM-1, Australien	MARAGOS et al. (1986)
UL24	JELIC und MAY (2003)	554, Australien	TURNER et al. (1976b), TURNER et al. (1976a)
Glykoprotein H* (UL22)	MAY (2001)	BHM-1, Australien	MARAGOS et al. (1986)

*Diese Sequenzinformationen wurden zur Entwicklung von BoHV-2-spezifischen, konventionellen PCR-Protokollen herangezogen. Genprodukte sind in Analogie zur humanmedizinischen Alphaherpesvirus 1-Nomenklatur bezeichnet.

1.2. Klinische Symptomatik der BoHV-2-Infektionen

BoHV-2-Infektionen werden in der Literatur mit zwei Krankheitsbildern assoziiert: mit der Pseudo Lumpy Skin Disease (PLSD) und mit der Bovinen Herpesmammillitis (BHM; auch: Bovine ulzerative Mammillitis) (MARKEY et

al., 2013b). Das Virus wurde erstmals in Südafrika im Rahmen von Untersuchungen zur Lumpy Skin Disease (LSD) aus LSD-ähnlichen Hautläsionen isoliert (ALEXANDER et al., 1957). Die LSD selbst wird durch ein Virus aus der Familie *Poxviridae*, das Lumpy Skin Disease Virus, (Subfamilie *Chordopoxvirinae*, Genus *Capripoxvirus*) verursacht (ANONYMUS, 2018). Das durch BoHV-2 verursachte Krankheitsbild der PLSD äußert sich, ebenso wie die LSD, in einer generalisierten Bildung von Hautknoten und stellt somit eine wichtige Differentialdiagnose zur LSD dar. Die PLSD wird besonders in tropischen und subtropischen Regionen beobachtet (MARKEY et al., 2013b). Die BHM dagegen kommt weltweit in gemäßigten Klimazonen vor und ist eine ulzerative Erkrankung der Euter- und Zitzenhaut von Milchkühen (MARKEY et al., 2013b). Erste Berichte stammen aus den 1960er-Jahren und beschreiben zahlreiche BHM-Krankheitsausbrüche in Milchviehbetrieben in Schottland und England (MARTIN et al., 1964; DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; PEPPER et al., 1966). Das BoHV-2 wurde als Erreger der BHM identifiziert, nachdem es aus den Hautläsionen klinisch erkrankter Tiere isoliert wurde (MARTIN et al., 1964; DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; PEPPER et al., 1966). Klinisch gesunde Rinder, die mit dem jeweiligen Isolat infiziert wurden, entwickelten BHM-typische Läsionen, aus welchen dann die Reisolierung von Virus mit identischen Eigenschaften gelang (MARTIN et al., 1964; DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966b). Die Verwandtschaft zu dem durch ALEXANDER et al. (1957) beschriebenen, südafrikanischen Virus wurde anhand des Wachstumsverhaltens *in-vitro* und anhand von Kreuz-Neutralisationstests festgestellt (MARTIN et al., 1966b; MARTIN et al., 1966a).

Die BHM wird als eine ulzerative Entzündung der Zitzen- und Euterhaut von Milchkühen beschrieben, die zunächst mit einer Schwellung, Rötung oder andersartigen Verfärbung betroffener Hautreale und der Bildung von Vesikeln oder Plaques beginnt (MARTIN et al., 1964; DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; LETCHWORTH und LADUE, 1982; JANETT et al., 2000; TAVELLA, 2016). Virushaltige Flüssigkeit tritt nach Aufplatzen der Vesikel aus und es entstehen erosive bis ulzerative oder nekrotische Läsionen (MARTIN et al., 1964; DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; LETCHWORTH und LADUE, 1982; TAVELLA, 2016). Die Veränderungen heilen unter Bildung

von Schorf, Krusten oder Granulationsgewebe in der Regel komplikationslos innerhalb einiger Tage bis Wochen ab (MARTIN et al., 1964; MARTIN et al., 1966a; PEPPER et al., 1966; JANETT et al., 2000; TAVELLA, 2016). Form und Ausprägung der Läsionen variieren von kleineren, rundlichen und gut abgrenzbaren Veränderungen, bis hin zu größeren, konfluierenden (DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; LETCHWORTH und LADUE, 1982). Läsionen können die Haut des gesamten Euters mitsamt der Zitzen betreffen oder ausschließlich auf die Euter- oder Zitzenhaut beschränkt sein (DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; JANETT et al., 2000; TAVELLA, 2016). Nicht alle klinisch erkrankten Tiere zeigen sämtliche der genannten Symptome und auch die Ausprägung und der Schweregrad sind von Tier zu Tier unterschiedlich. Kühe in der ersten Zeit nach dem Abkalben und solche mit Euterödem sind stärker betroffen als andere (DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; LETCHWORTH und LADUE, 1982; JANETT et al., 2000). Sofern keine Komplikationen auftreten, bleibt das Allgemeinbefinden der Rinder in der Regel ungestört (MARTIN et al., 1966a). Es wird allerdings von schwerwiegenderen und atypischen Krankheitsverläufen berichtet (KEMP et al., 2008; WATANABE et al., 2017). Mastitiden, reduzierte Melkbarkeit und Milchleistungsabfall stellen wichtige, sich gegenseitig beeinflussende Komplikationen dar, welche zu wirtschaftlichen Einbußen und in schlimmeren Fällen zur Notwendigkeit der Tötung betroffener Tiere führen können (MARTIN et al., 1966a; PEPPER et al., 1966; LETCHWORTH und LADUE, 1982; JANETT et al., 2000).

Dass die klinische Symptomatik nicht auf das Euter von laktierenden Kühen beschränkt ist, zeigen Berichte über vergleichbare Läsionen im Bereich des Flotzmauls (DEAS und JOHNSTON, 1966; JOHNSTON et al., 1971; SCOTT und HOLLIMAN, 1984). Die Isolierung von BoHV-2 erfolgte zudem aus einer ulzerativen Zahnfleischveränderung eines Kalbes, die im Rahmen einer pathologischen Untersuchung auffiel (CASTRUCCI et al., 1972). Derartige Läsionen im Bereich des Flotzmauls können experimentell mittels intradermaler, intravenöser und oraler Applikation reproduziert werden (DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1969; GIBBS et al., 1973a; PROBERT und POVEY, 1975; MARTIN und SCOTT, 1979).

Durch eine BoHV-2-Infektion hervorgerufene Hautveränderungen können auch an anderen Körperregionen auftreten, wie zum Beispiel am Skrotum männlicher Kälber nach experimenteller okulo-nasaler Infektion (MARTIN und SCOTT, 1979). Bei einem anderen Krankheitsbild, entstehen zusätzlich zur BHM generalisierte Hautläsionen (JOHNSTON und DEAS, 1967). Auch diese Symptomatik ist durch experimentelle, intravenöse Infektion reproduzierbar (HAIG, 1967; MARTIN et al., 1969; CASTRUCCI et al., 1972; CASTRUCCI, 1975; PROBERT und POVEY, 1975; MARTIN und SCOTT, 1979; CASTRUCCI et al., 1982).

Weitere bemerkenswerte Ausbrüche fanden im US-amerikanischen Central Valley, Kalifornien in den Jahren 2005, 2012 und 2015 in verschiedenen Milchvieh- und Kälberaufzuchtbetrieben statt. Betroffene Tiere im Alter von ein bis vier Wochen entwickelten eine superfizielle Dermatitis im Kopfbereich, mit Haarausfall, Schuppen- und Krustenbildung ohne Juckreiz oder Fieber. Die Hautveränderungen waren im Bereich der Ohren und periokulär besonders ausgeprägt und heilten therapielos innerhalb von zwei bis vier Wochen ab. Mithilfe einer Realtime-PCR wurde BoHV-2-Genom in Krustenmaterial oder Gewebeproben nachgewiesen (WATANABE et al., 2017).

1.3. Latenz des BoHV-2

Eine wichtige Eigenschaft von Herpesviren ist, dass sie lebenslang in Form einer Latenz im Wirtsorganismus verbleiben (MARKEY et al., 2013b). Das Genom von Alphaherpesviren liegt in dieser Phase episomal in der Wirtszelle vor (BARTHOLD et al., 2011a). Es findet keine Bildung von Tochterviren durch aktive Replikation statt, jedoch kann das Episom im Rahmen der Wirtszellteilung repliziert werden (NATHANSON und GONZALEZ-SCARANO, 2007). Die virale Genexpression ist während der Latenz weitgehend auf die sogenannten „latency-associated transcripts“ (LATs) beschränkt, welche unter anderem die Zell-Apoptose verhindern (BARTHOLD et al., 2011a). Die latent infizierte Wirtszelle exprimiert keine viralen Proteine an der Zelloberfläche, wodurch das Virus vor den Mechanismen des wirtseigenen Immunsystems geschützt ist (NATHANSON und GONZALEZ-SCARANO, 2007). Die Reaktivierung der Infektion kann infolge verschiedener Stimuli ausgelöst werden, wie zum Beispiel durch Transportstress, Stallüberbelegung oder

anderweitige Immunsuppression, und zu einer erneuten Virusausscheidung, gegebenenfalls in Verbindung mit dem Wiederauftreten von Symptomen führen (BARTHOLD et al., 2011a). Eine Übertragung des Virus auf andere Wirte ist erst nach Reaktivierung der Infektion und Ausscheidung von Tochterviren wieder möglich (NATHANSON und GONZALEZ-SCARANO, 2007).

Die Latenz von BoHV-2 wurde in zahlreichen Studien untersucht, zum Beispiel durch die Autoren PROBERT und POVEY (1975), CASTRUCCI et al. (1980, 1982) und LETCHWORTH und CARMICHAEL (1982). Eine Reaktivierung wurde erstmals in einem Infektionsversuch von MARTIN und SCOTT (1979) gezeigt. Kälber wurden zunächst mit BoHV-2 infiziert und acht Wochen später, nach Abheilung der Läsionen, einer mehrtägigen Cortison-Behandlung unterzogen. Bei einem Teil der Tiere wurde BoHV-2 aus den wiederauftretenden Hautveränderungen isoliert (MARTIN und SCOTT, 1979). In einem ähnlich konzipierten Tierversuch wurde nach Dexamethasongabe ebenfalls ein Wiederauftreten der klinischen Läsionen bei allen Testkälbern beobachtet (CASTRUCCI et al., 1982). Die Reaktivierung einer auf natürlichem Wege entstandenen BoHV-2-Infektion wurde für eine Kuh einige Jahre später beschrieben. Das Tier bildete während der Reaktivierung keine Läsionen aus, die Isolierung des Virus erfolgte aus Vaginaltupfern (HOFMANN et al., 1987).

Bisher ist nicht geklärt welche Zellen als Ort der Latenz der BoHV-2 biologisch relevant sind. Für Alphaherpesviren sind sowohl lymphozytäre Zellen als auch Zellen des sensorischen Nervensystems beschrieben, während monozytäre Zellen für Betaherpesviren und Lymphozyten für Gammaherpesviren eine wesentliche Rolle spielen (MARKEY et al., 2013b). BoHV-2-Genom wurde in Trigeminalganglien von klinisch gesunden Rindern sowie in verschiedenen Lymphknoten von Schafen, Reh-, Rot-, Dam- und Muffelwild detektiert (KALMAN und EGYED, 2005; CAMPOS et al., 2014). Nach experimenteller Reaktivierung intravenös gesetzter BoHV-2-Infektionen erfolgte die Reisolierung von BoHV-2 nicht nur aus Nasentupfern, sondern auch aus Nervengewebe (Großhirn, Ganglion cervicale craniale, stellatum und trigeminale), aus makroskopisch intakter Haut und mesenterialen Lymphknoten. Das genannte Organmaterial wurde nach Tötung der Kälber

gewonnen (CASTRUCCI et al., 1982). Die epidemiologische Relevanz der beschriebenen Zellsysteme für die natürliche BoHV-2-Latenz ist jedoch noch nicht geklärt, da nicht bekannt ist, aus welchen Zellen eine Reaktivierung tatsächlich stattfindet und auf welchem Wege eine Virusausscheidung möglich ist.

1.4. Verbreitung der BoHV-2-Infektionen

Die Bovine Herpesmammillitis (BHM) wurde erstmals in Schottland beschrieben (MARTIN et al., 1964; MARTIN et al., 1966a). Es folgten Berichte von Krankheitsausbrüchen aus anderen Teilen Großbritanniens (DEAS und JOHNSTON, 1966; PEPPER et al., 1966; JOHNSTON et al., 1971; GIBBS et al., 1972) sowie aus Italien (CASTRUCCI et al., 1972; CASTRUCCI et al., 1974), den Vereinigten Staaten (LETCHWORTH und LADUE, 1982), der Schweiz (MÜLLER et al., 1984; JANETT et al., 2000), Kanada (MARTIN et al., 1987), Australien (TURNER et al., 1976a) und Japan (IMAI et al., 2002).

Die Anzahl der klinisch erkrankten Tiere pro Herde variiert sehr stark – sogar in akuten Ausbruchsgeschehen. PEPPER et al. (1966) berichten von einer durchschnittlichen Morbidität von 20-30% bei Ausbrüchen in Somerset, England, während in Ayrshire, Schottland, zwischen 18-96% der Milchkühe pro Betrieb betroffen waren (MARTIN et al., 1966a). In 17 Ausbruchsbetrieben in Südwales und Südengland erkrankten zwischen einem und 90% der Tiere (GIBBS et al., 1972). Im Zuge weiterer Ausbruchsgeschehen in Großbritannien lagen die jeweiligen Anteile an betroffenen Rindern ebenfalls innerhalb dieser Spanne (DEAS und JOHNSTON, 1966; RWEYEMAMU et al., 1969; JOHNSTON et al., 1971; SCOTT et al., 1984). In New York, waren in einem Fall 20 von 47 untersuchten Tieren klinisch krank, in einem weiteren Fall circa 50 von 100 Kühen (LETCHWORTH und LADUE, 1982). In Quebec, Kanada, wurde von Ausbrüchen in drei Betrieben mit jeweils 12-30% kranker Rinder berichtet (MARTIN et al., 1987). Der erste nachgewiesene Fall der BHM in der Schweiz betraf vier der 15 Milchkühe, in einem Ausbruch einige Jahre später lediglich sechs von 34 Kühen (MÜLLER et al., 1984; JANETT et al., 2000). Daten aus Südtirol, Italien, zeigen, dass in immunologisch naiven Herden bis zu 80% der Kühe eine klinische Symptomatik durchmachen, wohingegen die BHM in durchseuchten Betrieben eine Einzeltierkrankung darstellt (TAVELLA,

2016).

Um erste Informationen über die Häufigkeit von BoHV-2-Infektionen zu erhalten, wurden serologische Untersuchungen durchgeführt. In West England wurden 400 Serumproben von klinisch gesunden Rindern untersucht, die aus verschiedenen anderen Gründen an das Veterinary Investigation Center in Langford eingeschickt worden waren (RWEYEMAMU et al., 1969). In 19,5% dieser Proben wurden BoHV-2-Antikörper (Ak) nachgewiesen. Außerdem wurden Proben von 39 universitätseigenen Milchkühen getestet, sowie von weiteren 70 Tieren mit nicht BoHV-2-verursachten Zitzenläsionen (RWEYEMAMU et al., 1969). In 0% bzw. 5,7% der Proben wurden BoHV-2-Antikörper gefunden (RWEYEMAMU et al., 1969).

Die Untersuchung von im Jahr 1963 an italienischen Schlachthöfen gewonnenen Serumproben von 979 Rindern (CASTRUCCI et al., 1974) ergab eine Abhängigkeit der Seroprävalenz sowohl vom Alter der Tiere als auch von der Ursprungsregion. Denn in 12,57% (42 von 334) der von Kälbern unter sechs Monaten stammenden Seren, in 11,42% (33 von 289) der von Rindern zwischen sechs bis zwölf Monate stammenden Seren und 17,13% (61 von 356) der von Rindern über 12 Monate stammenden Seren wurden BoHV-2-Antikörper nachgewiesen (CASTRUCCI et al., 1974). Im Süden und im Zentrum Italiens wurden mit 17,4% (51 von 293) bzw. 17,1% (65 von 380) häufiger Antikörper nachgewiesen als in Norditalien (6,54%; 20 von 306) (CASTRUCCI et al., 1974). Von 1079 Seren, die im Jahr 1972 aus fünf italienischen Betrieben der Regionen Lombardei, Latium, Umbrien, Kampanien und Sizilien gewonnen wurden, reagierten insgesamt 8,25% im Serumneutralisationstest (SNT) (CASTRUCCI et al., 1974). In Latium waren 41,57% (74 von 178) der untersuchten Rinder BoHV-2-Ak positiv, in Sizilien 4,06% (5 von 123), in Kampanien 2,39% (9 von 377) und in der Lombardei 0,35% (1 von 289). Dagegen wurde in keinem der Seren aus Umbrien (0 von 112) neutralisierende Antikörper (nAk) nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den europäischen Daten sind BoHV-2 Infektionen in Afrika sehr weit verbreitet. Von 317 Seren, die 1973 an Schlachthöfen in Italienisch-Somaliland, einer ehemaligen italienischen Kolonie auf dem Gebiet des heutigen Somalia, gewonnen wurden enthielten 94,95% Antikörper gegen

BoHV-2 (CASTRUCCI et al., 1974). Ähnlich hohe BoHV-2-Seroprävalenzen wurden wenige Jahre zuvor in Regionen Tansanias, Kenias und Ugandas festgestellt (PLOWRIGHT und JESSETT, 1971). Untersuchte Seren stammten von Rindern aller Altersklassen. Die Seroprävalenz lag bei älteren Tieren deutlich höher als bei Jungtieren. Im Norden Tansanias waren beispielsweise 73,4% der Kälber bis sechs Monate BoHV-2-Antikörper positiv, wohingegen in der Altersklasse ab vier Jahren 98,9% der Rinder betroffen waren (PLOWRIGHT und JESSETT, 1971). In Kenia waren in verschiedenen Regionen zwischen 60,1% und 72,7% der Rinder BoHV-2-Antikörper positiv, aber auch serologisch negative Herden wurden detektiert (PLOWRIGHT und JESSETT, 1971).

Serologisch wurden in der Schweiz BoHV-2-Infektionen bereits vor dem ersten, durch MÜLLER et al. (1984) veröffentlichten, klinischen BHM-Fall diagnostiziert (ENGELS et al., 1979). In 6,4% der 408 Proben aus 30 Betrieben mit Euterpocken-Problematik wurden BoHV-2-spezifische Antikörper nachgewiesen, wobei die betroffenen Rinder aus neun der 30 beprobten Betriebe stammten (ENGELS et al., 1979). Von 1413 in Schlachthöfen entnommenen Proben waren 7,7% BoHV-2-Antikörper positiv, wieder waren deutliche regionale Unterschiede zu erkennen. Der Prozentsatz betroffener Tiere war im Süden der Schweiz mit 19,1% am höchsten, gefolgt von 6,98% im Osten und lediglich 1,25% im Westen (ENGELS et al., 1979).

Nicht nur in der Schweiz, sondern auch in den Niederlanden und in Belgien wurden BoHV-2-Antikörper nachgewiesen, ohne dass klinische BHM-Ausbrüche publiziert waren (SCOTT et al., 1978; PASTORET et al., 1983). SCOTT et al. (1978) untersuchten 576 Seren niederländischer Rinder, die aus zwölf Betrieben der Provinz Friesland stammten. 217 dieser Seren (37,7%) aus zehn der zwölf Betriebe wurden als BoHV-2-Antikörper positiv eingestuft (SCOTT et al., 1978). In Belgien waren 27,5% der 284 untersuchten Serumproben serologisch BoHV-2-positiv, die Seren stammten aus 30 Betrieben der Provinzen Marche-en-Famenne und Luxemburg (PASTORET et al., 1983).

In der Literatur sind bislang ebenfalls keine Berichte über klinische BoHV-2-Infektionen in Deutschland zu finden. BÖTTCHER et al. (2012) wiesen jedoch

BoHV-2-spezifische Ak in Seren von Rindern aus Milchviehbetrieben im Südwesten Bayerns nach. 35,4% der untersuchten Seren aus Beständen, die im Rahmen der staatlichen BoHV-1-Bekämpfung durch unspezifische Reaktionen ungeklärter Ursache in BoHV-1-Ak-Nachweissystemen aufgefallen waren, reagierten im BoHV-2-spezifischen SNT. In serologisch BoHV-1-unauffälligen Betrieben derselben Region waren es dagegen nur 12,5% (BÖTTCHER et al., 2012). In den untersuchten Rinderbeständen im Norden und Osten Bayerns wurden darüber hinaus keine BoHV-2-Antikörper nachgewiesen (BÖTTCHER et al., 2012).

Auch in Südtirol, Italien, reagierten Tankmilchproben im BoHV-1-Ak-spezifischen ELISA, ohne dass eine epidemiologische Verbindung zu BoHV-1-Infektionen hergestellt werden konnte. Im Jahr 2014 waren dies 43 von insgesamt 4900 untersuchten Proben (TAVELLA, 2016). 40 dieser 43 Tankmilchproben reagierten zusätzlich im BoHV-2-Ak-ELISA. In 37,6% aller 383 Rinderseren aus den 43 betroffenen Betrieben wurden im Anschluss BoHV-2-spezifische Ak nachgewiesen (TAVELLA, 2016). Im Vergleich dazu wurden in 20 BoHV-1-Serologie-unauffälligen Betrieben nur bei 16,11% der 211 Rinder BoHV-2-Ak gefunden (TAVELLA, 2016).

1.5. BoHV-2-Infektionen bei kleinen und Wildwiederkäuern

Klinische BoHV-2-Infektionen werden bisher ausschließlich beim Hausrind beschrieben (siehe Kapitel II.1.2). BoHV-2-Genom wurde jedoch auch in Organen anderer Wiederkäuerspezies detektiert, nämlich in den Lymphknoten von klinisch gesundem Rot-, Reh- und Damwild, sowie bei Mufflons und Hausschafen in Ungarn. Der Genom-Nachweis erfolgte in 4,5% (3 von 66; Rotwild), 7,1% (4 von 56; Rehwild), 5,0% (1 von 20; Damwild), 50,0% (8 von 16; Muffelwild) und 2,9% (1 von 34; Hausschaf) der untersuchten Tiere (KALMAN und EGYED, 2005).

Serologische Untersuchungen zum Nachweis von BoHV-2-spezifischen Ak bei Wildwiederkäuern wurden in den Jahren 1982 bis 1986 in Frankreich und Belgien durchgeführt (THIRY et al., 1988). Der Prozentsatz Ak positiver Tiere lag bei Rehwild in Frankreich bei weniger als 1% (2 von 387) und bei Gämsen bei circa 1% (1 von 99). In Proben von Rehwild und Gämsen in Belgien sowie von Rotwild, Muffelwild und Steinböcken beider Länder wurden keine Ak

gegen BoHV-2 nachgewiesen (THIRY et al., 1988). In Serumproben verschiedener Wildtier-Spezies aus den ostafrikanischen Ländern Uganda, Tansania und Kenya waren BoHV-2-spezifische Ak detektierbar (PLOWRIGHT und JESSETT, 1971). Besonders Büffel fielen durch einen hohen Anteil auf. Unter den Proben von 16 weiteren Ungulaten-Spezies wurden in denen von Giraffen, Flusspferden und verschiedenen Antilopenarten ebenfalls BoHV-2 spezifische Ak nachgewiesen (PLOWRIGHT und JESSETT, 1971).

BoHV-2-Infektionen können bei Büffeln unter anderem ulzerative bis nekrotische Schleimhautveränderungen im gesamten oberen Digestionstrakt einschließlich der Speiseröhre und des Pansens hervorrufen (PLOWRIGHT und JESSETT, 1971). Ob eine BoHV-2-Infektion auch bei anderen Spezies, außer dem Hausrind, unter natürlichen Bedingungen zu klinischer Symptomatik führt, ist noch unklar. Experimentell wurde gezeigt, dass BoHV-2-Infektionen sowohl bei Schafen, als auch bei Schweinen, Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und Hasen Hautläsionen verursachen können (DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966b; PEPPER et al., 1966; PROBERT und POVEY, 1975; TORRES et al., 2009; TORRES et al., 2010). Auf den Menschen ist das Virus nicht übertragbar (PEPPER et al., 1966).

1.6. Übertragung von BoHV-2-Infektionen

Die Pathogenese von BoHV-2-Infektionen ist noch ungeklärt, jedoch führen BoHV-2-Infektionen, wie in Kapitel 1.2 dargestellt, zu unterschiedlich ausgeprägten Krankheitsbildern. Hauptsächlich wird von Hautveränderungen berichtet, die lokal auf die Euter- und Zitzenhaut oder den Bereich des Flotzmauls beschränkt sind (zum Beispiel DEAS und JOHNSTON (1966); MARTIN et al. (1966a); JOHNSTON et al. (1971)). Jedoch gibt es auch Infektionsverläufe mit über den Körper verteilten Läsionen (JOHNSTON und DEAS, 1967). In Infektionsversuchen wurde gezeigt, dass unterschiedliche Infektionswege die klinische Symptomatik beeinflussen. So entstehen nach intradermaler Infektion lokale Hautveränderungen an der Injektionsstelle, wohingegen Tiere nach intravenöser Infektion Veränderungen am ganzen Körper entwickeln können (HAIG, 1967; MARTIN et al., 1969; CASTRUCCI et al., 1972; CASTRUCCI, 1975; PROBERT und POVEY, 1975; MARTIN und SCOTT, 1979; CASTRUCCI et al., 1982).

Auf welchen Wegen die natürliche BoHV-2-Infektion zwischen den Tieren einer Herde und zwischen verschiedenen Betrieben übertragen wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Für die Übertragung von Tier zu Tier wird die indirekte Übertragung während des Melkvorgangs (DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; MARTIN et al., 1969) und die Vektorübertragung durch Insekten diskutiert (PEPPER et al., 1966; RWEYEMAMU et al., 1969; GIBBS et al., 1972; GIBBS et al., 1973b; GIBBS et al., 1973a). In Mutterkuhherden wurde zudem beobachtet, dass Kälber von klinisch BHM-erkrankten Mutterkühen vergleichbare Läsionen am Flotzmaul entwickeln können (JOHNSTON et al., 1971; SCOTT und HOLLIMAN, 1984). Daraus lässt sich schließen, dass auch die direkte Kontaktinfektion eine Rolle spielt. Möglichkeiten für einen Eintrag von BoHV-2-Infektionen in eine Herde stellen die mechanische Übertragung durch Insekten (PEPPER et al., 1966; RWEYEMAMU et al., 1969; GIBBS et al., 1972; GIBBS et al., 1973b; GIBBS et al., 1973a) oder auch der Zukauf latent infizierter Tiere dar (RWEYEMAMU et al., 1969; MARTIN und SCOTT, 1979; CASTRUCCI et al., 1982; HOFMANN et al., 1987; JANETT et al., 2000).

Die typischerweise aus BHM-Läsionen austretende, seröse Flüssigkeit weist besonders in den ersten Tagen der klinischen Symptomatik eine hohe Infektiosität auf. Infektiöses Virus kann dann über die Melkbecher der Melkmaschine auf die Zitzenhaut einer empfänglichen Kuh übertragen werden (MARTIN et al., 1969). Es wurde gezeigt, dass unter experimentellen Bedingungen infektiöses Virus bis zu fünf Tage lang aus Melkbechern isoliert werden kann (GIBBS et al., 1973a). Die Tatsache, dass vor allem laktierende oder kürzlich trockengestellte Milchkühe eine typische BHM-Symptomatik entwickeln, unterstützt die Theorie der Rolle des Melkaktes bei der Übertragung von BoHV-2 (MARTIN et al., 1966a; MARTIN et al., 1969; JANETT et al., 2000). Zudem wurde beobachtet, dass die Ausbreitung einer BoHV-2-Infektion innerhalb eines Betriebes langsamer vonstattengeht, wenn nicht erkrankte Kühe vor klinisch erkrankten Kühen gemolken werden (DEAS und JOHNSTON, 1966). Infektionsversuche zeigen allerdings, dass sowohl am Euter als auch am Flotzmaul intakte oder nur oberflächlich beschädigte Haut einen wirkungsvollen Schutz gegen eine BoHV-2-Infektion darstellt, und dass für eine Ansteckung eine mechanische Vorschädigung mit ausreichender Tiefe

erforderlich ist (MARTIN et al., 1969; GIBBS et al., 1973a).

Als weitere mechanische Vektoren werden daher auch stechende oder beißende Insekten diskutiert, die infektiöse Viruspartikel von den Läsionen des einen Tieres in bzw. unter die Haut des anderen inokulieren (PEPPER et al., 1966; RWEYEMAMU et al., 1969; GIBBS et al., 1972; GIBBS et al., 1973b; GIBBS et al., 1973a). Die Beobachtung, dass die BHM innerhalb kurzer Zeit in mehreren Betrieben ausbrach, die in räumlicher Nähe zueinander lagen, wobei auch geschlossene Betriebe nicht verschont blieben (MARTIN et al., 1966a), wurde als Hinweis auf diesen Übertragungsweg gewertet. Untersuchungen mehrerer BHM-Ausbrüche, die innerhalb eines begrenzten Zeitraumes stattfanden, ergaben zudem, dass häufig in der Umgebung betroffener Bestände mögliche Insektenhabitate wie Flusstäler lagen und dass die Ausbreitung zwischen den Betrieben entlang der Hauptwindrichtung erfolgte (GIBBS et al., 1972). In Jahren, in welchen die klimatischen Konditionen günstig für die Entwicklung von Insektenpopulationen waren, wurden darüber hinaus häufiger Ausbrüche verzeichnet, als in klimatisch ungünstigeren Jahren (GIBBS et al., 1972).

Für Infektionsversuche wurde der gemeine Wadenstecher (*Stomoxys calcitrans L.*) als möglicher Vektor verwendet, da er ubiquitär vorkommt und in der Lage ist, die Haut bis zur notwendigen Tiefe zu durchdringen (GIBBS et al., 1973b; GIBBS et al., 1973a). Die Reisolierung von infektiösem Virus aus experimentell mit BoHV-2 infizierten Fliegen ist bis maximal 24 Stunden nach Infektion möglich (GIBBS et al., 1973a). Die Übertragung von BoHV-2 auf Zellkulturmedium durch infizierte Fliegen erfolgte in neun von zehn Fällen noch eine halbe Stunde nach Infektion. Eine Übertragung der Infektion von experimentell infizierten Fliegen auf empfängliche Kühe ist im Rahmen der beschriebenen Experimente allerdings nicht geglückt (GIBBS et al., 1973a).

Weitere Ausscheidungswege sind beschrieben, deren Relevanz für die Übertragung von BoHV-2 noch nicht geklärt ist. Die Isolierung von BoHV-2 erfolgte aus Nasentupfern von Kälbern, die zuvor intravenös oder intradermal in Brust- und Bauchwand infiziert worden waren (CASTRUCCI, 1975; CASTRUCCI et al., 1982). Auch nach experimenteller Reaktivierung der Infektionen durch die intravenöse Gabe von Dexamethason wurde BoHV-2 aus

Nasentupfern isoliert (CASTRUCCI et al., 1982). Schließlich wurde aus Vaginaltupfern einer Kuh Virus isoliert, nachdem diese einer fünftägigen Dexamethasonbehandlung unterzogen worden war (HOFMANN et al., 1987). Das Tier zeigte keine BHM-typischen Läsionen, Konjunktival- und Nasentupfer waren in diesem Fall negativ.

2. Problematik unspezifischer Reaktionen in BoHV-1 (*Bovines Alphaherpesvirus 1*)-Antikörper-ELISAs

Der Begriff der „nicht-negativen Reaktionen“ ist ein Kunstbegriff, der im Rahmen der staatlichen Überwachung der BoHV-1-Freiheit in Bayern geprägt wurde (BÖTTCHER et al., 2012). Er umschreibt Reaktionen von Tankmilch- oder Serumproben in BoHV-1-Ak-spezifischen ELISA-Systemen, die letztendlich nicht auf die Anwesenheit von BoHV-1-spezifischen Ak zurückzuführen sind (BÖTTCHER et al., 2012).

Für den Nachweis von BoHV-1-Ak sind in Deutschland mehrere kommerziell erhältliche ELISA-Kits zugelassen und in der „Liste der nach §11 Abs. 2 TierGesG zugelassenen Mittel“ aufgeführt (ANONYMUS, 2019). Der indirekte Vollvirus-ELISA, der im Folgenden als „Trachitest“ bezeichnet wird, wird als Screeningtest für blut- oder milchserologische Untersuchungen herangezogen und basiert auf der Detektion von Ak gegen verschiedene virale Strukturproteine. Zugelassen sind beispielsweise der „IDEXX Trachitest Serum Screening“ (IDEXX Europe B.V.) für Blutseren und der „IDEXX BHV1 Bulk Milk“ (IDEXX Europe B.V.) für Milchproben (ANONYMUS, 2019). Für den kompetitiven Nachweis von Antikörpern gegen das Oberflächenprotein Glykoprotein B (gB) stehen unter anderem der „IDEXX IBR gB X3“ (IDEXX Europe B.V.) oder der „Cattletype BHV1 gB Ab“ (Indical Bioscience) zur Verfügung (ANONYMUS, 2019). Ein kompetitiver Glykoprotein E (gE)-spezifischer Ak-ELISA (z.B. „IDEXX IBR gE“ der Firma IDEXX Europe B.V.) ermöglicht primär die Unterscheidung von Tieren mit einer Feldvirus-Infektion von solchen, die mit einer Markervakzine (DIVA-Impfstoff) geimpft wurden (ANONYMUS, 2016a). Gemäß der aktuellen Version der BHV-1-Verordnung ist ein negatives Ergebnis im gE-spezifischen Antikörper-ELISA unter anderem maßgeblich für den Ausschluss einer BoHV-1-Infektion

(ANONYMUS, 2016b).

Proben mit „nicht-negativen Reaktionen“ reagieren im Trachitest und im gB-ELISA, im hoch spezifischen, aber weniger sensitiven gE-ELISA sind keine Reaktionen detektierbar. Es resultieren folglich dieselben Ergebnisse, wie sie nach einer Impfung mit einem Markerimpfstoff entstünden. Die Anwesenheit BoHV-1-geimpfter Rinder ist in Bayern allerdings nicht mehr zu erwarten, da Impfungen gegen BoHV-1-Infektionen gemäß BHV-1-Verordnung in anerkannt BoHV-1-freien Gebieten nicht erlaubt sind (ANONYMUS, 2016b). Die Listung als „frei von der infektiösen bovinen Rhinotracheitis“ (ANONYMUS, 2011) gemäß Artikel 10 der Richtlinie 64/432/EWG (ANONYMUS, 1964) erfolgte für ganz Bayern im Jahr 2011, nachdem dies für einzelne Bayerische Regierungsbezirke bereits in den Jahren 2007 und 2010 geschehen war.

In der Studie von BÖTTCHER et al. (2012) wurde das Auftreten von nicht-negativen Reaktionen in Bayern erstmals in Zahlen gefasst, basierend auf den Untersuchungen von über 240.000 Tankmilchproben aus den Jahren 2008 und 2010. Im südbayerischen Regierungsbezirk Schwaben reagierten 1,83% der untersuchten Tankmilchproben nicht-negativ, wohingegen dies in nur bei 0,44% der Proben der restlichen sechs Regierungsbezirke (Unterfranken, Mittelfranken, Oberfranken, Oberpfalz, Oberbayern, Niederbayern) der Fall war (BÖTTCHER et al., 2012). Die Hypothese, dass Kreuzreaktionen mit einem oder mehreren anderen Herpesviren für das Auftreten nicht-negativer Reaktionen verantwortlich sein könnten, wurde überprüft (BÖTTCHER et al., 2012). Acht Betriebe wurden für Voruntersuchungen anhand der Ergebnisse der serologischen BoHV-1-Untersuchungen unterschiedlichen Gruppen zugeordnet: nicht-negativ (n=3), BoHV-1-negativ (n=4) und BoHV-1-positiv (n=1). Die Untersuchung von insgesamt 451 Rinderseren aus diesen acht Betrieben mittels γ -Interferontest ergab ausschließlich in Beständen mit nicht-negativen Reaktionen in 23% der Blutproben starke Reaktionen gegenüber BoHV-2-Antigen (BÖTTCHER et al., 2012). Neben BoHV-2 wurden das *Bovine Gammaherpesvirus 4* (BoHV-4; Familie *Herpesviridae*, Subfamilie *Gammaherpesvirinae*, Genus *Rhadinovirus*), das *Equid Alphaherpesvirus 1* (EHV-1; Familie *Herpesviridae*, Subfamilie *Alphaherpesvirinae*, Genus

Varicellovirus), das *Caprine Alphaherpesvirus 1* (CpHV-1; Familie *Herpesviridae*, Subfamilie *Alphaherpesvirinae*, Genus *Varicellovirus*) und das *Felid Alphaherpesvirus 1* (FeHV-1; Familie *Herpesviridae*, Subfamilie *Alphaherpesvirinae*, Genus *Varicellovirus*) in Betracht gezogen (BÖTTCHER et al., 2012). In derselben Studie wurde dann eine größere Auswahl an Seren aus Betrieben, die entsprechend des BoHV-1-Testergebnisses der Einzelproben und ihrer regionalen Herkunft in vier Gruppen eingeteilt waren, im SNT auf nAk gegen BoHV-2 untersucht. Aus 19 Betrieben mit nicht-negativen Reaktionen ($n_{\text{Proben}}=734$) reagierten 35,4% der Seren im BoHV-2-SNT, aus 23 BoHV-1-negativen Betrieben derselben Region waren es 12,5% ($n_{\text{Proben}}=321$) und aus zwei Betrieben, in welchen kürzlich zuvor BoHV-1-Infektionen festgestellt worden waren, waren es 0,4% ($n_{\text{Proben}}=164$). Die vierte Gruppe umfasste Seren aus 11 BoHV-1-unauffälligen Betrieben aus Regierungsbezirken, die zum damaligen Zeitpunkt bereits als BoHV-1-frei gemäß Artikel 10 der Richtlinie 64/432/EWG gelistet waren. Hier wurden in keinem der Seren nAk gegen BoHV-2 nachgewiesen ($n_{\text{Proben}}=423$) (BÖTTCHER et al., 2012).

Die Problematik der nicht-negativen Reaktionen ist nicht nur in Bayern bekannt. In Südtirol, Italien, reagierten 34 von 4900 Tankmilchproben (0,88%) im Jahr 2014 und 46 von 4712 Tankmilchproben (1,36%) im Jahr 2015 nicht-negativ (TAVELLA, 2016). Alle 383 Rinder der 43 Betriebe, die im Jahr 2014 betroffen waren, wurden daraufhin mittels BoHV-2-spezifischem ELISA untersucht. 37,6% der Rinder, die aus 40 verschiedenen Betrieben stammten, hatten BoHV-2-Ak gebildet. Auch in Österreich wurde eine derartige Problematik beschrieben (SCHIEFER, 2016) und bereits ca. 30 Jahre zuvor wurde in einem Einzelfall in der Schweiz bei einer Kuh mit fraglicher BoHV-1-Serologie eine BoHV-2-Infektion festgestellt (HOFMANN et al., 1987).

Trotz des beschriebenen, statistischen Zusammenhangs ist die Ursache für das Auftreten von nicht-negativen Reaktionen noch unbekannt. Welche konkrete Rolle die Präsenz von BoHV-2-spezifischen Ak bei der Entstehung nicht-negativer Reaktionen spielt, ist ebenfalls noch nicht geklärt, da keine direkte serologische Kreuzreaktivität zwischen BoHV-1 und BoHV-2 besteht (STERZ et al., 1974; LEVINGS et al., 1984).

3. Nachweismethoden für BoHV-2-Infektionen

3.1. Serologische Nachweismethoden

Für den serologischen Nachweis von BoHV-2-Infektionen stehen aktuell sowohl SNT-Protokolle als auch ein kommerzieller ELISA zur Verfügung. Im SNT werden hoch spezifisch neutralisierende Antikörper (nAk) detektiert und quantifiziert (BARTHOLD et al., 2011b). Mithilfe des berechneten Titers an nAk kann für manche Infektionen auch deren schützende Wirkung *in-vivo* abgeschätzt werden (BARTHOLD et al., 2011b). nAk hindern das spezifische Virus an der Infektion der Wirtszelle (FLINT et al., 2009). Dies kann beispielsweise durch direkte Blockierung der Virion-Reptor-Interaktion oder durch indirekte sterische Effekte erfolgen, durch Aggregation von Virionen oder durch die Verhinderung von Strukturveränderungen des Virions, welche notwendig für den Eintritt in die Wirtszelle sind (FLINT et al., 2009).

Das Prinzip des SNTs basiert darauf, dass nAk im Testserum, die in Verdünnungsstufen mit dem spezifischen Virus inkubiert werden, die Infektion permissiver Zellen verhindern (BARTHOLD et al., 2011b). Das Viruswachstum wird, je nach Eigenschaften des jeweiligen Virus, direkt über den cytopathischen Effekt (cpE) oder nach Immunfärbung sichtbar gemacht (BARTHOLD et al., 2011b). Der Titer ist definiert als reziproker Wert der letzten Serumverdünnungsstufe, in welcher eine vollständige Neutralisation der Infektion stattgefunden hat (BARTHOLD et al., 2011b). Vorteilhaft gegenüber anderen Nachweissystemen ist, dass die nachgewiesenen nAk hochspezifisch für das jeweilige Antigen sind und dass die Etablierung eines SNT nach erfolgter Virusanzucht relativ schnell erfolgen kann. Außerdem kann der SNT in der Regel tierartübergreifend eingesetzt werden (BARTHOLD et al., 2011b). Nachteile des SNT sind, dass dieser zeit- und kostenintensiv ist und nicht für die automatisierte Untersuchung von größeren Probenmengen taugt (BARTHOLD et al., 2011a).

Alphaherpesviren wachsen in geeigneten Zellkultur Systemen schnell und mit lytischem, unter dem Lichtmikroskop gut beurteilbaren cpE (BARTHOLD et al., 2011a; MARKEY et al., 2013a). Daher ist der SNT für den Nachweis von Antikörpern gegen Alphaherpesviren gut geeignet. In der Literatur werden

verschiedene BoHV-2-spezifische SNT-Protokolle beschrieben, die im Allgemeinen den Standardprotokollen für SNTs bei Alphaherpesviren entsprechen (MARTIN et al., 1966b; RWEYEMAMU und JOHNSON, 1968; MARTIN et al., 1969; ENGELS et al., 1979; LETCHWORTH und CARMICHAEL, 1982; JANETT et al., 2000).

Im Gegensatz zum SNT ist ein ELISA vergleichsweise schnell durchzuführen und für die gleichzeitige Untersuchung großer Probenmengen bis hin zu einer automatisierten Abarbeitung geeignet (BARTHOLD et al., 2011a). Während im SNT, wie oben beschrieben, ausschließlich neutralisierende Ak nachgewiesen werden, erfolgt die Detektion von Ak im ELISA unabhängig von deren Effektorfunktion (BARTHOLD et al., 2011b). Für den Nachweis von Ak gegen BoHV-2 in Blutserum oder Plasma ist in Deutschland seit einiger Zeit ein kommerzielles ELISA-Testkit, der „ID Screen® BHV-2 Indirect“ der Firma IDvet, erhältlich. Das indirekte Testsystem basiert auf der Bindung der Ak an die mit Antigen beschichtete Oberfläche der Mikrotiterplatte (MARKEY et al., 2013d). Als Antigen wird hierbei ein aufgereinigtes BoHV-2-Isolat aus Frankreich genutzt (MOUSSA et al., 1982). Die Validität des „ID Screen® BHV-2 Indirect“ (IDvet) wird sowohl durch firmeninterne als auch durch externe Untersuchungen bestätigt (IDvet: Internal validation report ID Screen® BHV-2 Indirect; erhältlich auf Nachfrage; GONANO et al. (2015)).

3.2. Virologische Nachweismethoden

Der Nachweis von BoHV-2-Infektionen erfolgte viele Jahre über die Virusisolierung (ALEXANDER et al., 1957; MARTIN et al., 1964; MARTIN et al., 1966a; PEPPER et al., 1966). Diese Methode gilt für einige Viren noch heute als Goldstandard der Diagnostik, jedoch muss für eine erfolgreiche Anzucht infektiöses Virus in der jeweiligen Probe vorhanden sein (BARTHOLD et al., 2011b). Problematisch für den Nachweis von BoHV-2-Infektionen ist, dass die Anzucht aus Biopsie-Material oder Wundflüssigkeit nur während der ersten sieben bis zehn Tage nach Auftreten sichtbarer Läsionen möglich ist (MARTIN et al., 1969). Außerdem ist es mit dieser Methode in der Regel nicht möglich latentes Virus nachzuweisen, da während der Latenz weder eine aktive Replikation noch eine Ausscheidung von Virus stattfindet (NATHANSON und GONZALEZ-SCARANO, 2007).

Eine sensitive und schnelle Möglichkeit für den Nachweis viraler Bestandteile bietet die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Die PCR ist ein diagnostisches Verfahren, welches auf der *in-vitro* Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz, beispielsweise aus einem viralen Genom, innerhalb des Probenmaterials basiert. Ein großer Vorteil des Genomnachweises im Vergleich zur Virusisolierung besteht darin, dass auch nicht infektiöses Virus und latente Virusgenome detektiert werden können. Je nach Sensitivität des jeweiligen PCR-Protokolls reichen zudem wenige Genomkopien innerhalb der Probe aus, um einen sicheren Nachweis zu gewährleisten (BARTHOLD et al., 2011b).

Bei einer konventionellen PCR erfolgt die Auswertung mittels elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Amplifikate im Agarosegel. Die Laufweite im Gel wird durch die jeweilige Länge bestimmt und erlaubt somit die Beurteilung der Spezifität der Amplifikation (MARKEY et al., 2013c).

Eine modernere, zeiteffizientere und auf Grund der Amplifikation und Auswertung im geschlossenen System weniger kontaminationsgefährdete Variante der PCR stellt die Realtime-PCR dar. Diese arbeitet mit der Echtzeit-Messung von Fluoreszenz-Signalen, die im Verlauf der PCR proportional zur Menge der PCR-Produkte mit jedem PCR-Zyklus ansteigen. Mithilfe des sogenannten „Quantification cycle“ (C_q) wird angegeben, bei welchem Zyklus die Fluoreszenz signifikant über das Niveau der Grund-Fluoreszenz ansteigt. Eine Probe mit höherer Genomlast erzielt also einen niedrigeren C_q-Wert als eine Probe mit geringerer Genomlast (MARKEY et al., 2013c).

Für den Nachweis von BoHV-2-Genom sind bisher ausschließlich konventionelle PCR-Protokolle publiziert. Die wichtigsten Informationen sind in Tabelle 2 vergleichend dargestellt. Als Grundlage für die Bestimmung der spezifischen Primer-Sequenzen dienten DNA-Sequenzen der Gene für die DNA-Polymerase (UL30) (EHLERS et al., 1999b), für das „Major DNA binding protein“ (UL29) (HAMMERSCHMIDT et al., 1988) und für die Glykoproteine B (UL27) (HAMMERSCHMIDT et al., 1988) und H (UL22) (MAY, 2001). Die Bestimmung der genannten Teilsequenzen erfolgte für die BoHV-2-Stämme „BMV“ (BUCHMAN und ROIZMAN, 1978a) und „BHM-1“ (MARAGOS et al., 1986) (siehe auch Kapitel II.1.1).

Tabelle 2: Zusammenstellung von publizierten PCR-Protokollen zur Detektion von BoHV-2-Genom

Literatur	Genbereich der Zielsequenz	Quelle der für Primerdesign verwendeten Sequenz	Länge des Amplifikats	Einsatz und Validierung	Bemerkungen
IMAI et al. (2002) Japan	Glykoprotein B (UL27)	HAMMER-SCHMIDT et al. (1988)	541 bp 541/ 321 bp	Gewebeproben experimentell infizierter Mäuse BoHV-2-Stamm „Minnesota“, USA, YEDLOUTSCHNIG et al. (1970)	Single-step PCR Seminested PCR
DE-GIULI et al. (2002) Italien	DNA-Polymerase (UL30)	EHLERS et al. (1999b)	278 bp	Referenzstämme: „69/1LO“, Italien, CASTRUCCI et al. (1972); „New York 1“, USA, (kommerziell erhältlich; ATCC VR-845)	Multiplex-PCR mit Restriktions-Fragment-längen-Polymorphismus
D'OFFAY et al. (2003) USA	Major DNA binding protein (UL 29)	HAMMER-SCHMIDT et al. (1988)	422 bp	Pseudo Lumpy Skin Disease-Ausbruch in	Single-step PCR
	Glykoprotein B (UL27)		380 bp	Fleischrinderherde in Alabama, USA (1997), Hautbiopsie-Material	Single-step PCR
KALMAN und EGYED (2005) Ungarn	Glykoprotein H (UL22)	MAY (2001)	276/237 bp	Lymphknoten von Rot-, Dam-, Reh-, Muffelwild, Schafen und Ziegen	Nested PCR
TORRES et al. (2009) Brasilien	Glykoprotein B (UL27)	HAMMER-SCHMIDT et al. (1988)	324/374 bp	Gewebeproben experimentell infizierter Schafe (TORRES et al., 2009) und Meerschweinchen (TORRES et al., 2010)	Seminested PCR
CAMPOS et al. (2014) Brasilien	Glykoprotein B (UL27)	HAMMER-SCHMIDT et al. (1988)	608/512 bp	Trigeminalganglien natürlich infizierter Rinder, Brasilien	Seminested PCR Modifizierung des Protokolls von TORRES et al. (2009)
CARGNEL UTTI et al. (2017) Brasilien	DNA-Polymerase (UL30)	Quelle nicht bekannt	138 bp	Krustenmaterial experimentell infizierter Kälber	Multiplex PCR

III. PUBLIKATION

Bovine alphaherpesvirus 2 infections in Bavaria: an analysis of the current situation - several years after eradicating *Bovine alphaherpesvirus 1*

Stefanie Singer¹, Bernd Hoffmann², Angela Hafner-Marx¹, Jürgen Christian³, Friederike Forster¹, Katharina Schneider¹, Gabriela Knubben-Schweizer⁴ & Antonie Neubauer-Juric¹

¹ *Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleißheim, Germany,*

² *Institute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institute, Insel Riems, Germany,*

³ *Bavarian Health and Food Safety Authority, Erlangen, Germany,*

⁴ *Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, Germany*

BMC Veterinary Research

(Published: 24 May 2020)

Abstract

Background: Bavaria, a large federal state in Germany, has been declared free from infections with *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoHV-1) in 2011. To maintain this status the cattle population is monitored for antibodies against BoHV-1 regularly. Several years ago, infrequent but recurrent problems in this serosurveillance were statistically put into correlation with the presence of antibodies against *Bovine alphaherpesvirus 2* (BoHV-2). In Europe, BoHV-2 is primarily known as the agent causing bovine herpes mammillitis. However, very little information about BoHV-2 infections in Bavaria is available so far. Therefore, the aims of this study were to determine BoHV-2 seroprevalences and to detect virus genomes in potential clinical samples.

Results: 6,801 blood sera of healthy cattle from all over Bavaria were tested for antibodies against BoHV-2, revealing an overall seroprevalence of 5.51%. Interestingly, seroprevalences markedly varied between the North and the South of Bavaria, namely from 0.42% to 11.17%. Concurrently, the previously reported relation between the epidemiologically inexplicable sero-reactivities in BoHV-1 ELISAs and the presence of BoHV-2 infections were statistically corroborated in this study. To detect BoHV-2 genomes a fast and sensitive real time PCR was established. Using a multiple PCR strategy, tissue samples from skin lesions at relevant localizations, corresponding lymph nodes, and trigeminal ganglia from 111 animals, as well as nasal swabs from 918 bovines with respiratory symptoms were tested. However, BoHV-2 genomes were not detected in any of these samples.

Conclusions: BoHV-2 antibodies were found in samples from bovines all over Bavaria, albeit with an explicit South-North-divide. BoHV-2 genomes, however, could not be detected in any of the analyzed samples, indicating that acute clinical cases as well as obvious virus reactivation are relatively rare. Consequently, the future spread of BoHV-2 infections throughout Bavaria, particularly, after eradicating BoHV-1, has to be further monitored.

Keywords: *Bovine alphaherpesvirus 2*, *Bovine alphaherpesvirus 1*, BoHV-2, BoHV-1, seroprevalence, real time PCR, Bovine herpes mammillitis, Bavaria, Germany

Background

Bovine alphaherpesvirus 2 (BoHV-2) has been assigned to the genus *Simplexvirus* of the subfamily *Alphaherpesvirinae* in the family *Herpesviridae* (1). In Europe the virus is primarily known as the causative agent of bovine herpes mammillitis (BHM), an ulcerative disease which typically affects the skin of the udder and the teats of lactating or recently dried-off cows (2, 3). Lesions at the muzzle or the oral mucosa of calves have also been described (4, 5). Intensity and duration of clinical symptoms differ between individuals and can range from subclinical to particularly severe or even atypical courses (2, 3, 6, 7). The virus is present in large amounts in vesicular fluids and is *in vitro* isolable during early stages of the disease (8).

In addition to transmission by direct contact, indirect, mechanical alternatives, such as the process of milking or via biting flies, are discussed. At any rate, the intact skin represents an effective barrier to local infection implicating a role for pre-existing skin lesions (9). In experimental settings, reactivation after latency and virus shedding via skin lesions but also via the nasal, the oral, or even via the vaginal mucosa have been demonstrated (8, 10-13). Presumably latent BoHV-2 genomes have been detected in trigeminal ganglia of healthy cattle (14) or in trigeminal ganglia, tonsils, and regional lymph nodes of experimentally infected sheep (15). However, the epidemiological relevance of these findings needs to be further assessed.

Case reports and serological studies show that BoHV-2 infections occur worldwide in domestic cattle and to some extent in wild ruminant populations (for example (16-22)). On the one hand, the wide variation of clinical signs and intra-herd prevalences, even in acute disease outbreaks, is demonstrated (17, 23). On the other hand, studies focusing on serological data indicate relatively high prevalences of BoHV-2 antibodies in various cattle populations, although clinical symptoms are rarely observed and virologic confirmation is lacking (19, 20, 24). These early serological studies, with data from the 1960s to 2000, mostly indicate antibody prevalences within the respective sample populations of about 6% to nearly 40% (17, 19, 20, 24, 25). A relation to age as well as regional differences were noted. For example, BoHV-2 seroprevalences estimated from samples taken at regional slaughterhouses in

Switzerland ranged from 1% in Western Switzerland to 19 % in the canton of Ticino (24).

In Germany, particularly in Bavaria, BoHV-2 sero-reactivity came into focus quite recently when the presence of BoHV-2 antibodies within herds was reported to be related to otherwise inexplicable reactions in the sero-surveillance of *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoHV-1; order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*) infections (26).

Bavaria, a federal state of southern Germany, is officially listed as free from infections with BoHV-1, according to article 10 of directive 64/432/EEC since 2011 (27). To monitor BoHV-1 freedom, bovines have to be tested regularly for the absence of BoHV-1 antibodies, *rere*. This is achieved either by analyzing bulk milk or, if necessary, blood samples. In doing so, epidemiologically non-feasible BoHV-1 antibody reactions are repeatedly detected, albeit at low ratios. Unexplainably, this phenomenon is observed especially in the southwest region of Bavaria, in Swabia (26). A significant correlation between these epidemiologically non-feasible reactions in several BoHV-1 test systems and the BoHV-2 seroprevalence within a given herd was shown (26).

Looking at farms from Swabia, chosen for the occurrence of problematic, “non-negative” results in the BoHV-1 surveillance, BoHV-2 specific antibodies were detected in 35.4% of the samples, whereas for unproblematic Swabian farms a BoHV-2 seroprevalence of only 12.5 % was noted (26). Moreover, BoHV-2 antibodies were not found in samples stemming from North-Eastern regions of Bavaria, which leads to the assumption that the frequency of BoHV-2 infections differs regionally.

Similar observations were made for South Tyrol in Northern Italy and parts of Austria (unpublished observations by Tavella, A. (South Tyrol, 2016) and Schiefer, P. (Austria, 2016). Nevertheless, there is no direct cross reactivity between BoHV-1 and BoHV-2 specific antisera in the respective diagnostic systems (26, 28, 29). Furthermore, BoHV-2 is clearly closer related, genetically as well as antigenetically, to the *Human alphaherpesviruses 1 and 2* (Herpes Simplex Virus 1 and 2, order *Herpesvirales*, family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Simplexvirus*) than to BoHV-1 (28, 30, 31). A fact

that is reflected by the assignation of the former viruses to the genus *Simplexvirus*, whereas the latter belongs into the genus *Varicellovirus* (1). However, epidemiologic and virologic, but also sequence information on the BoHV-2 genome, is still sparse (30, 31). Interestingly though, within an experimental setting it was demonstrated that reactivation of BoHV-1 interfered with that of BoHV-2 (32).

Considering the information available, it was hypothesized that currently BoHV-2 infections might mainly occur in the southwest of Bavaria and that the overall prevalence might be relatively low. Furthermore, it was assumed that in coming years the spread of BoHV-2 infections and – if connected - resulting problems in the BoHV-1 serosurveillance might gain in importance in regions where BoHV-1 was successfully eradicated. Therefore, the main aim of this study was to gather basic information necessary about BoHV-2 infections in the Bavarian cattle population. On the one hand, BoHV-2 seroprevalences had to be determined for Bavarian cattle. On the other hand, to identify current BoHV-2 infections in Bavaria by testing a large number of samples, a fast and sensitive real time PCR protocol had to be established. Finally, the putative correlation between reactions in BoHV-2 and BoHV-1 serological test systems had to be assessed for all regions of Bavaria more than six years after successfully eradicating BoHV-1.

Results

Analyses of bovine sera for cross neutralization against BoHV-1 and BoHV-2

In a first step, to exclude a direct cross neutralization between current BoHV-2 and BoHV-1 field antibodies, 37 known BoHV-2 antibody positive and 27 known BoHV-1 antibody positive sera were analyzed in parallel in BoHV-2 and BoHV-1 specific serum neutralization tests (SNT). BoHV-2 antibody positive sera specifically neutralized to titers of 11 to ≥ 90 in the BoHV-2 SNT and BoHV-1 sera neutralized to titers of 6 to ≥ 90 in the BoHV-1 specific test. No cross-neutralization occurred. Therefore, it was concluded that the respective SNTs allow for specific detection and differentiation of BoHV-1 and BoHV-2 antibodies.

Comparative analyses between BoHV-2 specific ELISA and Serum

Neutralization Test

Of 6,801 sera tested for seroprevalence calculations by BoHV-2 ELISA (ID Screen® BHV-2 Indirect; IDvet) (see below), the majority could be categorized either as clearly negative (6,234 samples; $S/P\% \leq 10\%$) or positive (298 samples; $S/P\% \geq 110\%$). Further, the results of 20 sera lied within the given, doubtful range ($90\% < S/P\% < 110\%$). Another 249 sera reacted within a range of $10\% \leq S/P\% \leq 90\%$. To assure a clear classification of these “in between” results a subset of 128 sera covering all possible ELISA reactions was chosen for comparative analysis in the BoHV-2 specific SNT. The results are summarized in figure 1.

BoHV-2 ELISA positive samples ($n=10$) neutralized to titers of 22 to ≥ 90 . Within this range, high ELISA-values ($S/P\% \geq 150\%$) corresponded to high SNT titers (≥ 90). All eight samples with clearly negative ELISA values ($S/P\% \leq 10\%$) showed no neutralizing activity at all, whereas all sera reacting doubtful ($90\% < S/P\% < 110\%$; $n=20$) neutralized to titers of 32 to ≥ 90 . The range of $10\% \leq S/P\% \leq 90\%$ was subdivided further into two categories. On the one hand, within the range of $50\% \leq S/P\% \leq 90\%$, hereafter called “increased”, 57 of 61 tested samples still generated titers of 4 to ≥ 90 while only four did not neutralize BoHV-2 infectivity. On the other hand, within the lower range of $10\% < S/P\% < 50\%$, already 9 of the 29 samples did not contain neutralizing antibodies and only 20 samples reacted to relatively low titers, namely between 4 and 45.

Taken together, in all ranges above 10% ($S/P\%$) sera with low level but specific antibodies to BoHV-2 might be underestimated. As 93.4% of the samples within the increased range but only 69% of the sera with reactivities between 10% and 50% neutralized BoHV-2 antigen in SNT, a final cut-off value of 50% was chosen for the analyses in this study (Figure 1). To avoid false positive results, sera with $S/P\%$ -values greater or equal 50% to 110% (“doubtful” or “increased”), were consequently retested for neutralizing antibodies and then finally rated according to the SNT results.

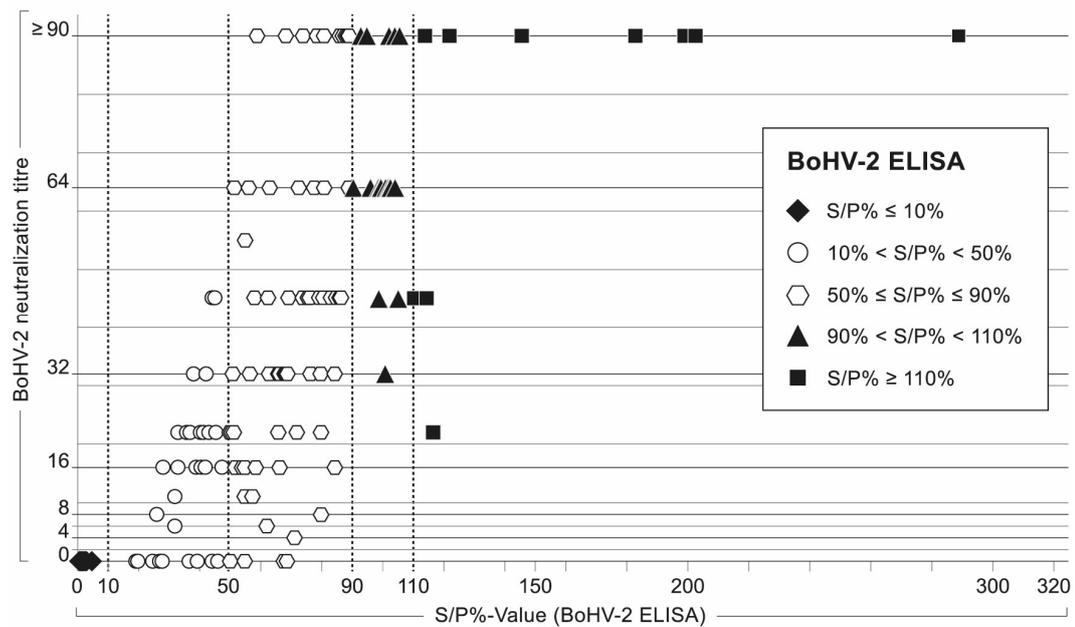


Fig. 1 Correlation between BoHV-2 ELISA results and titers of neutralizing antibodies. Each symbol represents the results of one sample in both tests. The data for 128 samples are shown. ELISA results are indicated as S/P%-values. In case of duplicate analyses the mean S/P%-value per sample is given. Sera with ELISA values $\leq 90\%$ are classified as negative by the manufacturer and are depicted as diamonds (\blacklozenge) for S/P%-values $\leq 10\%$, circles (\circ) for S/P%-values between 10% and 50% , or hexagons (\hexagon) for S/P values between 50% and 90% . Triangles (\blacktriangle) indicate results classified as doubtful by ELISA ($90\% < S/P\% < 110\%$). ELISA-positive sera are indicated by rectangles (\blacksquare)

Prevalences of BoHV-2 specific antibodies vary regionally

To estimate and to compare seroprevalences in Bavaria, all results were analyzed on the level of individual seropositive animals, as well as on the level of farms keeping at least one seropositive animal (= BoHV-2 seropositive farms; Figure 2). Interestingly, 19.21% of all farms analyzed in Bavaria were categorized as BoHV-2 seropositive (78 of 406; CI 15.38-23.04%). However, looking at the regional distribution, marked differences became evident. Whereas in 4.76% of farms in the combined regions of North Bavaria (5 of 105; CI 2.69-6.83%), or 3.85% of farms in Lower Bavaria (3 of 78; CI 1.98-5.72%) at least one BoHV-2 seropositive bovine was found, this happened to be the circumstance for 20.73% of farms in Upper Bavaria (17 of 82; CI 16.79-24.67%), and even for 37.59% of farms in Swabia (53 of 141; CI 32.88-42.30%).

Regarding the individual animal level the BoHV-2 seroprevalences were

clearly lower, namely 0.42% (8 of 1,916; CI 0.26-0.57%) in North Bavaria, 1.78% (19 of 1,070; CI 1.46-2.09%) in Lower Bavaria, 4.67% (56 of 1,200; CI 4.17-5.17%) in Upper Bavaria, and 11.17% (292 of 2,615; CI 10.42-11.91%) in Swabia. In total, 5.51% (375 of 6801; CI 4.97-11.17%) of bovines in Bavaria had detectable levels of BoHV-2 specific antibodies.

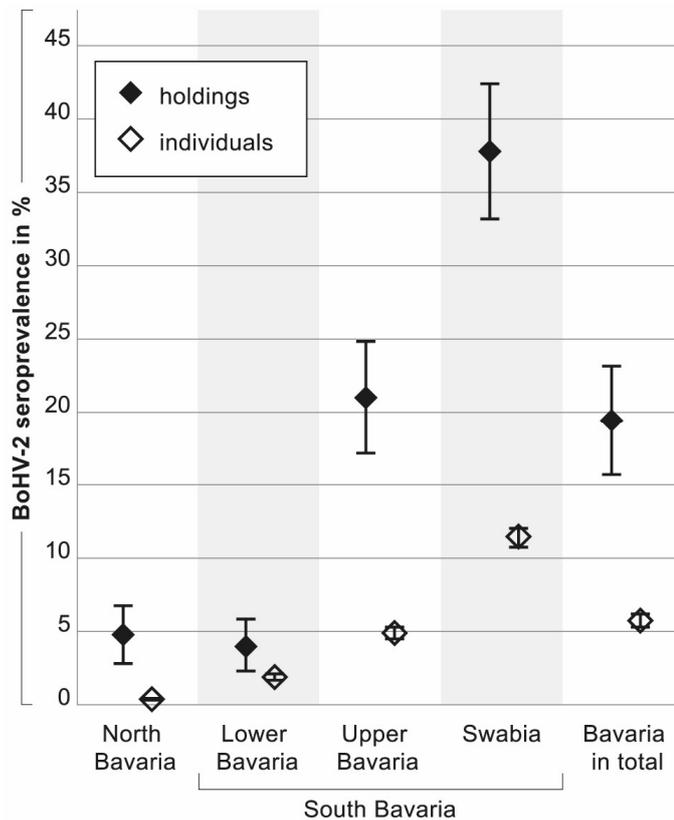


Fig. 2 BoHV-2 seroprevalences in Bavaria divided into administrative regions. Seroprevalences calculated for 406 holdings are shown as black diamonds (◆), and those calculated for 6,801 individual animals, irrespective of the correspondent farm, as open diamonds (◇). A holding is rated as “BoHV-2 seropositive” if at least one seropositive bovine animal is kept. Confidence intervals covering the true seroprevalence with a certainty of 95% are given

The chi-squared test indicated that a statistically significant difference for BoHV-2 seroprevalences on the individual animal level exists when comparing Swabia, Upper Bavaria, and Lower Bavaria ($p < 0.001$) to North Bavaria (Table 1a).

Versus Lower Bavaria, the region with the lowest BoHV-2 seroprevalence on the farm level, statistically significant differences for Swabia and Upper Bavaria ($p < 0.05$), but not for North Bavaria ($p = 0.765$) were calculated (Table 1b).

Table 1 Results of BoHV-2 serology in relation to the region of origin of animals (a) and farms (b)**a) Individual animal level**

	BoHV-2 seropositive animals (n=375)	BoHV-2 seronegative animals (n=6,426)	OR^a (CI 95%)	p-value
North Bavaria	8	1,908	1.00	-
Lower Bavaria	19	1,051	4.31 (1.88-9.88)	<0.001
Upper Bavaria	56	1,144	11.67 (5.55-24.58)	<0.001
Swabia	292	2,323	29.98 (14.81-60.67)	<0.001

b) Farm level

	BoHV-2 seropositive farms^b (n=78)	BoHV-2 seronegative farms^c (n=328)	OR^a (CI 95%)	p-value
North Bavaria	5	100	1.25 (0.29-5.40)	0.764462
Lower Bavaria	3	75	1.00	-
Upper Bavaria	17	65	6.54 (1.83-23.32)	<0.05
Swabia	53	88	15.06 (4.52-50.15)	<0.001

^a Odds Ratios

^b farms are classified as BoHV-2 seropositive when at least one BoHV-2 seropositive animal is kept

^c farms are classified as BoHV-2 seronegative when none of the tested animals had antibodies against BoHV-2

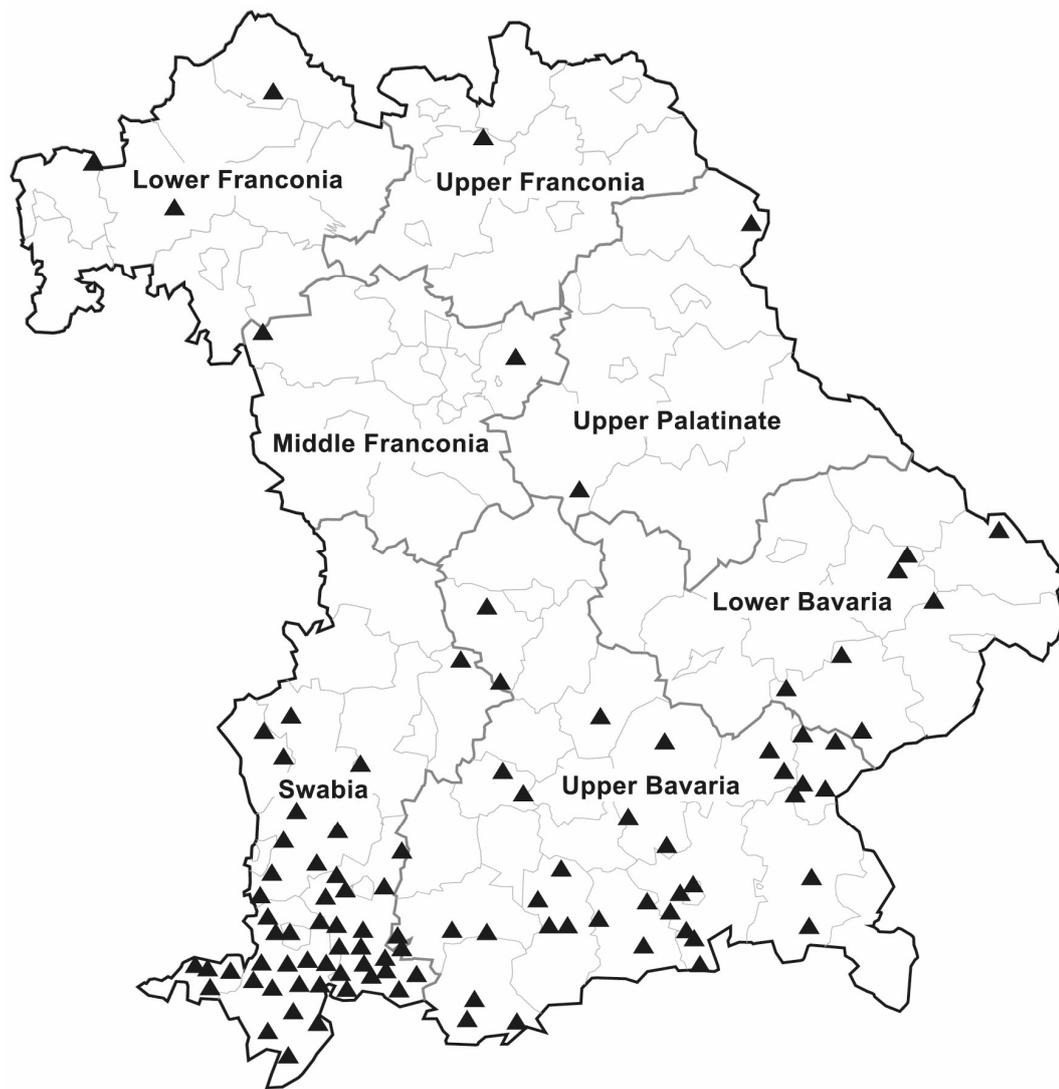


Fig. 3 Map of Bavaria indicating the geographical distribution of BoHV-2 seropositive samples. The seven administrative regions are shown. Swabia, Upper, and Lower Bavaria represent South Bavaria whereas Upper, Middle, and Lower Franconia as well as Upper Palatinate are addressed as North Bavaria in this study. Black triangles (▲) indicate postal code areas where at least one BoHV-2 antibody positive animal was detected. The data is not quantitative as 561 positive samples were categorized into 100 postal code areas. The map was generated using the software *GfK Regiograph Analysis* and *Adobe Illustrator*

The geographic origin of all individual samples that were found to contain BoHV-2 specific ELISA antibodies in the wider context of this study (n=561) is visualized in figure 3. In addition to the 375 samples mentioned above relating to the seroprevalence calculations another 186 BoHV-2 seropositive samples were localized. As the latter samples were not randomly selected, the map merely gives a general overview of the geographical distribution across all regions of Bavaria.

Variability of BoHV-2 antibodies within positive herds

In a next step, individual intra-herd BoHV-2 seroprevalences were calculated as illustrated in figure 4. Farms in North Bavaria had the lowest prevalence of seropositive animals per farm, with a median of 7.69% in five farms, followed by Swabia (24.26%; 53 farms), Upper Bavaria (28.57%; 17 farms), and Lower Bavaria (30.00%; three farms). However, as the overall number of positive farms markedly varied between regions, these data are difficult to compare. In any case, it was shown that intra-herd seroprevalences are indeed extremely variable, ranging from 2% to 100%.

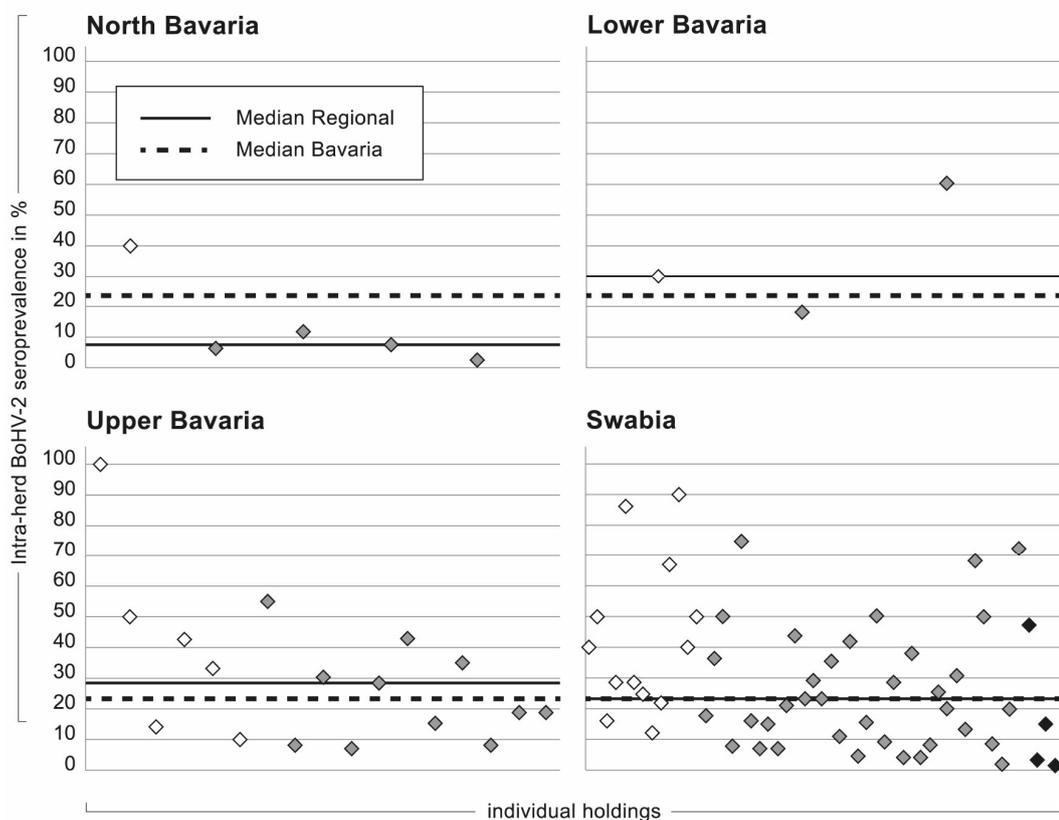


Fig. 4 BoHV-2 intra-herd seroprevalences calculated for farms keeping at least one BoHV-2 seropositive animal. BoHV-2 antibodies were determined by ELISA and in case of doubtful or increased reactivities, were confirmed by SNT. One diamond is attributed to one farm. White diamonds (◇) represent farms with one to ten animals tested (n=20), grey ones (◆) farms with eleven to 50 animals tested (n=54), and black ones (◆) farms with more than 50 animals tested (n=4). Solid horizontal lines indicate the median seroprevalence for the respective region. Dotted lines represent the median of intra-herd BoHV-2 seroprevalences calculated for all of Bavaria

Comparison of BoHV-2 seroprevalences with the incidence of inexplicable reactions in the BoHV-1 antibody testing

The interest in BoHV-2 infections and prevalences in Germany has increased after eradicating BoHV-1. One aspect was that BoHV-2 sero-reactivity was related to otherwise inexplicable reactions in the sero-surveillance of BoHV-1 infections, particularly in specific regions of Bavaria (26). To match the BoHV-2 antibody presence and the respective results in BoHV-1 surveillance, the same 6,801 samples were used.

Comparing the results of the group of cattle with inexplicable reactions in the BoHV-1 surveillance with those of the clearly BoHV-1 antibody ELISA negative group, statistically significant differences concerning BoHV-2 prevalences ($p < 0.001$, chi-squared test) were confirmed (Table 2).

Actually, 33.33% (CI 32.21-34.45%) of 90 samples that reacted in only one BoHV-1 ELISA system, the Trachitest, and even 58.93% (CI 57.76-60.10%) of 56 samples with non-negative reactions (= reactions in two BoHV-1 ELISAs), were at the same time BoHV-2 seropositive (Fig. 5). Furthermore, only 4.69% (CI 4.19-5.19%) of the BoHV-1 ELISA negative samples ($n=6,655$) were BoHV-2 seropositive. Taken together, BoHV-1 Trachitest-positive samples had an elevenfold (CI 6.46-15.99) increased probability for BoHV-2 seropositivity compared to BoHV-1 ELISA negative samples (Table 2a). This probability was yet twenty-nine fold increased for samples with non-negative BoHV-1 ELISA results (CI 16.92-50.27).

Table 2 Statistical relation between the results of BoHV-2 serology in relation to the respective results in BoHV-1 ELISAs for animals (a) and farms (b)

a) Individual animal level

	BoHV-2 seropositive animals (n=375)	BoHV-2 seronegative animals (n=6,426)	OR^a (CI 95%)	p-value
BoHV-1 ELISA negative animals	312	6,343	1.00	-
Trachitest-positive animals	30	60	10.71 (6.46-15.99)	<0.001
Non-negative animals	33	23	29.17 (16.92-50.27)	<0.001

^a Odds Ratios

b) Farm level

	BoHV-2 seropositive farms^b (n=78)	BoHV-2 seronegative farms^c (n=328)	OR^a (CI 95%)	p-value
BoHV-1 ELISA negative farms^d	36	278	1.00	-
Trachitest-positive farms^e	15	37	3.13 (1.57-6.26)	<0.001
Non-negative farms^f	27	13	16.04 (7.60-33.86)	<0.001

^a Odds Ratios

^b farms are classified as BoHV-2 seropositive when at least one BoHV-2 seropositive animal is kept

^c farms are classified as BoHV-2 seronegative when none of the tested animals had antibodies against BoHV-2

^d farms are classified as BoHV-1 ELISA negative when none of the tested sera showed reactivity in the Trachitest

^e farms are classified as Trachitest-positive when at least one animal with reactivity in the Trachitest but none with reactivity in the gB-ELISA is kept

^f farms are classified as non-negative when at least one animal with reactivity in the Trachitest and the gB-ELISA (gE-ELISA negative) is kept

Reversed, the correlation was not as evident. Of 375 samples in which BoHV-2 antibodies were detected, only 33 reacted non-negative, 30 Trachitest-positive, and the remaining 312 were clearly BoHV-1 ELISA negative. Interpretation of the data on the farm level revealed similar results. 67.5% (CI 62.94-72.06%) of the farms classified as BoHV-1 ELISA non-negative (n=40), 28.85% (CI 24.44-33.25%) of the Trachitest-positive farms (n=52), and 11.46% (CI 8.37-14.56%) of the BoHV-1 ELISA negative farms (n=314) were simultaneously categorized as BoHV-2 seropositive (Fig.5). Table 2b shows the statistical relation between the results of the BoHV-2 serology and the BoHV-1 ELISAs on the farm level.

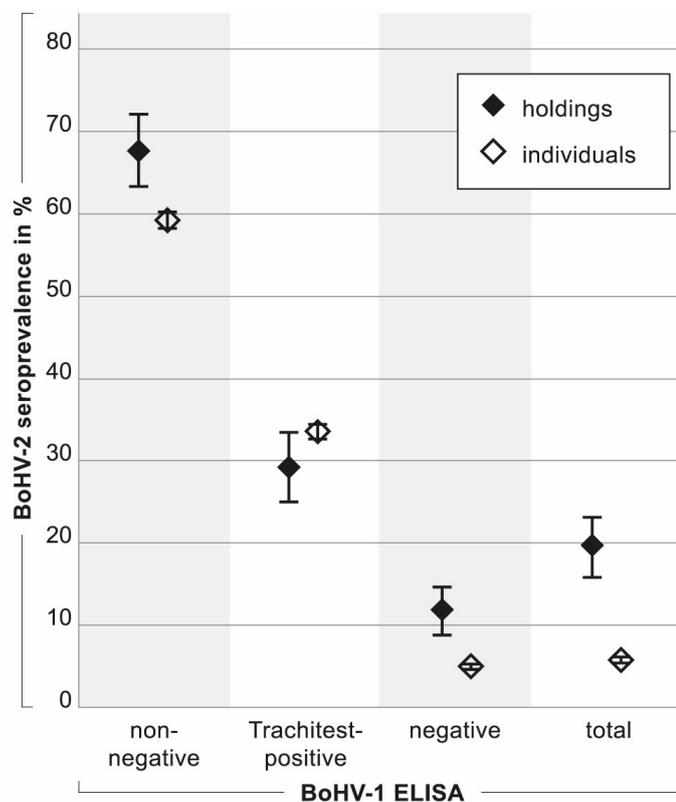


Fig. 5 BoHV-2 seroprevalences in relation to BoHV-1 ELISA results. Black diamonds (◆) indicate results when interpreted for holdings, open diamonds (◇) when individual animals are considered. Farms where at least one BoHV-2 seropositive animal is kept are classified “BoHV-2 seropositive”. With respect to results in the BoHV-1 ELISAs, holdings are categorized as follows: “BoHV-1 ELISA negative” (Trachitest negative), “Trachitest-positive” (Trachitest positive but gB-ELISA negative), “non-negative” (Tract and gB-ELISA positive or suspect, but gE-ELISA negative). The mean data for 406 holdings and 6,801 cattle is given as “total”

Approaches to detect acute BoHV-2 infections in Bavaria

Another aim of this study was to identify acute BoHV-2 infections. Thus, a BoHV-2 specific real time PCR targeting sequences within the glycoprotein B (gB) gene was designed. Additionally, a published conventional PCR protocol with primers targeting sequences within the BoHV-2 DNA polymerase gene was used. Both were found to detect about 20 copies of BoHV-2 strain "Riems 8/85" (RVB-0064) per reaction.

In a first series of experiments, 193 tissue samples and 918 nasal swabs were analyzed by BoHV-2 specific real time PCR. A slight rise in fluorescence was observed during the final cycles for several tissue, as well as swab samples, therefore these samples were retested by the BoHV-2 DNA polymerase PCR. However, in no case a specific amplification of BoHV-2 sequences resulted.

The PCR protocols used in this study base on the sparse sequence information available, and, on top of that, from older or non-European BoHV-2 isolates. To nevertheless ensure that BoHV-2 sequences were not missed, an even broader PCR-format, a PanHerpes PCR, was used hereafter (33). All 193 tissue samples mentioned above as well as 46 additional tissue samples were tested applying this protocol (see methods). Herpesvirus DNA was specifically amplified out of 40 samples, stemming from 25 different animals (24 bovines and 1 goat). Unfortunately, nucleic acid sequence determination (Sanger Sequencing, Eurofins Genomics) did still not reveal any indication for BoHV-2 specific sequences.

Primarily Gammaherpesviruses were identified. In one case, showing pronounced mucosal lesions, a bovine OvHV-2 (*Ovine gammaherpesvirus 2*; family *Herpesviridae*, subfamily *Gammaherpesvirinae*, genus *Macavirus*) infection was diagnosed. Furthermore, in the udder lymph node of a goat, sequences of the *Caprine gammaherpesvirus 2* (CpHV-2; family *Herpesviridae*, subfamily *Gammaherpesvirinae*, genus *Macavirus*) were detected. Remaining sequences will be assessed in more detail in future studies.

Taken together, although a broad spectrum of samples and types of lesions were included in this study, so far, no BoHV-2 genomes were detected. In principle, the suitability of the strategy applied, however, was proven by the amplification of several herpesvirus sequences – other than BoHV-2.

Discussion

The aim of this study was to improve the knowledge about the epidemiology and virology of BoHV-2 infections. For the analysis of 6,801 bovine blood sera the commercially available indirect BoHV-2 ELISA ID Screen® BHV-2 Indirect (IDvet) was used. Considering doubtful results as positive ($n=20$), 6,552 out of 6,801 sera could be classified as clearly positive or negative. However, it was of interest to sensitively detect even low antibody levels, as previous reports had indicated that BoHV-2 specific antibodies might not persist for long if reactivation doesn't occur (8). Therefore, the SNT was additionally consulted for the rating of samples with increased ELISA results ($50\% \leq S/P\% \leq 90\%$; Fig. 1). Yet, the seroprevalences determined might still be slightly underestimated, assuming the existence of individual, low level antibody positive sera within the pool of sera with results below the cut-off of 50%. The effect on the discussed results would, however, be minor.

Overall, 5.51% of the sera tested throughout Bavaria contained antibodies against BoHV-2 and a marked South-North divide was demonstrated (Fig. 2 and 3). Interestingly, in the late 70s a regional distribution in Switzerland was discussed with BoHV-2 antibody ratios ranging from 1% to 19% (24). The authors speculated that BoHV-2 infections might actually be spreading from Italy and the South to the North and West. In the same way one could either argue that BoHV-2 infections in Bavaria are actually slowly spreading towards the North, or, that other regional issues exist which might locally favor BoHV-2 infections. If spreading actually occurs, it could be hypothesized on the one hand that BoHV-2 was to some extent "co-eliminated" in the context of BoHV-1 eradication and is now slowly reintroduced into Bavaria. On the other hand, BoHV-2 infections per se could be - for other reasons - a relatively new or statistically still minor phenomenon for Bavaria. BoHV-1 freedom could then even favor BoHV-2 expansion with time. Other hypotheses could argue toward a local phenomenon. Firstly, only one third of the Bavarian cattle population is located in North Bavaria. The regions with the highest BoHV-2 seroprevalences, Swabia and Upper Bavaria, are also the regions with the largest cattle population (about 50% of the Bavarian cattle population), which might facilitate virus transmission between herds.

Secondly, and even more importantly, whereas in North Bavaria cattle are mostly kept in stables, pasture management is common in the South. Moreover, in areas close to the Alps traditional alpine farming is practiced. An increased contact of cattle to people, to cattle from other herds, and also to other domestic or wild animals results. Wild ruminants like red deer, roe deer, fallow deer, mouflon, and chamois are also susceptible for BoHV-2 (18, 34). It is not known if these species develop clinical symptoms of BHM, but a function as reservoir hosts might be possible.

Finally, cattle on pastures, especially on alpine pastures, are exposed to more extreme climate conditions than cattle in stables. Factors like UV radiation or marked temperature fluctuations might favor reactivation of latent infections and thus virus spread and/or the re-stimulation of antibody responses. The effect of skin temperature on BoHV-2 infections has been clearly shown previously, proposing an explanation for the seasonality of BHM-outbreaks (8, 35).

Interestingly, not only the overall seroprevalence, but also the intra-herd prevalence was altogether relatively low in this study, but at the same time very variable, ranging from 2% to 100% (Fig. 4). In some herds, only one seropositive animal was found. In contrast, early case reports describe up to 96% of the cows within a herd being clinically affected (2). Obviously, transmission of current and possibly local BoHV-2 strains, under actual husbandry conditions in Germany, is by far not as effective as formerly described.

This conclusion was somewhat corroborated by the results of the BoHV-2 genome analyses in this study. To get an initial idea about BoHV-2 infections in the region, various samples taken from 111 animals with lesions such as skin alterations at udder, teats, muzzle, or mouth were analyzed as well as 918 nasal swabs. By choosing these materials, acute as well as reactivated or latent infections were targeted. For BoHV-2, which is a member of the subfamily *Alphaherpesvirinae*, it is reasonable to assume that seropositive animals are virus carriers, and reactivation experiments have proven this concept in the past (10, 12, 36). Therefore, the working hypothesis was that in the respective regions about 5% (Upper Bavaria) to 11% (Swabia) of the animals should be

either in a state of acute or latent infection. To sensitively detect any status of infection PCR was the method of choice. Various protocols targeting several regions of the BoHV-2 genome that should be highly conserved were used. In addition, including a PanHerpes approach for all tissue samples should have ensured that BoHV-2 genomes – if present – would not have been missed. If genomes had been detected, in a next step virus isolation would have been attempted for those samples indicating an early stage of productive infection. However, none of the clinical lesions analyzed was caused by an acute or reactivated BoHV-2 infection. This leads to the conclusion that at the moment BoHV-2 clinical disease might not be considered a severe problem. This is supported by the fact that neither veterinarians in the field have sent in BoHV-2 positive samples – although repeatedly invited - nor pathologists in our pathology department were able to sample acute or reactivated infections. The latter had been hypothesized to putatively occur as a side effect of the immunosuppression caused by others diseases.

Virus isolation from nasal swabs upon experimental infection and reactivation has been reported (11). However, specific DNA sequences could not be detected in swabs analyzed in this study. This might indicate that reactivation and shedding via the respiratory tract is not a common event in the field.

Taken together, it can be assumed that the types of test materials as well as the detection methods, which were used for this study, would be appropriate to find BoHV-2 genomes if present in detectable amounts. It is nevertheless possible that an even higher degree of awareness for corresponding, possibly even discrete and mild clinical signs in the field, would help to monitor the disease and putative future changes in epidemiology.

From the administrative point of view, specifically aiming at a smooth serosurveillance of BoHV-1 infections in an article 10-region, the further evolution of BoHV-2 infections needs to be kept in view. According to the current legal basis, only gE-ELISA positive sera are indicative for an infection with BoHV-1 wild type virus (37). Competitive gE-ELISAs are highly specific and were developed originally to allow for the differentiation between field virus infected and vaccinated individuals (DIVA). This principle was essential during intermediate stages in the German BoHV-1 eradication strategy. However,

now, several years after the complete region of Bavaria has been declared free of BoHV-1 infections, specific antibodies should not be present anymore. Nevertheless, now and again single samples turn up with conspicuous results in BoHV-1 specific ELISAs, with the exception of the gE-ELISA. There is no epidemiological foundation to explain these “non-negative” reactions. Early field virus infections, when antibodies against gE might not yet be detectable, are consistently ruled out by retesting after a reasonable time interval. Furthermore, vaccination has been banned throughout Bavaria in 2011. Remaining vaccinated animals should thus only provide a very minor and documented population.

A currently completely unexplained, but statistically significant correlation between the BoHV-2 seroprevalence and these reactions in the BoHV-1 surveillance system within a herd was corroborated in this study (Fig. 5). About 60% of samples from cattle with inexplicable, non-negative reactions in the BoHV-1 Trachitest and gB-ELISA, but not the gE-ELISA, were at the same time BoHV-2 seropositive. On the farm level, nearly 70% of sampled farms with single non-negative BoHV-1 reactivities among their cattle were also classified as BoHV-2 seropositive. Interestingly, not necessarily the same individuals were affected. In fact, 40% of samples from cattle with non-negative reactions were clearly negative for BoHV-2 antibodies and 5% of the cattle population classified as BoHV-1 negative was nevertheless BoHV-2-seropositive. In any way, direct cross-reaction of BoHV-2 specific sera with BoHV-1 antigen can be excluded, as has been repeatedly shown (26, 28, 29). Furthermore, initial experiments of the current study revealed no cross-neutralization in BoHV-2 specific and BoHV-1 specific SNTs. Therefore, a reason for these observations can only be estimated at this point. A BoHV-2 infection could for example influence the BoHV-1 ELISA sero-reactivity under specific circumstances only, like after several reactivations or in combination with a third, as yet unidentified infection or factor. Furthermore, BoHV-2 infection and developing non-negative BoHV-1 test results might not even be directly connected, but could both be independently linked to a common regional risk or husbandry condition. Further studies will be necessary to assess these hypotheses.

However, the difference between the current, somewhat broader, regional distribution of non-negative BoHV-1 ELISA results, when compared to the ones discussed by Böttcher, Boje (26), might indicate a further dissemination over time. Before, it was reported that the non-negative problematic is specific for Swabia (26). It is possible that, as nearly ten years have passed between the sample takings, BoHV-2 infections – potentially concurrent with non-negative results in BoHV-1 ELISAs - have spread from Swabia to Upper Bavaria. Anyhow, as already discussed above, a comparison of the results of the two studies is not valid, as aims and study designs differed too much.

Taken together, both issues – BoHV-2 infections and the occurrence of non-negative reactions in BoHV-1 surveillance – are still extremely rare in the North, but the apparently relative fast developments in the Southern regions show how important a close surveillance of BoHV-2 infections in the following years after BoHV-1 eradication will be.

Last but not least, very sporadically in sera, that appeared “non-negative” and that were tested for neutralizing antibodies against BoHV-1 and BoHV-2 in the context of this study, BoHV-1 neutralization was detected. Follow up investigations always allowed to trace these antibodies back to an earlier vaccination. More importantly though, taking these results into account together with the observation that a one to one cross-reactivity between BoHV-1 and BoHV-2 positive sera in the ELISAs does not exist, the conclusion that a non-negative reaction can easily be explained by a BoHV-2 infection of the respective animal cannot be drawn without further consideration.

Conclusions

In summary, BoHV-2 specific antibodies were diagnosed in samples all over Bavaria and statistically valid seroprevalences could be presented for the first time. Interestingly, significant regional differences in BoHV-2 seroprevalences were discovered. The highest prevalence, when looking at individual animals, was detected for Swabia, in the South-West, followed by Upper Bavaria, Lower Bavaria, and finally North Bavaria. Moreover, the intra-herd prevalence was shown to vary markedly, indicating that the tendency for spreading within a holding is not yet predictable and, more importantly, that more information

on the epidemiology and virology of BoHV-2 is severely needed. In addition, a previously discussed statistical correlation between problems in the BoHV-1 surveillance and BoHV-2 sero-reactivity (26) was corroborated in this study. However, as expected for viruses that are genetically and antigenically not too closely related, no direct cross-reactivity of sera in BoHV-1 or BoHV-2 specific antibody tests were found. Furthermore, attempts to directly identify BoHV-2 infections have failed so far, since BoHV-2 genomes could not be detected, neither in any of the 239 selected tissue samples nor in any of the 918 clinical nasal swabs.

Taken together, these findings indicate that BoHV-2 infections currently do not present a major clinical problem in Bavaria. Nevertheless, considering the demonstrated statistical correlation with inexplicable reactions in the BoHV-1 surveillance and the indications for further spreading, BoHV-2 infections need to be further monitored and more data is required to understand these current epidemiological issues.

Methods

Serological investigation

Samples and statistical methods

The aim of the study was to determine regional BoHV-2 seroprevalences with a statistical certainty of 95% and an accuracy of at least 5%. According to the data provided by Böttcher, Boje (26), it was assumed that Swabia was more affected than other administrative regions of Bavaria. For this reason, a putative prevalence of about 10% for Swabia and 5% for Upper Bavaria, Lower Bavaria, and North Bavaria (Upper Palatinate, Upper, Middle, and Lower Franconia) and infinite cattle populations were taken as a basis in a first calculation step. Sample sizes of at least 139 farms from Swabia and 73 farms from the other regions resulted (38). In a second step, the distribution of the farms to be selected was adapted to the respective regional cattle densities.

Out of the large pool of blood samples from healthy animals that were sent in in 2017, 2018, and in the beginning of 2019 to the Bavarian Health and Food

Safety Authority, 6,801 sera stemming from 406 farms were randomly chosen and included in this study. Following the sampling scheme explained above, finally 141 farms (2,615 sera) from Swabia, 82 farms (1,200 sera) from Upper Bavaria, 78 farms (1,070 sera) from Lower Bavaria, and in summary 105 farms (1,916 sera) from the four administrative regions of North Bavaria, i.e. Upper Palatinate, Upper Franconia, Middle Franconia, and Lower Franconia, were included.

In order to better describe seroprevalences, confidence intervals (CI) that should cover the true seroprevalence with a certainty of 95%, were used. To check for the relationship between BoHV-2 seroprevalence and sample origin on the one hand and between BoHV-2 seroprevalence and BoHV-1 test results on the other hand, the chi-squared test was applied. A quantification of these relationships was made by odds ratios. Values of $p < 0.05$ were regarded as statistically significant.

ELISAs detecting BoHV-1 or BoHV-2 antibodies

To detect antibodies against BoHV-2 an indirect ELISA (ID Screen® BHV-2 Indirect; IDvet) was used. A purified French BoHV-2 isolate serves as antigen (39). According to the manufacturer's instructions, sera are classified as positive, when the sample to positive control-ratio (S/P%) is greater or equal 110%, as negative, when the S/P% is less or equal 90%, and as doubtful, when the S/P% lies in between ($90\% < S/P\% < 110\%$). Using these cut-off values, a diagnostic sensitivity of 92.0% or 96.6% and a respective diagnostic specificity at 100.0% or 98.2% has been determined depending on whether or not doubtful results are considered positive (IDvet: Internal validation report ID Screen® BHV-2 Indirect; available upon request). The underlying data largely bases on the results of a study analyzing a large number ($n=424$) of preselected samples in the ELISA and the BoHV-2 specific serum neutralization test (SNT) as a gold standard (40). To increase the sensitivity in this study an additional range of sample/positive control ratios (S/P%) was considered. Ratios between 50% and 90%, hence lower still than the test systems range of "doubtful" results ($90\% < S/P\% < 110\%$), were defined as "increased". Samples with "doubtful" results ($n=20$) were retested by BoHV-2 specific SNT. "Increased" results ($n=62$) were controlled accordingly for all

sera that were suitable for this test system (n=61). One sample had to be excluded as it caused toxic reactions in cell culture. Furthermore, to ensure the comparability of these low level antibody results between ELISA tests, an additional weak positive reference serum ("MRI-BHV-2", BoHV-2 positive, freeze dried serum, IDvet) was used in every assay.

In Germany, a variety of commercially available ELISA test kits are registered for the official testing of cattle sera for antibodies against BoHV-1. Three different BoHV-1 antibody ELISA systems were applied in a hierarchical order: To begin with, an indirect virus ELISA, hereafter called Trachitest (IDEXX Trachitest Serum Screening, IDEXX Europe B.V.), was used. According to the manufacturer's instructions samples have to be retested when reactivity exceeds 35% but does not yet reach positive values ($\geq 45\%$). However, to increase the sensitivity within the framework of the present study, this cut-off value was reduced to 25%. In case of a reactivity above this value the test was repeated and additionally samples were analyzed in a second ELISA, a competitive gB-ELISA (IDEXX IBR gB X3, IDEXX Europe B.V. or cattletype BHV1 gB Ab, Indical). In case of positive or suspect results in the gB-ELISA, according to the test specifications, the third ELISA, a competitive gE-ELISA (IDEXX IBR gE, IDEXX Europe B.V.) was used. Finally, considering the results of the three ELISAs, sera were categorized using the following nomenclature: "BoHV-1 ELISA negative" (Trachitest negative), "Trachitest-positive" (Trachitest positive, gB-ELISA negative), "non-negative" (Trachitest and gB-ELISA positive or suspect, gE-ELISA negative), and "BoHV-1 antibody positive" (all assays, especially gE-ELISA, positive). 37

Serum neutralization test (SNT)

BoHV-1-strain "Schönböken" (RVB-0073) and BoHV-2-strain "Riems 8/85" (RVB-0064), both obtained from the Collection of Viruses in Veterinary Medicine, Friedrich-Loeffler-Institute, Insel Riems, Germany, were propagated on KOP-R cells, a diploid bovine esophageal cell line (RIE244, Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine (CCLV), Friedrich-Loeffler-Institute, Insel Riems, Germany). Standard procedures were followed. Briefly, KOP-R cells were cultivated for about 24h in 96-well tissue culture plates at 37°C/5% CO₂ in MEM with Earle's salts and L-glutamine (Gibco™ by life technologies, USA)

supplemented by 10% gamma irradiated fetal bovine serum (FBS; Biowest, South America), 1% non-essential amino acids and 1% pyruvate.

Heat-inactivated blood sera (30 min, 56°C) were diluted in log₂-steps and incubated with 100 TCID₅₀ of the respective virus in a 1+1 ratio at 37°C and 5% CO₂ overnight. The following day the pre-incubated serum-virus-mixtures were transferred to microtiter plates containing KOP-R cells in monolayers at a confluence of about 70-80%. At this point, the FBS content had been reduced to 2%. After incubating at 37°C/ 5% CO₂ for another 72h, cells were evaluated for virus growth using an inverted microscope. A replicate was considered infected when at least one focus was observed. Vice versa neutralization of infectivity was scored only when neutralization was complete and no cytopathic effect at all could be observed.

PCR-Analyses

Samples

239 tissue samples from teat-, udder-, or muzzle lesions (n=113), corresponding lymph nodes (n=85), and in some cases trigeminal ganglia (n=41) from altogether 111 animals (107 bovines, 3 sheep, 1 goat) were included in this study. As BoHV-2 antibodies were clearly more prevalent in South Bavaria, the sampling focused on this region. Practitioners in the field were asked for special attention to udder and teat lesions and to send in samples. Most samples, however, were taken at the pathology department of the Bavarian Health and Food Safety Authority. It was decided to test tissues from all kinds of visible lesions at the udder and the teats, to ensure that no putative disease status – including reactivation – was missed.

Furthermore, lesions at the muzzle and mucosa of the mouth of calves had been reported in the context of BoHV-2 infections, as well as virus isolation not only from these lesions but also from nasal swabs during acute infection and upon experimental reactivation (11). In consequence, not only such lesions were taken as an indication for analysis, but also case histories of respiratory disease or mucosal reddening. Respective nasal swabs (n=918) were included with the intention to possibly detect reactivated BoHV-2 infections in the course of stress and clinical disease of any other cause.

PCR

Nucleic acids from tissue samples were either extracted using a magnetic processor (BioSprint96, Qiagen) and the BioSprint96 One-For-All Vet Kit or manually with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Nucleic acids from nasal swabs were purified by means of the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), which has been thoroughly validated and is routinely used also for the detection of viral DNA in the laboratory. As to date very little sequence information is available on BoHV-2 genomes and as the aim of the study was the detection of putative actual and local strains in Bavaria, a multi PCR-strategy was chosen.

Real time PCR targeting sequences within the glycoprotein B (gB) gene:

Published and self-generated sequences of the conserved glycoprotein B gene of different BoHV-2 strains (RVB-0062 and RVB-0064; Collection of Viruses in Veterinary Medicine, Friedrich Loeffler-Institute, Insel Riems, Germany), were used for sequence alignment (Clustal W version 2.1). Two primer and probe combinations, the BoHV2-Mix2.1 qPCR and the BoHV2-Mix2.3 qPCR were applied in parallel. In a total reaction volume of 20 μ l (including 5 μ l of template DNA) the respective primers (*BoHV2-Mix2.1 qPCR*: BoHV2-gB-2.1F: 5'-GAG GGC ATC GCC GTA ATC-3', BoHV2-gB-2.1R: 5'- CAG TCA CGG CCT TGT AGT AC-3'; *BoHV2-Mix2.3 qPCR*: BoHV2-gB-2.2F: 5'-CAT CGC CGT AAT CTT CAA GGA-3'; BoHV2-gB-2.1R: see above) were added to a final concentration of 0.8 μ M and the probe to 0.2 μ M (BoHV2-gB-2FAM: 5'-FAM-ACC TCG CGC CGT ACA AGT TTA AGG C-BHQ1-3'). In a Bio-Rad CFX 96™ Real-Time PCR Detection System DNA was amplified basing on the cycling protocol of the PerfeCta MultiPlex qPCR ToughMix (Quanta BioScience). Amplification started with an initial denaturing step of 10 min (95°C), followed by 40 cycles of denaturation (95°C, 15s) and primer annealing and extension (60°C, 60s).

Conventional PCR targeting sequences within the DNA polymerase gene:

The protocol described by Cargnelutti, Weiblen (41) was slightly altered, in as much as the HotStarTaq Polymerase (Qiagen) was used in a total volume of 50 μ l, containing 5 μ l template DNA and in addition Q-Solution and MgCl₂. The cycling protocol differed from the manufacturer's instructions as annealing was done at 46°C (60s), as 45 cycles were used, and as the final

extension was shortened to 7min.

PanHerpes PCR targeting the highly conserved sequences within the herpesviral DNA polymerase gene: This PCR protocol has been designed and proven valuable for the detection of a broad range of herpesviral genomes (33). The HotStarTaq polymerase (Qiagen) was used as described above, otherwise following the procedures published by Ehlers et (33).

For the newly established real time PCR and the conventional PCRs targeting the DNA-polymerase or the gB gene, specificity was tested using the following putatively contaminating viruses: BoHV-1, *Equid alphaherpesvirus 1* (family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*), *Bovine gammaherpesvirus 4* (family *Herpesviridae*, subfamily *Gammaherpesvirinae*, genus *Rhadinovirus*), OvHV-2, *Orf virus* (family *Poxviridae*, subfamily *Chordopoxvirinae*, genus *Parapoxvirus*), *Pseudocowpox virus*, (family *Poxviridae*, subfamily *Chordopoxvirinae*, genus *Parapoxvirus*), *Bovine papular stomatitis virus* (family *Poxviridae*, subfamily *Chordopoxvirinae*, genus *Parapoxvirus*), *Lumpy skin disease virus* (family *Poxviridae*, subfamily *Chordopoxvirinae*, genus *Capripoxvirus*), *Bluetongue virus-4* and *-8* (family *Reoviridae*, subfamily *Sedoreovirinae*, genus *Orbivirus*), *Pestivirus* (formerly: Bovine viral diarrhea virus; family *Flaviviridae*, genus *Pestivirus*), and samples containing virus of the genus *Orthopoxvirus* (family *Poxviridae*, subfamily *Chordopoxvirinae*) or of the family *Papillomaviridae*. PCR protocols were also analyzed for reproducibility and sensitivity. Sensitivity was calculated in numbers of genome copies that were reproducibly detectable. The efficiency of nucleic acid purification as well as the influence of inhibitory effects was controlled for all samples detecting beta-actin sequences by real time PCR as it has been described (42).

Abbreviations

BHM: Bovine herpes mammillitis; BoHV-1/-2: *Bovine Alphaherpesvirus 1/2*; CI: Confidence interval; CpHV-2: *Caprine Gammaherpesvirus 2*; DIVA: differentiation of infected and vaccinated animals; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FBS: Fetal bovine serum; gB/E: glycoprotein B/E; KOP-R: bovine oropharyngeal cells; MEM: minimum essential medium; OR: Odds Ratios; OvHV-2: *Ovine Gammaherpesvirus 2*; PCR: polymerase chain

reaction; SNT: serum neutralization test

Acknowledgments

Special thanks to our pathologists Wolfram Breuer, Udo Ebert, Anne Kupca, and Kim Weber for supplying interesting samples to this study. The authors thank Corinna Ismaier for the excellent assistance in designing the figures and Andrea Buchholz for language proofreading. We appreciate the financial support of the Bavarian State Ministry of the Environment and Consumer Protection that funded this study.

References

1. Virus Taxonomy: 2018 Release: ICTV; 2018 <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed 14 January 2019
2. Martin WB, Martin B, Hay D, Lauder IM. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *The Veterinary record*. 1966;78(14):494-7.
3. Janett F, Stauber N, Schraner E, Stocker H, Thun R. [Bovine herpes mammillitis: clinical symptoms and serologic course]. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*. 2000;142(7):375-80.
4. Johnston WS, Wray C, Scott JA. An outbreak of bovine herpes mammillitis in a suckler herd. *The Veterinary record*. 1971;88(14):372.
5. Castrucci G, Pedini B, Cilli V, Arancia G. Characterisation of a viral agent resembling bovine herpes mammillitis virus. *The Veterinary record*. 1972;90(12):325-35.
6. Kemp R, Holliman A, Nettleton PF. Atypical bovine herpes mammillitis affecting cows and calves. *The Veterinary record*. 2008;163(4):119-21.
7. Watanabe TTN, Moeller RB, Jr., Crossley BM, Blanchard PC. Outbreaks of bovine herpesvirus 2 infections in calves causing ear and facial skin lesions. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2017;29(5):686-90.

8. Martin WB, James ZH, Lauder IM, Murray M, Pirie HM. Pathogenesis of bovine mamillitis virus infection in cattle. *American journal of veterinary research*. 1969;30(12):2151-66.
9. Gibbs EP, Johnson RH, Osborne AD. Experimental studies of the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *Research in veterinary science*. 1973;14(2):139-44.
10. Martin WB, Scott FM. Latent infection of cattle with bovid herpesvirus 2. *Archives of virology*. 1979;60(1):51-8.
11. Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, Ranucci S, Cilli V, Tesei B, et al. Reactivation in calves of Bovid herpesvirus 2 latent infection. *Archives of virology*. 1982;72(1-2):75-81.
12. Hofmann M, Engels M, Metzler A, Wyler R. Reaktivierung einer latenten Bovinen Herpesmamillitisvirus (BHV-2)-Infektion bei einem Tier mit fraglicher IBR-Serologie. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 1987;129:437-42.
13. Castrucci G. A comparison in calves of the antigenicity of three strains of bovid herpesvirus 2. *Research in veterinary science*. 1975;18(2):208-15.
14. Campos FS, Franco AC, Oliveira MT, Firpo R, Strelczuk G, Fontoura FE, et al. Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Veterinary microbiology*. 2014;171(1-2):182-8.
15. Torres FD, Almeida SR, Silva MS, Weiblen R, Flores EF. Distribution of latent bovine herpesvirus 2 DNA in tissues of experimentally infected sheep. *Research in veterinary science*. 2009;87(1):161-6.
16. Plowright W, Jessett DM. Investigations of Allerton-type herpes virus infection in East African game animals and cattle. *The Journal of hygiene*. 1971;69(2):209-22.
17. Castrucci G, Cilli V, Andati HG. A serologic survey in cattle to bovid herpesvirus 2. *Bollettino dell'Istituto sieroterapico milanese*. 1974;53(5):645-50.

18. Thiry E, Vercouter M, Dubuisson J, Barrat J, Sepulchre C, Gerardy C, et al. Serological survey of herpesvirus infections in wild ruminants of France and Belgium. *Journal of wildlife diseases*. 1988;24(2):268-73.
19. Scott FM, Martin WB, Goudswaard J. Antibody to bovid herpesvirus 2 in the sera from cattle in the Netherlands. *The Veterinary record*. 1978;102(21):464.
20. Pastoret P-P, Antoine H, Schwers A, Thiry E, Castrucci G, editors. Enquête sérologique sur l'infection par le virus de la mamillite herpétique bovine (Bovine herpesvirus 2, BHV 2) en Belgique. *Annales de Médecine Vétérinaire*; 1983: Université de Liège.
21. Müller R, Engels M, Metzler AE, Boller H, Wyler R. [1st cured case of bovine herpes mamillitis in Switzerland]. *Tierärztliche Praxis*. 1984;12(3):297-305.
22. Letchworth GJ, 3rd, LaDue R. Bovine herpes mammillitis in two New York dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1982;180(8):902-7.
23. Gibbs EP, Johnson RH, Osborne AD. Field observations on the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *The Veterinary record*. 1972;91(17):395-401.
24. Engels M, Metzler A, Wyler R. [Virus seeks its disease: a seroepizootiological study of the presence of bovine herpes mammillitis in Switzerland]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 1979;121(11):565-76.
25. Rweyemamu MM, Johnson RH, Laurillard RE. Serological findings in bovine herpes mammillitis. *The British veterinary journal*. 1969;125(7):317-25.
26. Böttcher J, Boje J, Janowetz B, Alex M, König P, Hagg M, et al. Epidemiologically non-feasible singleton reactors at the final stage of BoHV1 eradication: serological evidence of BoHV2 cross-reactivity. *Veterinary microbiology*. 2012;159(3-4):282-90.

27. Council Directive 64/432/EEC of 26 June 1964 on animal health problems affecting intra-Community trade in bovine animals and swine: EUR-Lex; 1964 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31964L0432>. Accessed 14 June 2019
28. Sterz H, Ludwig H, Rott R. Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammillitis virus. *Intervirology*. 1974;2(1):1-13.
29. Levings RL, Kaeberle ML, Reed DE. Cross-reactions of bovine herpesvirus 1 antigens with those of other cattle herpesviruses. *Veterinary microbiology*. 1984;9(4):329-44.
30. Ehlers B, Goltz M, Ejercito MP, Dasika GK, Letchworth GJ. Bovine herpesvirus type 2 is closely related to the primate alphaherpesviruses. *Virus genes*. 1999;19(3):197-203.
31. Hammerschmidt W, Conraths F, Mankertz J, Pauli G, Ludwig H, Buhk HJ. Conservation of a gene cluster including glycoprotein B in bovine herpesvirus type 2 (BHV-2) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *Virology*. 1988;165(2):388-405.
32. Castrucci G, Frigeri F, Cilli V, Tesei B, Arush AM, Pedini B, et al. Attempts to reactivate bovid herpesvirus-2 in experimentally infected calves. *American journal of veterinary research*. 1980;41(11):1890-3.
33. Ehlers B, Borchers K, Grund C, Frolich K, Ludwig H, Buhk HJ. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus genes*. 1999;18(3):211-20.
34. Kalman D, Egyed L. PCR detection of bovine herpesviruses from nonbovine ruminants in Hungary. *Journal of wildlife diseases*. 2005;41(3):482-8.
35. Letchworth GJ, Carmichael LE. Local tissue temperature: a critical factor in the pathogenesis of bovid herpesvirus 2. *Infection and immunity*. 1984;43(3):1072-9.

36. Passariello R, Simonetti G, Rossi P, Castrucci A, Castrucci M, Pavone P, et al. Digital video subtraction angiography for routine peripheral arteriography. *Annales de radiologie*. 1982;25(7):455-9.
37. Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV1-Verordnung): Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, Bundesamt für Justiz; 2016 <https://www.gesetze-im-internet.de/bhv1v/BJNR275800997.html>. Accessed 14 June 2019
38. Conraths FJ, Fröhlich A, Gethmann J, Ziller M. Epidemiologische untersuchungen in Tierpopulationen: Ein Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen. Friedrich–Loeffler-Institut, Wusterhausen und Greifswald-Insel Riems. 2015.
39. Moussa A, Fedida M, Millet A, Arnaud G, Lecomte J. Étude clinique et virologique de cas de thélite ulcérate bovine apparus dans l’Orne en 1981. *Rec Méd vét*. 1982;158(2):197-203.
40. Gonano M, Pikalo J, Schiefer P, Eichinger M, Wodak E, Loitsch A, et al. Einsatzmöglichkeit eines kommerziellen BoHV-2-ELISAs in der Routinediagnostik boviner Herpesviren. Berlin: DACH Epidemiologie Tagung; 2015.
41. Cargnelutti JF, Weiblen R, Flores EF. A multiplex PCR for viruses associated with exanthematic and vesicular disease in cattle. *Journal of virological methods*. 2017;239:38-41.
42. Wernike K, Hoffmann B, Kalthoff D, König P, Beer M. Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. *Journal of virological methods*. 2011;174(1-2):77-84.

IV. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, Daten über BoHV-2-Infektionen in der bayerischen Rinderpopulation zu erarbeiten. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf Analysen zur Bestimmung der Seroprävalenz. Da regionale Unterschiede innerhalb Bayerns erwartet wurden, sollte auch auf diesen Aspekt eingegangen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass in Betrieben, mit unspezifischen, sogenannten „nicht-negativen“ Reaktionen von Rinderseren in BoHV-1-Ak-ELISA-Systemen, gleichzeitig eine erhöhte BoHV-2-Seroprävalenz beobachtet wird (BÖTTCHER et al., 2012). Daher wurden alle Proben sowohl in BoHV-2-spezifischen als auch in BoHV-1-spezifischen, serologischen Nachweissystemen vergleichend untersucht. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeiten lag auf virologischen Aspekten aktueller BoHV-2-Infektionen. Hierfür stand zunächst die Etablierung einer spezifischen und sensitiven, routinetauglichen PCR-Methodik im Vordergrund. Da keine Informationen über aktuelle Verlaufsformen der Infektion in Bayern vorlagen, wurde ein breites Spektrum an Proben verschiedener Haus- und Wildwiederkäuer gesammelt und auf BoHV-2-Genom untersucht.

1. Untersuchungen zur Seroprävalenz von BoHV-2-Infektionen in Bayern

1.1. Auswahl von Serumproben zur Untersuchung auf BoHV-2-Antikörper

Die BoHV-2-Seroprävalenz sollte für ganz Bayern bestimmt und gleichzeitig mögliche regionale Unterschiede innerhalb Bayerns berücksichtigt werden. Im südwestlich gelegenen Regierungsbezirk Schwaben sind BoHV-2-Ak in Rinderseren bereits nachgewiesen (BÖTTCHER et al., 2012). Um eine Vergleichbarkeit mit den anderen Regierungsbezirken Südbayerns, Ober- und Niederbayern, zu ermöglichen, wurden die Daten auf der Ebene der Regierungsbezirke erfasst. Die vier nordbayerischen Regierungsbezirke Oberpfalz, Unter-, Mittel- und Oberfranken wurden für diesen Vergleich zu einer Region „Nordbayern“ zusammengefasst betrachtet. Auf diesem Gebiet befinden sich nur etwa ein Drittel aller bayerischen Rinderhaltungen (Stand

November 2017; ANONYMUS (2017)). Zudem wurde aufgrund der Untersuchungsergebnisse von BÖTTCHER et al. (2012) von einer niedrigen BoHV-2-Seroprävalenz im Norden Bayerns ausgegangen, wodurch eine detailliertere Betrachtung der einzelnen nordbayerischen Regierungsbezirke nicht sinnvoll erschien.

Das Ziel war es, BoHV-2-Seroprävalenzen auf Bestandsebene jeweils mit einer statistischen Sicherheit von 95% bei einer Genauigkeit von mindestens 5% zu schätzen. Da bisher keine statistisch verwertbaren Daten zur Verfügung standen, BoHV-2-Ak aber wiederholt bei Rindern im Südwesten Bayerns nachgewiesen wurden (BÖTTCHER et al., 2012), wurde für die Berechnung des Stichprobenschlüssels für den südwestlichen Regierungsbezirk Schwaben eine Seroprävalenz von 10% angenommen. Den Berechnungen der Zielstichproben aus den beiden östlicher liegenden Regierungsbezirken Ober- und Niederbayern sowie aus der Einheit Nordbayern wurde eine Seroprävalenz von jeweils 5% zu Grunde gelegt. Es wurden unendliche Grundgesamtheiten angenommen, um die Genauigkeit der Schätzung zu verbessern. Daraus resultierte ein erforderlicher Stichprobenumfang von mindestens 73 Betrieben aus Nordbayern, 73 Betrieben aus Niederbayern, 73 Betrieben aus Oberbayern und 139 Betrieben aus Schwaben.

Die tatsächlich durchgeführte Berechnung der BoHV-2-Seroprävalenz basierte schließlich auf der Untersuchung von Rinderseren aus 105 nordbayerischen ($n_{\text{Seren}}=1916$), 78 niederbayerischen ($n_{\text{Seren}}=1070$), 82 oberbayerischen ($n_{\text{Seren}}=1200$) und 141 schwäbischen Betrieben ($n_{\text{Seren}}=2615$). Die Proben stammten aus dem Probenpool der für die Überwachung der BoHV-1-Freiheit an das Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) eingesendeten Rinderseren. Wie in der Publikation ausführlich dargestellt, wurden Rinder mit BoHV-2-spezifischen Ak in 4,76% (CI 2,69%-6,83%) der nordbayerischen, 3,85% (CI 1,98%-5,72%) der niederbayerischen, 20,73% (CI 16,79%-24,67%) der oberbayerischen und 37,59% (CI 32,88%-42,30%) der schwäbischen Betriebe detektiert. In ganz Bayern lag der Prozentsatz bei 19,21% (CI 15,38%-23,04%). Rückschlüsse auf die Seroprävalenzen der Gesamtheit bayerischer Rinderhaltungen sind mit Hilfe von 95%-Konfidenzintervallen (CI) möglich, welche die wahren Seroprävalenzen

mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95% überdecken. Die Grenzen der resultierenden Intervalle sind für die einzelnen Regionen jeweils in Klammern angegeben.

Um die Repräsentativität der Stichprobe zu erhöhen, wurden die Betriebe zufällig und in Abhängigkeit von der Anzahl der Rinderhaltungen in den jeweiligen Regionen (Schwaben, Oberbayern, Niederbayern, Nordbayern) ausgewählt. Die erforderliche Anzahl der zu untersuchenden Betriebe pro Region sollte zudem in Relation zur Menge der Rinderhaltungen in den Landkreisen und kreisfreien Städten stehen. Das gesetzte Probenziel konnte nicht für alle Gebiete vollständig erfüllt werden, da zum Teil nicht von einer ausreichenden Anzahl von Betrieben Proben zur Untersuchung eingesendet worden waren. So wurde beispielweise für den Regierungsbezirk Schwaben die notwendige Stichprobenzahl in den Landkreisen bzw. kreisfreien Städten Kaufbeuren ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=1$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=0$), Aichach-Friedberg ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=8$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=2$), Augsburg ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=10$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=6$), Lindau am Bodensee ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=8$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=6$) und Unterallgäu ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=24$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=18$) nicht erreicht. Zum Ausgleich wurden Proben aus den regional unmittelbar benachbarten Landkreisen bzw. kreisfreien Städten Kempten im Allgäu ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=1$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=2$), Dillingen an der Donau ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=7$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=8$), Günzburg ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=9$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=10$), Ostallgäu ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=30$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=37$), Donau-Ries ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=10$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=13$) und Oberallgäu ($n_{\text{Betriebe benötigt}}=27$, $n_{\text{Betriebe beprobt}}=34$) hinzugezogen, um die für den Regierungsbezirk Schwaben erforderliche Stichprobenanzahl zu erreichen. Auf diese Weise konnten die Kriterien an eine Schätzung der BoHV-2-Seroprävalenz auf Ebene der Regionen sinnvoll erfüllt werden.

Der untersuchte Probenpool wurde aus Serumproben von Rindern ausgewählt, die blutserologisch und nicht über die Tankmilch auf BoHV-1-Ak untersucht wurden. Dieses Vorgehen wird gemäß BHV-1-Verordnung (ANONYMUS, 2016b) regulär für Betriebe mit einem geringen Anteil an Milchkühen gewählt oder für nicht-milchliefernde Betriebe, wie zum Beispiel für Mutterkuhhaltungen oder Aufzucht- und Mastbetriebe. Auch Betriebe, in welchen zuvor Tiere mit nicht-negativen Reaktionen auffällig waren, werden

in der Folgeuntersuchung blutserologisch überprüft. Dies erfolgt in der Regel allerdings nicht am LGL. Daher lag der Fokus der Arbeiten hauptsächlich auf nicht-milchliefernden Rinderhaltungen bzw. auf Betrieben mit geringem Milchkuh-Anteil. Ausbrüche klinischer BoHV-2-Infektionen wurden in den meisten publizierten Fällen in Form einer BHM in Milchviehbetrieben beobachtet (zum Beispiel DEAS und JOHNSTON (1966); MARTIN et al. (1966a); GIBBS et al. (1972); LETCHWORTH und LADUE (1982); MÜLLER et al. (1984); siehe auch Kapitel II.1.6). Daher wird die indirekte Virusübertragung während des Melkvorgangs als wichtiger Ausbreitungsmechanismus für BoHV-2-Infektionen diskutiert (DEAS und JOHNSTON, 1966; MARTIN et al., 1966a; MARTIN et al., 1969). Dieser Weg der Virusübertragung entfiel in den meisten der hier untersuchten Betriebe aufgrund der Nutzungsart. Daher könnten die in dieser Arbeit ermittelten Seroprävalenzen das tatsächliche BoHV-2-Infektionsgeschehen in der bayerischen Rinderpopulation - milchliefernde Betriebe eingeschlossen - möglicherweise sogar unterbewerten.

Interessanterweise war der Anteil der Betriebe mit BoHV-2-Ak positiven Rindern in einer früheren Studie, in welcher vorselektierte Rinderseren aus bayerischen, milchliefernden Betrieben (n=55) auf die Präsenz von BoHV-2-Ak untersucht wurden, tatsächlich höher, nämlich bei 56,36% (entspricht 31 von 55 Betrieben; BÖTTCHER et al., 2012). Statistisch sind die damals erhobenen Daten für diese Fragestellung allerdings nicht repräsentativ, da der Fokus der Studie nicht primär auf dem Nachweis von BoHV-2-Infektionen lag. Die Auswahl der Betriebe und Proben fand nicht unter statistischen Gesichtspunkten statt, sondern unterlag einem deutlichen Bias, da die Betriebe anhand der Ergebnisse der milchserologischen Untersuchung von Tankmilchproben auf BoHV-1-Ak und somit auch anhand der Herkunft innerhalb Bayerns vorselektiert waren.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit erstmals statistisch bewertbare Untersuchungen zur BoHV-2-Seroprävalenz in Bayern durchgeführt. Serumproben stammten von Rindern aus ganz Bayern und wurden in Abhängigkeit von der Verteilung der Rinderhaltungen je Region gewählt. Es wurde somit eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Regionen

gewährleistet. Der im Vorfeld erstellte Stichprobenplan ermöglicht statistisch valide Aussagen über die BoHV-2-Seroprävalenz innerhalb der zur Verfügung stehenden Population. In weiteren Arbeiten können auf der Grundlage der in dieser Arbeit ermittelten Daten weitere Entwicklungen erkannt und quantifiziert werden.

1.2. Regionaler Vergleich von BoHV-2-Seroprävalenzen

Für die Bestimmung der BoHV-2-Seroprävalenz in Bayern wurden 6801 Rinderseren aus 406 bayerischen Betrieben auf BoHV-2-spezifische Ak getestet. Antikörper wurden in 5,51% der Proben nachgewiesen. Rückschließend auf die Gesamtheit bayerischer Rinder ist von einer Seroprävalenz zwischen 4,97% und 6,06% (CI; siehe Kapitel IV.1.1) auszugehen. BoHV-2-Ak positive Rinder wurden in 19,21% (CI 15,38%-23,04%) der untersuchten Betriebe gehalten.

Serologische Untersuchungen ergaben in der Schweiz BoHV-2-Ak-Reaktivitäten von 6,4% bis 7,7% (ENGELS et al., 1979), in Italien 8,25% bis 13,89% (CASTRUCCI et al., 1974), in West-England 5,7% bis 19,5% (RWEYEMAMU et al., 1969), in Belgien 27,5% (PASTORET et al., 1983) und in den Niederlanden 37,7% (SCOTT et al., 1978) in den jeweils untersuchten Serumproben. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Studien untereinander sowie mit denen der vorliegenden Arbeit ist jedoch schwierig, da sich die Anzahl der untersuchten Seren sowie die Kriterien für die Auswahl der Proben stark unterscheiden. Zum Teil wurden Blutseren von Rindern an nationalen Schlachthöfen oder in nicht-näher spezifizierten Betrieben entnommen (CASTRUCCI et al., 1974; SCOTT et al., 1978; ENGELS et al., 1979; PASTORET et al., 1983). Andere Proben stammten aus Betrieben mit bekannten Eutererkrankungen, die virologisch nicht auf BoHV-2 zurückzuführen waren (RWEYEMAMU et al., 1969; ENGELS et al., 1979).

Auffällig ist dennoch der in der Schweiz vergleichsweise geringe Anteil Ak-positiver Rinder. Die in der vorliegenden Arbeit für Bayern ermittelte BoHV-2-Seroprävalenz von 5,51% (CI 4,97%-6,06%) liegt ebenfalls in diesem Bereich. Möglicherweise hängt dies mit der Bekämpfung von BoHV-1-Infektionen in beiden Ländern zusammen. Da die sogenannten „nicht-negativen“ Reaktionen in BoHV-1 ELISA Systemen im statistischen

Zusammenhang mit der Präsenz von BoHV-2-Ak stehen (BÖTTCHER et al. (2012); SCHIEFER (2016); TAVELLA (2016); diese Studie, siehe auch Kapitel IV.1.4.1), könnte die staatliche BoHV-1-Bekämpfung, die auf diesen serologischen Testsystemen basiert, auch zu einer Reduktion BoHV-2-Ak positiver Rinder geführt haben.

In der Schweiz liegt die aktive BoHV-1-Bekämpfung bereits einige Jahrzehnte zurück. Wie auch in Bayern wurden dort schon vor dem staatlich geregelten Programm zur Tilgung von BoHV-1-Infektionen Maßnahmen zur Eindämmung der Infektionen getroffen, denn bereits in den Jahren 1978 bis 1982 wurden jährlich zwischen 4000 und 9000 BoHV-1-AK positive Tiere geschlachtet (ACKERMANN et al., 1989). Gleichzeitig könnte eine Entfernung von Rindern mit nicht-negativen Reaktionen und somit auch von BoHV-2-Ak positiven Rindern stattgefunden haben, sodass in der etwa gleichzeitig stattfindenden Studie von ENGELS et al. (1979) eine im internationalen Vergleich relativ niedrige BoHV-2-Seroprävalenz resultierte. In Bayern fand die aktive BoHV-1-Bekämpfung 2011 ihr erfolgreiches Ende, woraufhin das Bundesland den Status „frei von der infektiösen bovinen Rhinotracheitis“ (ANONYMUS, 2011) gemäß Artikel 10 der Richtlinie 64/432/EWG (ANONYMUS, 1964) erhielt. Dies könnte ebenfalls zu der aktuellen, vergleichsweise niedrigen BoHV-2-Seroprävalenz geführt haben. Im Gegensatz dazu hat in den Ländern Italien, Belgien, Niederlande und England, in welchen höhere BoHV-2-Seroprävalenzen detektiert wurden, zum Untersuchungszeitpunkt keine derartige Tilgung von BoHV-1-Seroreagenten stattgefunden.

Zusammenfassend erscheint die in dieser Studie für Bayern erfasste BoHV-2-Seroprävalenz im internationalen Vergleich eher niedrig. Als mögliche Ursache wurde eine technische Auswirkung des BoHV-1-Bekämpfungsverfahrens auf die Prävalenz von BoHV-2-Infektionen diskutiert. Es wäre daher möglich, dass wenn in Zukunft vermehrt zwischen nicht-negativen und spezifischen BoHV-1-Reaktionen differenziert wird, die BoHV-2-Seroprävalenzen wieder deutlich ansteigen. Verstärkt werden könnte dieser Effekt noch durch eine gegenseitige virologische Beeinflussung von BoHV-1- und BoHV-2-Infektionen, wie sie durch CASTRUCCI et al. (1980)

gezeigt wurde. Bei gleichzeitiger BoHV-1-Infektion blieb die Reaktivierung der experimentellen BoHV-2-Infektion aus. Mit zunehmender BoHV-1-Freiheit fiel dieser virologische Einfluss weg und die Ausbreitung der BoHV-2-Infektionen würde erleichtert. Schließlich könnte der Eintrag von BoHV-2-Infektionen in aktuell nicht betroffene Regionen auch noch durch die erleichterten Handelsbedingungen zwischen BoHV-1-freien Regionen/Ländern gemäß Artikel 10 der Richtlinie 64/432/EWG (ANONYMUS, 1964) verstärkt werden.

1.3. BoHV-2-Seroprävalenz innerhalb bayerischer Betriebe

In einem nächsten Schritt wurde der Anteil BoHV-2-Ak positiver Rinder in den 78 betroffenen Betrieben analysiert. Aus diesen Betrieben standen 1516 Seren zur Verfügung, in 375 wurden BHV-2-Ak nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Figure 4 der Publikation SINGER et al. (2020) dargestellt.

Die für BoHV-Analysen zur Verfügung stehenden Proben wurden im Rahmen der staatlichen Überwachung der Freiheit von BoHV-1-Infektionen eingesendet. Die Anzahl und Auswahl der Tiere je Betrieb, richtete sich nach den Vorgaben der BHV1-Verordnung. In Abhängigkeit von der Nutzungsart umfasst die Auswahl der Rinder pro Betrieb, die auf BoHV-1-Ak untersucht werden müssen, zum Teil nicht alle bestandseigenen Rinder (ANONYMUS, 2016b). So werden aus Betrieben mit einem Milchkuh-Anteil von mindestens 30% nur die über neun Monate alten, weiblichen Rinder sowie alle zur Zucht vorgesehenen männlichen Rinder regelmäßig auf BoHV-1-Ak untersucht. Besteht ein Bestand zu mehr als 50% aus Jungvieh unter neun Monaten, wird eine Stichprobe untersucht, welche ausreichend viele Tiere umfasst, sodass eine BoHV-1-Infektion mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% und einer Prävalenzschwelle von 5% detektiert werden kann. In Betrieben mit einem Milchkuh-Anteil von unter 30% umfassen die Untersuchungen dagegen alle weiblichen Tiere sowie die zur Zucht vorgesehenen männlichen Rinder (ANONYMUS, 2016b). Bei den in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Proben war in der Regel nicht ersichtlich, zu welcher Kategorie der jeweilige Betrieb gehörte und von welchem Anteil der Rinder Proben eingesandt wurden. Die innerbetriebliche BoHV-2-Seroprävalenz ist in dieser Studie daher definiert als „Anzahl BoHV-2-Ak positiver Seren pro Anzahl

untersuchter Seren pro Betrieb“. In einem Extremfall führte das dazu, dass aus einem Bestand mit einer Kuh und zwei Jungrindern gemäß BHV1-Verordnung nur die Serumprobe der Kuh zur Untersuchung eingeschickt werden musste. Dieses Tier repräsentierte somit den ganzen Betrieb und da in dem Serum dieser Kuh BoHV-2-spezifische Ak nachgewiesen wurden, wurde der Betrieb mit einer Seroprävalenz von 100% dokumentiert. Aus den übrigen Betrieben (n=77) wurden jeweils zwischen vier und 96 Seren untersucht. Um diese beträchtlichen Unterschiede in der Anzahl der je Betrieb untersuchten Proben darzustellen, wurde die jeweils untersuchte Probenanzahl in Figure 4 der Publikation SINGER et al. (2020) mittels verschieden Symbolen differenziert.

Für die in dieser Arbeit ermittelten 78 „BoHV-2-positiven Betriebe“ wurden individuelle, innerbetriebliche BoHV-2-Seroprävalenzen zwischen 2% und 100% festgestellt. In 51% dieser Betriebe hatten bis zu 25% der untersuchten Tiere Antikörper, in 37% der Betriebe waren es zwischen 25% bis 50% und lediglich in 12% der Betriebe waren es mehr als 50%.

BÖTTCHER et al. (2012) untersuchten Proben von 1055 Rindern aus 42 Betrieben aus dem Südwesten Bayerns auf BoHV-2-Ak. Aus Betrieben, die im Rahmen der Überwachung der BoHV-1-Freiheit durch nicht-negative BoHV-1-Reaktionen aufgefallen waren, wurden alle über neun Monate alten Tiere in die BoHV-2-Untersuchungen einbezogen ($n_{\text{Betriebe}}=19$, $n_{\text{Rinder}}=734$), wohingegen in BoHV-1-unauffälligen Betrieben jeweils eine Stichprobe von nur circa zehn Kühen getestet wurde ($n_{\text{Betriebe}}=23$, $n_{\text{Rinder}}=321$). In 16 der insgesamt 42 Betriebe hatten bis zu 25% der untersuchten Tiere Ak gegen BoHV-2, in weiteren 14 Betrieben lag der Anteil Ak-positiver Rinder über 25%. In den verbleibenden zwölf Betrieben wurden keine Ak gegen BoHV-2 nachgewiesen (BÖTTCHER et al., 2012). Die relativ große Anzahl der Betriebe mit hoher BoHV-2-Seroprävalenz ist auf die Vorselektion der Proben zurückzuführen, wie bereits im Kapitel IV.1.1 diskutiert.

Daten aus Italien weisen ebenfalls auf eine weite Streuung der innerbetrieblichen BoHV-2-Seroprävalenzen hin. CASTRUCCI et al. (1974) untersuchten 1079 Seren aus fünf nicht näher beschriebenen Milchviehherden aus den italienischen Regionen Lombardei, Latium, Umbrien, Kampanien und Sizilien mittels BoHV-2-SNT. Es waren 0% (0/112; Umbrien), 0,35%

(1/289; Lombardei), 2,39% (9/377; Kampanien), 4,06% (5/123; Sizilien) und 41,57% (74/178; Latium) der untersuchten Rinder BoHV-2-Ak positiv. In der letztgenannten Herde wurden zudem bei acht Kühen BoHV-2-typische Hautläsionen am Euter oder in der Maulhöhle festgestellt.

Ähnliche Ergebnisse liefern die vorhandenen Schweizer Daten, da in neun Betrieben mit BoHV-2-Ak-Nachweis der Anteil betroffener Tiere zwischen 4% ($n_{\text{Seren}}=25$, $n_{\text{BoHV-2-Ak positiv}}=1$) und 45% ($n_{\text{Seren}}=11$, $n_{\text{BoHV-2-Ak positiv}}=5$) lag. In weiteren 21 untersuchten Betrieben waren keine Antikörper nachzuweisen (ENGELS et al., 1979).

In zwölf nicht näher beschriebenen, niederländischen Rinderhaltungen lag die innerbetriebliche BoHV-2-Seroprävalenz in den Jahren 1972 bis 1973 zwischen 1,8% ($n_{\text{Seren}}=55$, $n_{\text{BoHV-2-Ak positiv}}=1$) und 100% ($n_{\text{Seren}}=12$, $n_{\text{BoHV-2-Ak positiv}}=12$) (SCOTT et al., 1978). In zwei der zwölf Betriebe war keines der Seren BoHV-2-Ak positiv. Aus den Angaben geht nicht hervor, nach welchen Kriterien die jeweiligen Betriebe für die Untersuchung ausgewählt wurden. Die Anzahl untersuchter Rinder pro Betrieb lag zwischen 7 und 84. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren keine Fälle von klinischer BHM bekannt (SCOTT et al., 1978).

Die Anzahl und Auswahl der Betriebe und Rinder ist zwischen den einzelnen Studien nicht vergleichbar, dennoch ist allen Studien die starke Varianz der innerbetrieblichen BoHV-2-Seroprävalenzen gemein, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Gründe für diese deutlichen Unterschiede könnten im individuellen Betriebsmanagement zu finden sein. Grundannahme ist, dass Ak-positive Rinder mit BoHV-2 infiziert sind, oder – wenn entsprechend junge Tiere berücksichtigt wurden – maternale Ak nachgewiesen wurden. Impfantikörper sind ausgeschlossen, da nicht gegen BoHV-2 geimpft wird. Die Reaktivierung einer latenten Herpesinfektion kann durch verschiedene Stressoren und Immunsuppression, wie zum Beispiel durch Transportstress, Crowding, Rangordnungskämpfe oder andere Infektionen getriggert werden. Denkbar wäre daher, dass Rinder in Betrieben mit höherer Seroprävalenz häufiger Stressoren ausgesetzt sind, die zu einer Reaktivierung von latenten BoHV-2-Infektionen und damit verbunden zur Virusausscheidung und der Ansteckung weiterer Rinder führen könnten.

Wiederholte Reaktivierungen würden zur Stabilisierung des Antikörperspiegels führen, während bei fehlender Restimulierung Ak unter den messbaren Wert fallen könnten. Ein Absinken der Seroprävalenzen würde daraus resultieren. Mögliche Ausscheidungs- bzw. Übertragungswege werden im Kapitel IV.2.2 diskutiert.

Die innerbetrieblichen BoHV-2-Seroprävalenzen liegen in Nordbayern mit einem Median von ca. 8% BoHV-2-seropositiver Rinder niedriger als in Südbayern. Hier lag der Median bei ca. 29% in Oberbayern, ca. 30% in Niederbayern, ca. 24% in Schwaben und in gesamt Bayern ebenfalls bei ca. 24% (siehe Fig. 4 der Publikation SINGER et al. (2020)). Allerdings wurden in Nord- und Niederbayern nur wenige Betriebe ($n_{\text{Nordbayern}}=5$, $n_{\text{Niederbayern}}=3$) mit BoHV-2-Ak positiven Rindern gefunden. In Oberbayern und Schwaben dagegen waren es deutlich mehr Betriebe ($n_{\text{Oberbayern}}=17$, $n_{\text{Schwaben}}=53$). Die hier ermittelten Seroprävalenzen sind daher repräsentativer, als die in Nord- bzw. Niederbayern aus den Daten nur einzelner Betriebe ermittelten.

In den Untersuchungen von BÖTTCHER et al. (2012) wurde ebenfalls eine Einteilung der Betriebe anhand der Region vorgenommen. Das Gebiet Schwaben wurde dem Nordosten Bayerns gegenübergestellt. Eine genauere regionale Zuordnung fehlt jedoch. Da im Nordosten Bayerns in keinem der elf untersuchten Betriebe Rinder mit BoHV-2-Ak detektiert wurden, fokussierten die Untersuchungen zur innerbetrieblichen BoHV-2-Seroprävalenz ausschließlich auf Betriebe in Schwaben. Hier stammten serologisch positive Rinder aus 30 von 42 Betrieben (BÖTTCHER et al., 2012).

Auch wenn keine direkt vergleichbaren Daten vorliegen, könnte über eine Ausbreitung von BoHV-2-Infektionen in den Norden Bayerns in den letzten Jahren spekuliert werden. Ein möglicher Weg wäre der Handel mit latent infizierten Tieren, da keine Restriktionen für BoHV-2-Infektionen vorliegen. Nachforschungen ergaben, dass von insgesamt acht BoHV-2-Ak positiven Rindern, die im Rahmen der vorliegenden Studie in Nordbayern detektiert wurden, fünf Rinder nicht im jeweiligen Betrieb geboren, sondern aus anderen Regionen, Bundesländern oder Ländern importiert wurden, in welchen BoHV-2-Infektionen zum Teil, zumindest serologisch nachgewiesen wurden. Interessant ist, dass die innerbetriebliche BoHV-2-Seroprävalenz in diesen

Rinderhaltungen relativ gering war. In vier der fünf betroffenen Betriebe waren lediglich zwischen 3% und 13% der untersuchten Tiere BoHV-2-Ak positiv, nur im fünften Betrieb waren es 40%. In zwei der fünf Rinderhaltungen waren die zugekauften Tiere sogar die einzigen mit BoHV-2-Ak-Befund. Diese Daten lassen auf eine geringe Effizienz der Ausbreitung der BoHV-2-Infektionen in diesen Betrieben schließen. Eine geringe Ausbreitungstendenz könnte auf einer geringen Kontagiösität aktueller BoHV-2-Stämme, auf einer geringen Reaktivierungsrate oder einer nur minimalen Ausscheidung nach Reaktivierung basieren. Bisher postulierte Übertragungswege für BoHV-2-Infektionen (siehe Kapitel II.1.6) hängen in der Regel von Läsionen ab, über die infektiöses Virus ausgeschieden und auf andere Individuen übertragen werden kann. Nach experimenteller Reaktivierung wurde BoHV-2 aber auch aus Nasen- und Vaginaltupfern isoliert (CASTRUCCI et al., 1982; HOFMANN et al., 1987).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass die BHM mit deutlichen Läsionen, wie sie in der Literatur (zum Beispiel MARTIN et al. (1964); DEAS und JOHNSTON (1966); PEPPER et al. (1966)) beschrieben wird, aktuell in Deutschland selten beobachtet wird. Gleichzeitig wurden auftretende, BHM-ähnliche Läsionen, von welchen Gewebeproben zur virologischen Untersuchung zur Verfügung standen, nicht mit BoHV-2-Infektionen assoziiert (siehe Kapitel IV.2.2). Dies und auch die Tatsache, dass auch in Nasentupferproben BoHV-2-Genom nicht nachgewiesen wurde, unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen über die Epidemiologie aktueller BoHV-2-Infektionen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit klar gezeigt, dass innerbetriebliche BoHV-2-Seroprävalenzen in bayerischen Rinderhaltungen variabel und meist niedrig sind und dass demzufolge aktuell nicht von einer effizienten Ausbreitung von BoHV-2-Infektionen ausgegangen werden muss. Dennoch findet eine Verbreitung der Infektionen zwischen Betrieben, zum Teil auch überregional, durch den Handel mit latent infizierten Tieren statt. Zu bedenken bleibt, dass Antikörpertiter mit der Zeit absinken und bei ausbleibender Reaktivierung der Infektion gegebenenfalls unter die Test-Nachweisgrenzen fallen. In der Literatur ist beschrieben, dass bereits vier

Monate nach dem Auftreten klinischer Symptome neutralisierende Ak kaum noch messbar sind (MARTIN et al., 1969). BoHV-2-Prävalenzen könnten daher auch innerbetrieblich tatsächlich höher sein als anhand der dargestellten Untersuchungsergebnisse angenommen.

1.4. Untersuchungen zu unspezifischen Reaktionen von Rinderseren in BoHV-1-Antikörper-ELISAs

1.4.1. Statistischer Zusammenhang zwischen der BoHV-2-Seroprävalenz und nicht-negativen Reaktionen in der BoHV-1-Überwachung

Unspezifische Reaktionen von Seren in BoHV-1-Ak-ELISAs stören die serologische Überwachung der BoHV-1-Freiheit. Als unspezifisch werden die Reaktionen dann eingeordnet, wenn sie nicht auf die Anwesenheit BoHV-1-spezifischer Ak zurückzuführen sind und der epidemiologische Hintergrund nicht nachvollziehbar ist. In einer Studie von BÖTTCHER et al. (2012) wurde gezeigt, dass in Betrieben, in welchen diese sogenannten „nicht-negative Reaktionen“ gehäuft auftreten, häufiger auch BoHV-2-Ak nachgewiesen werden, als in Betrieben ohne eine derartige Problematik. Die Wahrscheinlichkeit für BoHV-2-Ak positive Seren in BoHV-1-ELISAs zu reagieren ist gegenüber BoHV-2-Ak negativen Seren statistisch signifikant erhöht (BÖTTCHER et al., 2012). Die aufgeführte Problematik ist nicht nur aus Bayern, sondern auch in Südtirol und Österreich bekannt (SCHIEFER, 2016; TAVELLA, 2016). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte anhand der Untersuchungen von 6801 Seren aus 406 bayerischen Betrieben in BoHV-1- und BoHV-2-spezifischen serologischen Nachweissystemen der beschriebene Zusammenhang über die verschiedenen Regionen Bayerns untersucht werden. Wie in Abbildung 3 dargestellt, wurde zwischen „nicht-negativen“ und „Trachitest-positiven“ Seren unterschieden (siehe auch Methodenteil der Publikation SINGER et al. (2020)). Ganze Betriebe wiederum wurden anhand der Ergebnisse der serologischen Einzelergebnisse klassifiziert. Die Bezeichnung „nicht-negativ“ erhielten Betriebe, in welchen mindestens ein Serum mit entsprechendem Ergebnis detektiert wurde (n=33). Betriebe, in welchen neben klar BoHV-1-ELISA negativen Seren ausschließlich Trachitest-positive Seren detektiert wurden, wurden als Trachitest-positiv (n=52)

bezeichnet. Betriebe mit sowohl nicht-negativen als auch Trachitest-positiven Reaktionen (n=7) dagegen wurden zur Gruppe der nicht-negativen Betriebe gezählt.

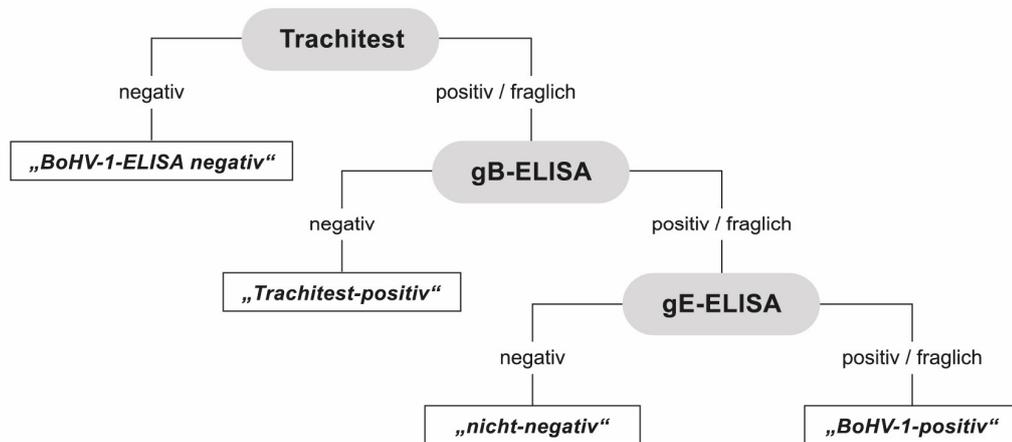


Abbildung 3: Klassifizierung von Seren anhand der Ergebnisse in BoHV-1-Antikörper-ELISAs. Die unterschiedlichen ELISAs (grau hinterlegt) wurden in der angegebenen Reihenfolge von oben nach unten angewendet und die Proben anhand der Ergebnisse klassifiziert

Von 6801 Rinderseren wurden 56 als nicht-negativ eingestuft. Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurden dann in 58,9% dieser Seren Ak gegen BoHV-2 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden nur in 33,0% der Trachitest-positiven Seren und 4,7% der BoHV-1-ELISA negativen Seren BoHV-2-Ak diagnostiziert. BoHV-1-nicht-negative Seren waren somit statistisch signifikant häufiger BoHV-2-Ak positiv ($p < 0,001$) als Trachitest-positive oder BoHV-1-negative Seren (siehe Tabelle 2 der Publikation). Auf Betriebsebene stellte sich ein ähnlicher Zusammenhang dar, denn in 67,5% der „nicht-negativen Betriebe“ wurde mindestens ein BoHV-2-Ak positives Rind gehalten (Tabelle 4). In Trachitest-positiven Betrieben war dies in nur 28,9% und in BoHV-1-ELISA negativen Betrieben in nur 11,5% der Fall.

Insgesamt wurden BoHV-2-Ak in 375 der 6801 untersuchten Seren detektiert (Tabelle 3). Davon reagierten 8,8% in BoHV-1-ELISAs (n=33) nicht-negativ und 8% Trachitest-positiv (n=30). Für die übrigen 6426 BoHV-2-Ak negativen Seren lag der Prozentsatz nicht-negativ reagierender Seren bei lediglich 0,4% (n=23) und der der Trachitest-positiven Seren bei 0,9% (n=60). Seren mit nicht-negativen Reaktionen stammten aus 27 (34,6%) der insgesamt 78 Betriebe mit BoHV-2-Ak positiven Rindern, lediglich Trachitest-positive Seren

kamen aus weiteren 15 Betrieben (19,2%) (Tabelle 4). Im Vergleich dazu wurden nur in 13 der 328 BoHV-2-negativen Betriebe (4,0%) Seren mit nicht-negativen Reaktionen detektiert und in 37 Betrieben (11,3%) Trachitest-positive Seren.

Tabelle 3: Darstellung der serologischen Untersuchungsergebnisse in BoHV-1- und BoHV-2-spezifischen Nachweissystemen

Anzahl der Seren	BoHV-2-Ak positiv	BoHV-2-Ak negativ	Gesamt
BoHV-1-nicht-negativ	33	23	56
Trachitest-positiv	30	60	90
BoHV-1-ELISA negativ	312	6326	6655
Gesamt	375	6426	6801

Die Klassifizierung der Seren erfolgte anhand der jeweiligen Ergebnisse in BoHV-1- und BoHV-2- spezifischen serologischen Testsystemen (ELISA und teilweise Absicherung durch SNT). „BoHV-1-nicht-negative“ Seren reagieren im Trachitest (BoHV-1-Vollvirus-ELISA) und im gB- ELISA positiv, im hochspezifischen gE-ELISA jedoch negativ. „Trachitest-positive“ Seren reagieren ausschließlich im Trachitest

Tabelle 4: Darstellung der Klassifizierung von 406 bayerischen Rinderhaltungen hinsichtlich der BoHV-1- und BoHV-2-Serologie

Anzahl der Betriebe	BoHV-2- positiv	BoHV-2- negativ	Gesamt
BoHV-1-nicht-negativ	27	13	40
Trachitest-positiv	15	37	52
BoHV-1-negativ	36	278	314
Gesamt	78	328	406

Die Klassifizierung von 406 bayerischen Rinderhaltungen erfolgte anhand der serologischen Untersuchungsergebnisse von 6801 Seren in BoHV-1- und BoHV-2 spezifischen Testsystemen (ELISA und teilweise Absicherung durch SNT). Ein Betrieb gilt als „BoHV-1-nicht-negativ“, wenn sich mindestens ein Rind mit diesem Ergebnis in dem Betrieb befindet. Dasselbe gilt für Betriebe mit der Bezeichnung „Trachitest-positiv“ oder „BoHV-2-positiv“. Betriebe mit Trachitest-positiven und nicht-negativen Untersuchungsergebnissen werden zu den „BoHV-1-nicht-negativen Betrieben“ gezählt

Ein Zusammenhang zwischen der BoHV-2-Seroprävalenz in Betrieben und dem Auftreten nicht-negativer BoHV-1-Reaktionen wurde erstmals durch BÖTTCHER et al. (2012) beschrieben. Der Fokus der Arbeiten lag auf epidemiologischen und serologischen Analysen zu den nicht-negativen Reaktionen und der Diskussion möglicher methodischer Lösungsansätze in der Überwachung der BoHV-1-Freiheit. Deshalb wurden Milchviehbetriebe nach den Ergebnissen der BoHV-1-Überwachungstests für weitere Untersuchungen ausgewählt. Es resultierte eine Einteilung der ausgewählten Betriebe in vier Gruppen: Betriebe mit nicht-negativen Reaktionen aus Schwaben („Case farms“; n=19), bis dahin in der BoHV-1-Serologie unauffällige Betriebe aus Schwaben („NCI“; n=23), unauffällige Betriebe aus dem Nordosten Bayerns („NCII“=11) und in Betriebe nicht näher beschriebener Herkunft (n=2), in welchen eine aktuelle BoHV-1-Infektion nachgewiesen worden war. Zur Spezifizierung der nordöstlichen Region wurden keine Angaben gemacht. In Proben aus 17 von 19 „Case farms“ wurden BoHV-2-Ak nachgewiesen, die Seroprävalenz unter den Rindern aller 19 Herden betrug 35,4% (260 von 734). Von 321 Proben aus „NCI“-Betrieben waren 12,5% (n=40) BoHV-2-Ak positiv. Diese stammten aus 13 der 23 Betriebe. Ein weiteres BoHV-2-Ak positives Rind wurde in einem der beiden BoHV-1-positiven Betriebe gehalten. Dies entspricht einem Anteil von 0,4% (1 von 164). In „NCII“-Betrieben wurden keine BoHV-2-Ak detektiert (BÖTTCHER et al., 2012).

Mit diesen Daten wurde zum ersten Mal auf einen statistischen Zusammenhang zwischen unspezifischen Reaktionen von Rinderseren in serologischen BoHV-1-ELISA-Systemen und der Präsenz von BoHV-2-Ak hingewiesen. Wie bereits im Kapitel IV.1.3 diskutiert, ist ein direkter Vergleich der berechneten BoHV-2-Seroprävalenzen mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten aufgrund des abweichenden Studien-Ziels und Designs nur sehr eingeschränkt möglich. BÖTTCHER et al. (2012) fokussierten auf den regionalen Vergleich von Schwaben (entspricht dem Südwesten Bayerns) mit dem Nordosten Bayerns. In „Case farms“ (Schwaben) wurden Serumproben von allen über neun Monate alten Rindern entnommen, wohingegen in „NCI“- (Schwaben) und „NCII“-Herden („Nicht-Schwaben“) nur Proben von circa zehn Kühen ausgewählt wurden. In der vorliegenden Arbeit dagegen wurden

Rinderseren verwendet, die im Rahmen der Überwachung der BoHV-1-Freiheit für serologische Untersuchungen eingesendet wurden. Anzahl und Auswahl der Tiere richteten sich daher immer nach den gesetzlichen Bestimmungen. Wie in der Publikation und im Kapitel IV.1.1 ausführlich dargestellt, wurden die Betriebe, welche in die Studie aufgenommen wurden, anhand eines Stichprobenplans ausgewählt. Dieser war zu dem Zweck entwickelt worden, die angenommene BoHV-2-Seroprävalenz je Region mit einer statistischen Sicherheit von 95% bei einer Genauigkeit von 5% zu schätzen. Eine regionale Einteilung wurde für Südbayern anhand der Regierungsbezirke (Schwaben, Oberbayern, Niederbayern) vorgenommen. Nordbayern, also die Regierungsbezirke Ober-, Mittel-, Unterfranken und Oberpfalz, wurden aufgrund der erwarteten niedrigen Prävalenz als eine Region betrachtet.

Die methodisch-technische oder auch immunologische Ursache für den Zusammenhang zwischen der Präsenz von BoHV-2-Ak in Rinderseren und nicht-negativen oder Trachitest-positiven Reaktionen in serologischen BoHV-1-Nachweissystemen ist nach wie vor noch nicht schlüssig gezeigt.

Direkte Kreuzreaktionen von BoHV-2-Ak mit den BoHV-1-Antigenen, auf welchen die verwendeten Ak-ELISAs basieren, können weitgehend ausgeschlossen werden. LEVINGS et al. (1984) beschrieben zwar, dass in der Immunelektrophorese einzelne Präzipitationslinien zwischen BoHV-1-Antiserum und BoHV-2-Antigen auftraten, das verwendete BoHV-2-Antiserum präzipitiert jedoch kein BoHV-1-Antigen. Zur Untersuchung war nur ein einziges BoHV-2-spezifische Antiserum herangezogen worden. Auch eine BoHV-1-Infektion neutralisierende Antikörper wurden in diesem BoHV-2-Serum nicht nachgewiesen (LEVINGS et al., 1984). Allerdings lassen sich weder die Ergebnisse einer Immunelektrophorese noch eines Serumneutralisationstests direkt auf Reaktionen in ELISA-Systemen übertragen, da unterschiedliche Antikörper-Eigenschaften genutzt werden. Auch STERZ et al. (1974) wiesen in keinem der verwendeten Testsysteme, dem Neutralisations-, Komplement-Fixations-, Immundiffusions- oder Immunfluoreszenz-Test, Kreuzreaktionen zwischen BoHV-2-Antiserum (n=7) und BoHV-1-Antigen bzw. zwischen BoHV-1-Antiserum und

BoHV-2-Antigen nach.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bekannt BoHV-2-Ak positive (n=37) und entsprechende BoHV-1-Ak positive (n=27) Seren auf Kreuzreaktivitäten getestet (siehe auch Ergebnisteil der Publikation SINGER et al. (2020)). Auch hier wurde im BoHV-1- und BoHV-2-spezifischen SNT keine Kreuzneutralisation des jeweils heterologen Antigens festgestellt. Genetische Analysen unterstützen diese antigenetischen Beobachtungen. Denn verglichene Nukleinsäuresequenzen zeigen nur eine geringe Homologie von 8% zwischen den beiden Viren (STERZ et al., 1974). Die Sequenzierung bisher bekannter Oberflächenproteine (z.B. gB, gG) von BoHV-2 ergab sogar, dass andere Vertreter der *Alphaherpesvirinae*, nämlich HSV-1 und -2, genetisch am nächsten mit BoHV-2 verwandt sind (HAMMERSCHMIDT et al., 1988; EHLERS et al., 1999b). Diese genetischen wie antigenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen BoHV-1 und BoHV-2 sind auch in der taxonomischen Einordnung beider Viren berücksichtigt, da diese zwar derselben Unterfamilie, jedoch unterschiedlichen Genera zugeordnet sind (ANONYMUS, 2018).

Mithilfe der umfassenden serologischen Untersuchungen dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass BoHV-2-Ak positive Rinderseren nicht immer in den BoHV-1-Testsystemen reagierten (siehe Tabellen 3 und 4). Von 56 BoHV-1-nicht-negativen Seren wurden nämlich in 23 keine BoHV-2-AK nachgewiesen. Und von 375 BoHV-2-AK positiven Seren waren 312 unauffällig im BoHV-1-ELISA.

Eine mögliche Erklärung dafür, warum Reaktionen in BoHV-1-ELISAs bei BoHV-2-Ak-Präsenz statistisch signifikant häufiger auftreten, dies aber eben doch nicht für alle Seren zutrifft, wäre, dass antigenetisch unterschiedliche, noch nicht weiterführend untersuchte BoHV-2-Stämme zirkulieren. Zur Überprüfung dieser These wäre es erforderlich, aktuelle Isolate zu gewinnen, um diese genetisch und antigenetisch zu charakterisieren. Auch dieser Ansatz war Ziel der vorliegenden Arbeit. Das Vorgehen und die Ergebnisse der Erregeridentifizierung sind in Kapitel IV.2.2 beschrieben. Über weitere mögliche Gründe, beispielsweise darüber, ob ggf. unbekannte exogene oder endogene Faktoren des Wirtes in Kombination mit einer BoHV-2-

Seroreaktivität zur Bildung von Ak führen, die in BoHV-1-ELISAs reagieren, kann aktuell nur spekuliert werden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit der zuvor publizierte statistische Zusammenhang von nicht BoHV-1-spezifischen Reaktionen in BoHV-1-ELISAs und der Präsenz von BoHV-2-spezifischen Ak bayernweit untersucht und sowohl auf Einzeltierebene als auch auf Betriebsebene präzisiert.

1.4.2. Problematik der nicht-negativen BoHV-1-Reaktionen im regionalen Vergleich

Ein Regionalität der Problematik nicht-negativer BoHV-1-Antikörper Reaktionen mit Fokus auf den Südwesten-Bayerns ist beschrieben (BÖTTCHER et al., 2012). In Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Daten für alle Regionen Bayerns analysiert und eine mögliche Ausbreitungstendenz beurteilt werden. Daher wurden die 6801 Rinderseren aus 406 Betrieben, die für BoHV-2-Untersuchungen ausgewählt worden waren (Kapitel IV.1.1), zusätzlich in einem oder mehreren BoHV-1-spezifischen ELISAs untersucht. Anhand des jeweiligen Ergebnisses wurde in folgende Kategorien eingeteilt: „BoHV-1-ELISA negativ“ (Trachitest negativ), „Trachitest-positiv“ (Trachitest positiv, gB- und ggf. gE-ELISA negativ), „nicht-negativ“ (Trachitest und gB-ELISA positiv oder fraglich, gE-ELISA negativ; siehe auch Abb. 3).

Insgesamt reagierten von 6801 Seren 0,8% (n=56) nicht-negativ und 1,3% (n=90) Trachitest-positiv (Tabelle 5). In Südbayern lag der Anteil von Seren mit nicht-negativen Reaktionen bei 0,9% (46 von 4885) und somit deutlich höher als in Nordbayern (0,5%; 10 von 1916). Anhand der Untersuchungsergebnisse der Einzelseren wurden die zugehörigen Betriebe wie bereits beschrieben ebenfalls kategorisiert (Tabelle 6). Insgesamt wurden auf diese Weise 9,9% aller Betriebe als nicht-negativ und 12,8% aller Betriebe als Trachitest-positiv klassifiziert. Von nicht-negativen Reaktionen waren in Nordbayern 6,7% der Betriebe betroffen, in Südbayern hingegen waren es 11,0%.

Tabelle 5: Ergebnisse der Untersuchungen von Rinderseren in BoHV-1-spezifischen Nachweissystemen

Region/ Regierungs- bezirke	BoHV-1- nicht-negativ		Trachitest- positiv		BoHV-1-ELISA negativ		Anzahl untersuchter Rinder Gesamt
	Anzahl der Rinder	in % von Gesamt	Anzahl der Rinder	in % von Gesamt	Anzahl der Rinder	in % von Gesamt	
Nordbayern	10	0,5%	38	2,0%	1868	97,5%	1916
Oberfranken	1	0,2%	6	1,1%	561	98,8%	568
Mittelfranken	1	0,2%	17	3,6%	458	96,2%	476
Unterfranken	5	1,1%	13	2,9%	425	95,9%	443
Oberpfalz	3	0,7%	2	0,5%	424	98,8%	429
Südbayern	46	0,9%	52	1,1%	4787	98,0%	4885
Niederbayern	5	0,5%	4	0,4%	1061	99,2%	1070
Oberbayern	14	1,2%	19	1,6%	1167	97,3%	1200
Schwaben	27	1,0%	29	1,1%	2559	97,9%	2615
Gesamt	56	0,8%	90	1,3%	6655	97,9%	6801

Überblick über die serologischen Untersuchungsergebnisse von 6801 bayerischen Rinderseren in BoHV-1-spezifischen Nachweissystemen. Die Darstellung erfolgt anhand der Herkunftsregion innerhalb Bayerns. „BoHV-1-nicht-negative“ Seren reagieren im Trachitest (BoHV-1-Vollvirus-ELISA) und im gB-ELISA positiv, im hochspezifischen gE-ELISA jedoch negativ. „Trachitest-positive“ Seren reagieren ausschließlich im Trachitest

Von BÖTTCHER et al. (2012) wurde erstmals eine Häufung der Problematik im Regierungsbezirk Schwaben beschrieben. 1,83% der Tankmilchproben schwäbischer Betriebe reagierten damals nicht-negativ, im Gegensatz zu 0,44% in den restlichen bayerischen Regierungsbezirken. In den hier dargestellten, aktuellen Untersuchungen waren schwäbische Betriebe ebenfalls am stärksten betroffen. In 14,2% der schwäbischen Betriebe wurden nicht-negative Reaktionen in Rinderseren festgestellt, während es in Niederbayern 3,9%, in Oberbayern 12,2% und in Nordbayern 6,7%

waren (Tabelle 6).

Da BÖTTCHER et al. (2012) Tankmilchproben untersuchten, sind die ermittelten Daten nicht direkt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar, welche auf der Untersuchung von Blutseren beruhen. Interessant ist jedoch, dass in der Studie von BÖTTCHER et al. (2012), die auf Untersuchungsdaten der Jahre 2008 bis 2010 basiert, der Anteil nicht-negativer Tankmilchproben in Schwaben mehr als viermal so hoch war wie in den restlichen Regionen Bayerns. In der aktuellen Arbeit, also circa 10 Jahre später, wurde jedoch festgestellt, dass auf Betriebsebene der Unterschied nur ca. 1,9 Mal so hoch war. In den letzten Jahren könnte demzufolge eine Ausbreitung oder Verlagerung der Problematik stattgefunden haben. Gestützt wird diese Vermutung durch die Prävalenzen in den einzelnen bayerischen Regionen, die sich aktuell zum Teil nicht wesentlich unterscheiden (Tabelle 6).

Ein starkes Nord-Süd-Gefälle bleibt weiterhin deutlich (Abb. 4), analog der Verteilung der BoHV-2-Ak-Nachweise (vgl. Abb. 3 der Publikation). Diese Analogie in der regionalen Verteilung bekräftigt die Vermutung, dass beide Parameter auf noch ungeklärte Weise miteinander zusammenhängen (vgl. Kapitel IV.1.4.1).

Tabelle 6: Darstellung der Klassifizierung von 406 bayerischen Rinderhaltungen hinsichtlich der BoHV-1-Serologie und der Herkunftsregion

Region/ Regierungs- bezirke	Anzahl der Betriebe mit mind. einem BoHV-1- nicht- negativen Serum	in % von Gesamt	Anzahl der Betriebe mit mind. einem Trachitest- positiven Serum	in % von Gesamt	Anzahl der BoHV-1- unauf- fälliger Betriebe	in % von Gesamt	Anzahl der Betriebe Gesamt
Nordbayern	7	6,7%	23	21,9%	75	71,4%	105
Oberfranken	1	4,2%	5	20,8%	18	75,0%	24
Mittelfranken	1	3,5%	8	27,6%	20	69,0%	29
Unterfranken	3	12,0%	8	32,0%	14	56,0%	25
Oberpfalz	2	7,4%	2	7,4%	23	85,2%	27
Südbayern	33	11,0%	29	9,6%	239	79,4%	301
Niederbayern	3	3,9%	3	3,9%	72	92,3%	78
Oberbayern	10	12,2%	13	15,6%	59	72,0%	82
Schwaben	20	14,2%	13	9,2%	108	76,6%	141
Gesamt	40	9,9%	52	12,8%	314	77,3%	406

Die Klassifizierung von 406 Betrieben in die Kategorien „BoHV-1-nicht-negativ“, „Trachitest-positiv“ und „BoHV-1-ELISA negativ“ erfolgte anhand der serologischen Untersuchungsergebnisse von 6801 Rinderseren in BOHV-1-spezifischen Nachweissystemen. Ein Betrieb gilt als „BoHV-1-nicht-negativ“, wenn sich mindestens ein Rind mit diesem Ergebnis in dem Betrieb befindet. Dasselbe gilt für Betriebe mit der Bezeichnung „Trachitest-positiv“ oder „BoHV-2-positiv“. Betriebe mit Trachitest-positiven und nicht-negativen Untersuchungsergebnissen werden zu den „BoHV-1-nicht-negativen Betrieben“ gezählt

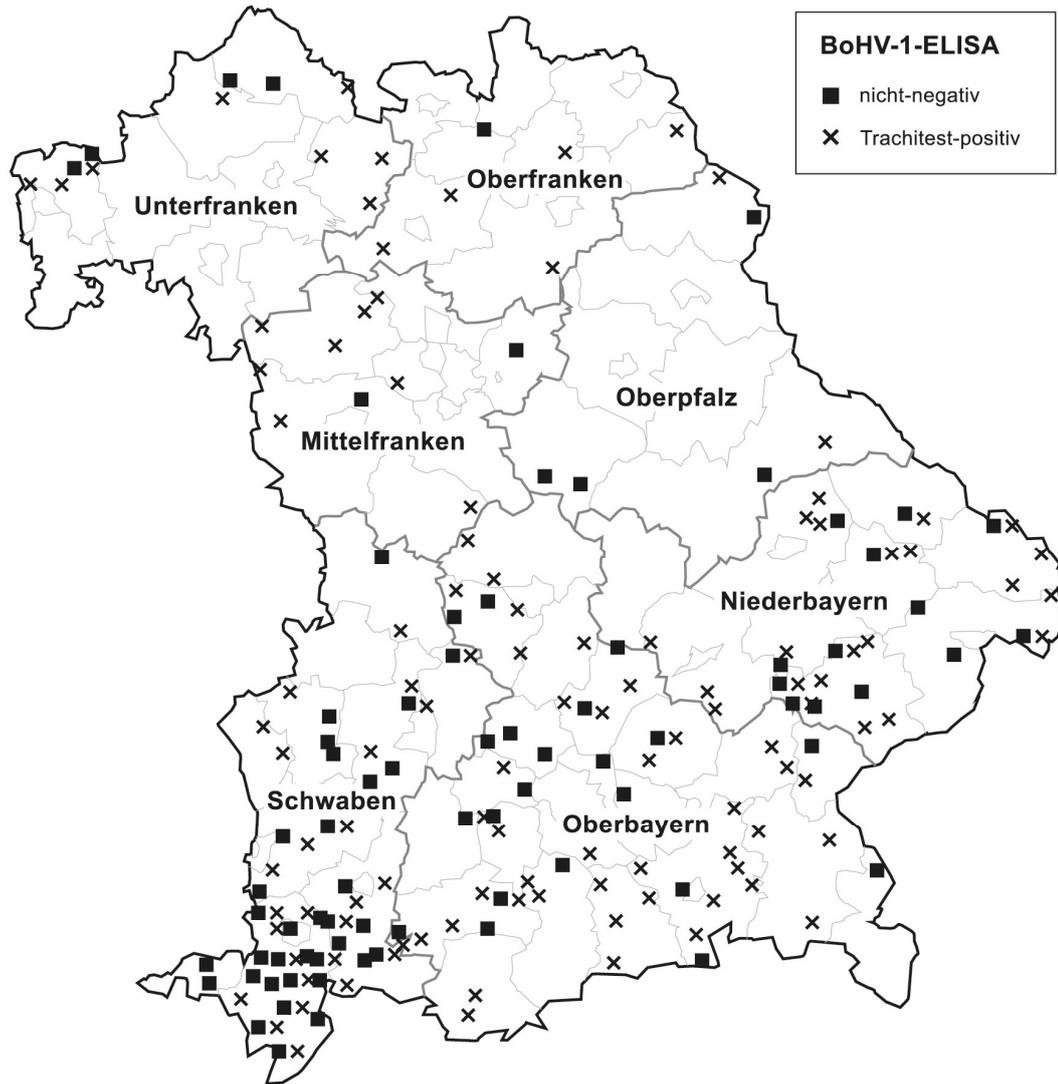


Abbildung 4: Geographische Verteilung der Proben mit unspezifischen Reaktionen in BoHV-1-Antikörper-ELISAs. Die schwarzen Symbole (■, X) stellen Postleitzahl-Gebiete in Bayern dar, aus welchen mindestens ein Rinderserum mit unspezifischer Reaktion stammte. Die schwarzen Quadrate (■) stehen für nicht-negative (Trachitest und gB-ELISA positiv, gE-ELISA negativ) und die schwarzen Kreuze (X) für Trachitest-positive (Trachitest positiv, gB- und gE-ELISA negativ) Ergebnisse. Die Darstellung basiert auf den Ergebnissen der Untersuchung von 7871 Seren, die nicht in die BoHV-2-Prävalenzberechnung einbezogen wurden. Insgesamt reagierten 202 Seren aus 79 Postleitzahlgebieten nicht-negativ und 210 Seren aus 112 Postleitzahlgebieten Trachitest-positiv

Einige zufällig aus der Routine ausgewählte Proben wurden zusätzlich im BoHV-1-spezifischen SNT untersucht. Es fiel auf, dass 11 Seren BoHV-1-Antigen neutralisierten. Diese wurden als BoHV-1-reaktiv eingestuft und in die weiteren Auswertungen dieser Arbeit nicht einbezogen. BoHV-1-Infektionen wurden ausgeschlossen, da keine gE-spezifischen Ak detektiert wurden und epidemiologische Nachforschungen in den einzelnen Fällen andere Ursachen aufzeigten. Aufgrund von Alter oder der Herkunft der Rinder außerhalb Bayerns konnten Impfungen für die Anwesenheit der neutralisierenden Ak verantwortlich gemacht werden. Dennoch ist es wichtig zu betonen, dass auch mehr als 5 Jahre nach dem bayernweiten Verbot der Impfung gegen BoHV-1-Infektionen primär „nicht-negativ“ erscheinende Reaktionen auf BoHV-1-Impfungen zurückzuführen sein können. Mögliche BoHV-1-Infektionen müssen im Einzelfall nach wie vor immer sicher ausgeschlossen werden.

Das Ergebnis des gE-ELISAs dient rechtlich und fachlich als entscheidendes Kriterium für die Bestätigung oder den Ausschluss einer BoHV-1-Infektion (ANONYMUS, 2016b). Die verglichen mit andern ELISA-Systemen geringere Sensitivität der gE-Ak-Nachweise macht diese zwar für den Herdenstatus verlässlich, erfordert aber in der Einzeltierdiagnostik eine sorgfältige Beurteilung. In Einzelfällen ist die Antikörperbildung auch Stamm-abhängig, so wurden in einem Fall in den Niederlanden in gB-ELISA-positiven Serumproben von nicht-geimpften Rindern keine gE-Antikörper detektiert, eine BoHV-1-spezifische Neutralisation zeigte aber klar die BoHV-1-Spezifität der Ak (MARS et al., 2000). Daher ist im Einzelfall eine Nachuntersuchung der betreffenden Probe in einem sinnvollen, zweiten Testsystem zwingend notwendig.

In der aktuellen Arbeit wurden nicht-negative Reaktionen in der serologischen BoHV-1-Diagnostik in allen Regierungsbezirken Bayerns nachgewiesen. Diese stellen somit kein rein lokal begrenztes Phänomen im Südwesten Bayerns dar, wie es noch vor wenigen Jahren der Fall war (BÖTTCHER et al., 2012). Eine mögliche Ausbreitungstendenz sowie die Ursachen für das Phänomen müssen in weiteren Arbeiten untersucht und beurteilt werden.

1.4.3. Zusammenhang zwischen der BoHV-2-Seroprävalenz und der Reaktivität von Seren im Trachitest

Als „Trachitest-positiv“ wurden Serumproben bezeichnet, die zwar im BoHV-1-Trachitest (Vollvirus-ELISA), nicht aber im gB-ELISA reagierten. Da während einer BoHV-1-Infektion gB-Antikörper sehr früh nachweisbar sind, ist eine derartige Reaktion als BoHV-1-negativ einzuordnen. Nicht BoHV-1-spezifische Reaktionen im Trachitest (n=90) wurde häufiger beobachtet als nicht-negative (n=56; Tabelle 3).

Insgesamt wurden 1,3% (n=90) der 6801 untersuchten Seren und 12,8% (n=52) der 406 Betriebe als Trachitest-positiv eingestuft (Tabelle 4). Rinderhaltungen, in welchen es zusätzlich zu Trachitest-positiven Ergebnissen auch nicht-negative Ergebnisse gab (n=7), zählten zur Gruppe der nicht-negativen Betriebe. Wie in der Publikation SINGER et al. (2020) ausführlich dargestellt, wurden BoHV-2-Ak ungefähr zehn Mal häufiger in Trachitest-positiven Seren nachgewiesen (30 von 90; CI 32,21%-34,45%) als in BoHV-1-ELISA negativen Seren (312 von 6655; CI 4,19%-5,19%; siehe Tabelle 2 der Publikation SINGER et al. (2020)). Darüber hinaus wurde in 28,85% der Betriebe, die als Trachitest-positiv klassifiziert wurden, mindestens ein BoHV-2-Ak positives Rind gehalten. Im Vergleich dazu wurde dies für 67,50% (27 von 40; CI 62,94%-72,06%) der nicht-negativen Betriebe und nur 11,46% (36 von 314; CI 8,37%-14,56%) der BoHV-1-negativen Betriebe beobachtet.

BÖTTCHER et al. (2012) vermuten einen fließenden Übergang von der gB-ELISA-negativen Einstufung Trachitest-positiver Betriebe bis hin zur Detektion von gB-ELISA-positiven Seren. Demzufolge müssen in einigen Fällen Trachitest-positive Reaktionen als Vorboten für das Auftreten von nicht-negativen Reaktionen interpretiert werden. Maßnahmen, wie das Entfernen nicht-negativ reagierender Tiere bei gleichzeitigem Verbleib von Rindern mit Trachitest-positiven Reaktionen dürften dann nicht zum gewünschten Erfolg führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Überblick über die BoHV-2-Seroprävalenz in der bayerischen Rinderpopulation erarbeitet. Es wurde ein Status-quo ermittelt, auf dessen Basis zukünftige Ausbreitungstendenzen

statistisch gesichert beurteilt werden können. Ein statistischer Zusammenhang zwischen der BoHV-2-Seroprävalenz und unspezifischen Reaktionen in Testsystemen der serologischen BoHV-1-Überwachung (BÖTTCHER et al., 2012) wurde in dieser Arbeit erstmals für Betriebe aus ganz Bayern untersucht. Die Seroprävalenzen der BoHV-2-Infektionen sind aktuell vor allem regional relativ niedrig. Verschiedene Ursachen für diese Beobachtung sind in der Publikation SINGER et al. (2020) ausführlich diskutiert. CASTRUCCI et al. (1980) zeigten, dass bei Kälbern, die gleichzeitig mit BoHV-1 und BoHV-2 infiziert waren, eine experimentelle Reaktivierung ausschließlich zur Ausscheidung von BoHV-1 führte. Sollte diese Dominanz von BoHV-1 die Regel sein, könnte resultieren, dass in BoHV-1-freien Gebieten die Ausbreitung von BoHV-2 Infektionen mit der Zeit zunimmt und gleichzeitig die Problematik der nicht-negativen Reaktionen in BoHV-1-Nachweissystemen ansteigt. Es ist daher wichtig, in weiteren Arbeiten die Ausbreitungstendenz der BoHV-2-Infektionen zu untersuchen.

2. Untersuchungen zu aktuellen BoHV-2-Infektionen in Bayern

2.1. Etablierung von BoHV-2 spezifischen PCR-Formaten

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Detektion und Analyse aktueller BoHV-2-Infektionen. Zunächst stand die Etablierung einer geeigneten PCR im Vordergrund, um einen sensitiven, spezifischen, schnellen und massentauglichen Nachweis von BoHV-2-Genom zu ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden zunächst bereits publizierte BoHV-2-spezifische PCR-Protokolle ausgewählt (IMAI et al., 2002; KALMAN und EGYED, 2005; CAMPOS et al., 2014; CARGNELUTTI et al., 2017). Ein breites Spektrum an möglichen, zu detektierenden Zielsequenzen aus dem BoHV-2-Genom, nämlich der Gene für gB, gH und für die DNA-Polymerase (siehe Kapitel II.3.2), wurde abgedeckt. Zusätzlich wurde in Kooperation mit Dr. Hoffman, Friedrich-Loeffler-Institut, ein Realtime-PCR-Protokoll mit Zielsequenzen im Bereich des gB-Gens etabliert und validiert (siehe Methodenteil der Publikation SINGER et al. (2020)). Alle PCR-Protokolle wurden optimiert und die Sensitivität, Spezifität und Praktikabilität verglichen. Für diese

Untersuchungen wurde DNA des BoHV-2-Referenzstamms „Riems 8/85“ (RVB-0064, IV7, 1995-02-01; BERGMANN, H.; Friedrich-Loeffler-Institut für Tierseuchenforschung Insel Riems) verwendet. Aufgrund der hohen Sensitivität (Abb. 5), Spezifität, der vergleichsweise reduzierten Kontaminationsgefahr und des relativ geringeren Arbeits- und Zeitaufwandes der Realtime-PCR im Vergleich zu den konventionellen Protokollen, wurde die Realtime-PCR als Standardmethode zur Bearbeitung von großen Probenmengen ausgewählt (siehe Methodenteil der Publikation SINGER et al. (2020)). Zur Abklärung fraglicher Ergebnisse wurde eine konventionelle PCR mit Zielsequenz im Bereich der DNA-Polymerase (modifiziert nach CARGNELUTTI et al. (2017)) verwendet. Für den Nachweis anderer, differentialdiagnostisch in Frage kommender Herpesviren stand zusätzlich ein weiteres konventionelles PCR-Protokoll, eine PanHerpes-nested-PCR zur Verfügung (EHLERS et al., 1999a). Dieses ermöglicht die Amplifikation von Sequenzen aus dem Genbereich der DNA-Polymerase von Herpesviren diverser Genera, da diese Genregion hochkonserviert ist. Durch den gleichzeitigen Einsatz mehrerer degenerierter Primer werden auch leicht abweichende Sequenzen amplifiziert.

Mithilfe der BoHV-2-spezifischen Realtime-PCR wurde ein großer Teil der Proben dieser Arbeit untersucht. Als interne Kontrolle diente die Detektion von Sequenzen aus dem Beta-Actin-Gen (vgl. Methodenteil der Publikation SINGER et al. (2020)). In den letzten Zyklen der Realtime-PCR stieg die Fluoreszenz-Intensität für einige Proben leicht an (Abb. 6a und 6b). Diese Proben wurden zusätzlich in der konventionellen PCR mit Zielsequenz im Bereich der DNA-Polymerase (modifiziert nach CARGNELUTTI et al. (2017)) untersucht (Abb. 6c). Es wurden jedoch keine spezifischen Amplifikationsprodukte nachgewiesen. Sofern Banden in Höhe der erwarteten Amplifikatlänge von 138 Basenpaaren (bp) in der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar waren, wurde eine DNA-Sequenzierung (Sanger-Sequenzierung; Eurofins Genomics) angeschlossen. Die erhaltenen Sequenzen konnte in keinem Fall bekannten Sequenzen des BoHV-2-Genoms zugeordnet werden.

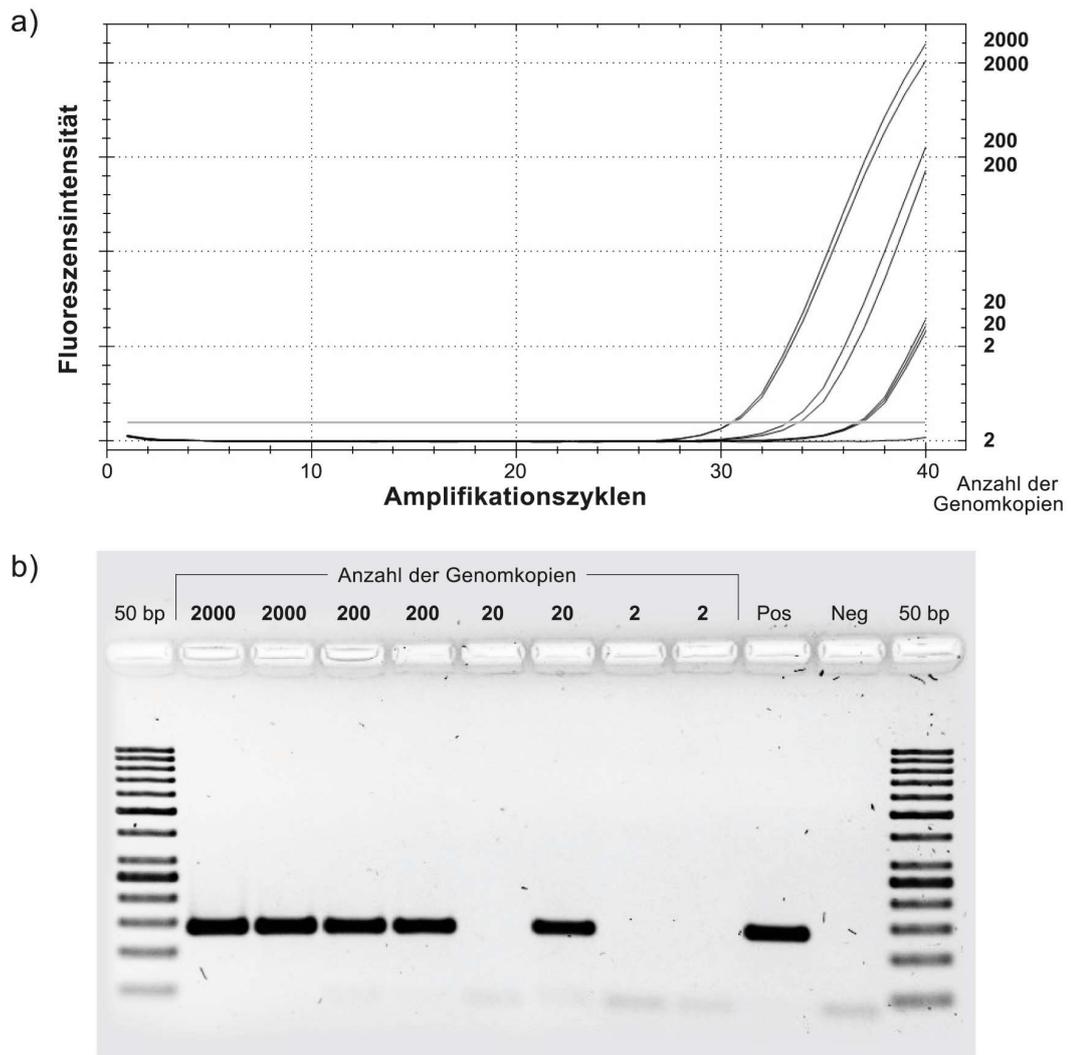


Abbildung 5: Darstellung der Sensitivität ausgewählter PCR-Protokolle. In der Realtime-PCR (a) konnten noch 2 und in der konventionellen PCR (modifiziert nach CARGNELUTTI et al. (2017)) (b) noch 20 BoHV-2-Genomkopien pro Ansatz detektiert werden

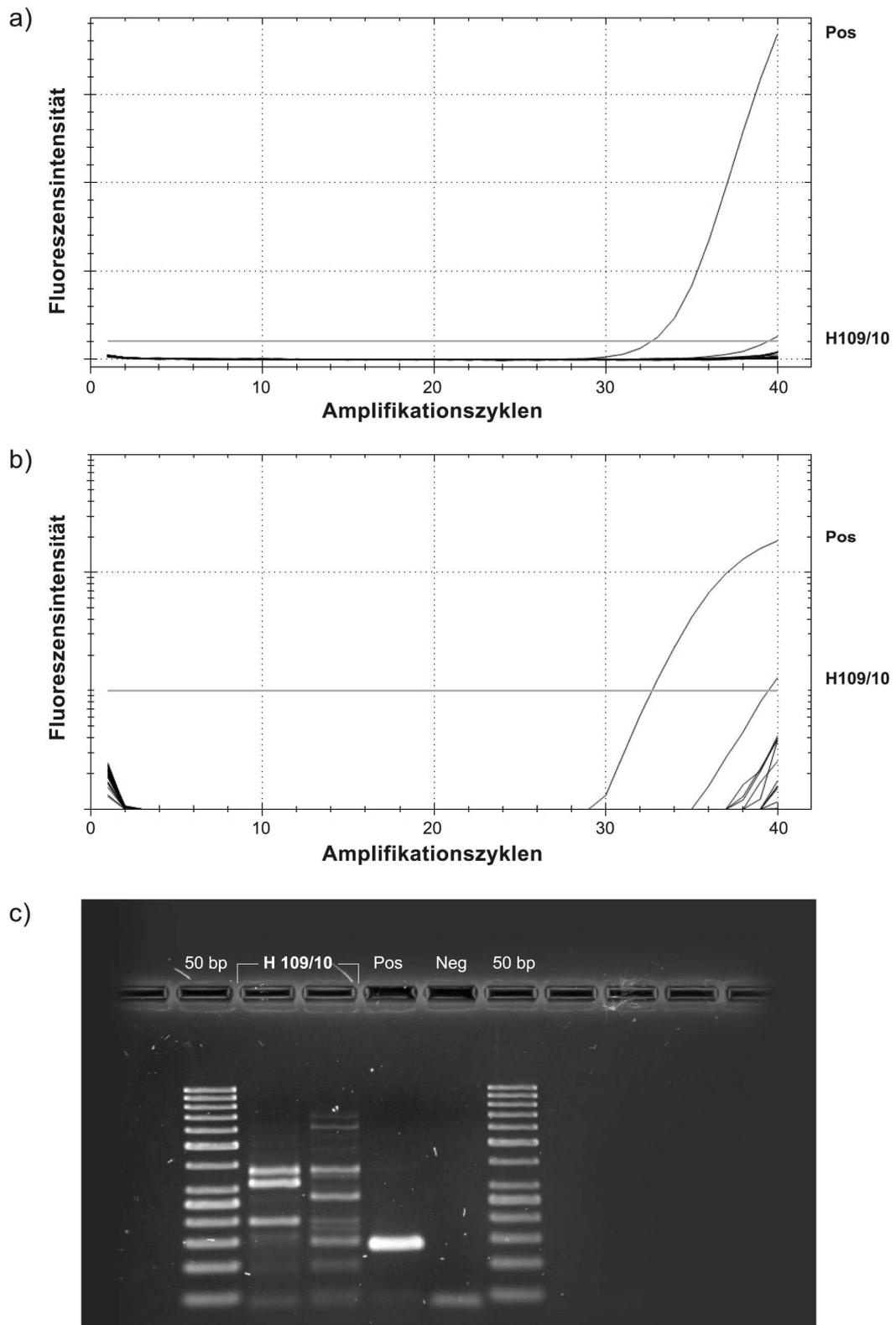


Abbildung 6: Unspezifische Amplifikation von Proben-Nukleinsäure in der Realtime-PCR in linearer (a) und logarithmischer (b) Darstellung. Die Abklärung in der konventionellen PCR (modifiziert nach CARGNELUTTI et al. (2017)) (c) erfolgte im Doppelansatz

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine sensitive und spezifische Realtime-PCR zur Detektion von BoHV-2-Genom etabliert (siehe Publikation SINGER et al. (2020)). Da zum Zeitpunkt der Arbeiten kein aktuelles BoHV-2-Isolat aus Bayern zur Verfügung stand, wurden die Experimente mit einem BoHV-2-Referenzstamm durchgeführt. Um einerseits sicherzugehen, dass BoHV-2-infizierte Tiere nicht übersehen wurden, und um andererseits andere, differentialdiagnostisch in Frage kommende Herpesviren nachzuweisen, wurden alle Gewebeproben zusätzlich in einer PanHerpes-PCR untersucht (EHLERS et al., 1999a). Die Ergebnisse sind in Kapitel IV.2.2 diskutiert.

2.2. Untersuchung von Gewebeproben von Rindern mit Veränderungen im Bereich des Euters oder des Flotzmauls

234 der 239 auf Herpesvirus-Genom untersuchten Gewebeproben stammten von 106 verendeten oder getöteten Wiederkäuern, die zur pathologischen Diagnostik an das LGL gebracht worden waren. Die klassische Form der BHM verursacht erosive bis ulzerative Läsionen am Euter und den Zitzen von Milchkühen (MARTIN et al., 1964). Auch am Flotzmaul von Kälbern wurden vergleichbare Veränderungen beschrieben (DEAS und JOHNSTON, 1966). Aus diesem Grund wurden in der Pathologie des LGL alle Wiederkäuer eingehend auf Hautveränderungen an Euter, Zitzen oder Flotzmaul untersucht und von entsprechend veränderten Bereichen Gewebeproben entnommen. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden diese bei -80°C gelagert. Ausgewählte Läsionen reichten von warzenartigen Zubildungen, Rhagaden oder andersartigen Hautdefekten, bis hin zu Rötungen, Hautablösungen, Einblutungen oder disseminierten Hautknötchen. Zusätzlich wurden praktische Tierärzte der Region wiederholt über die Untersuchungen zu BoHV-2-Infektionen informiert und um Einsendung entsprechender Proben gebeten. Es resultierte die Einsendung von Hautgeschabseln von derben, dickwandigen und trockenen Bläschen an den Zitzen (n=3), warzenartigen Wucherungen im gesamten Euter- und Unterbauchbereich (n=1) oder krustig-schorfigen Veränderungen am Euter (n=1) von weiteren fünf Kühen. Dadurch, dass jegliche Art der Hautveränderung auf BoHV-2-Genom untersucht wurde, auch solche, die primär als untypisch eingestuft wurden, sollte verhindert werden,

dass milde oder gegebenenfalls atypische Ausprägungen einer BoHV-2-Infektion nicht erfasst werden. Denn bisher ist nicht bekannt, ob und in welcher Form klinische BoHV-2-Infektionen aktuell in Bayern vorkommen. Gleichzeitig wurde der Arbeitshypothese nachgegangen, dass auch im Zuge klinischer Erkrankungen anderer Genese, latentes BoHV-2 reaktiviert und unter Umständen lokal ausgeschieden werden könnte. In diesem Zusammenhang wurden auch Nasentupfer von Rindern mit respiratorischer Symptomatik auf BoHV-2-Genom untersucht. Die Ergebnisse sind in der Publikation SINGER et al. (2020) und Kapitel IV.2.4 vorgestellt und diskutiert.

Dass BoHV-2, ebenso wie andere Herpesviren, latent im Wirtstier verbleibt und bei Immunsuppression reaktiviert wird, ist belegt (zum Beispiel PROBERT und POVEY (1975), MARTIN und SCOTT (1979); siehe auch Kapitel II.1.3). Welche Zellen und Gewebe für die Latenz von BoHV-2 biologisch relevant sind, ist noch nicht gezeigt, jedoch wurde BoHV-2-Genom in Trigeminalganglien klinisch gesunder Rinder sowie in verschiedenen Lymphknoten von Schafen und einigen Wildwiederkäuer-Spezies detektiert (KALMAN und EGYED, 2005; CAMPOS et al., 2014). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit von 88 der 106 Tierkörper aus der Pathologie des LGL zusätzlich Proben von regionalen Lymphknoten, also Euterlymphknoten (n=44) oder Retropharyngeallymphknoten (n=41), und im Falle von Veränderungen im Kopfbereich, die Trigeminalganglien (n=41) entnommen.

Wie in der Publikation SINGER et al. (2020) ausführlich dargestellt, konnte überraschenderweise in keiner der untersuchten Gewebeproben BoHV-2-Genom nachgewiesen werden, obwohl in der vorliegenden Arbeit eine BoHV-2-Seroprävalenz von 5,51% in der bayerischen Rinderpopulation ermittelt wurde. In Schwaben und Oberbayern, den Regierungsbezirken, aus welchen die Tiere für die pathologische Untersuchung hauptsächlich stammten, lag die Seroprävalenz bei 4,67% bzw. 11,17%. Da gegen BoHV-2 nicht geimpft wird, ist zumindest für adulte Tiere mit Antikörpern davon auszugehen, dass auch eine BoHV-2-Infektion stattgefunden hat und somit in entsprechender Relation Genome in der Latenz nachweisbar sein müssten. Da in den bisher untersuchten Proben trotz der Anwendung verschiedener PCR-Systeme keine BoHV-2-Genome detektiert wurden, wurde daraus geschlossen, dass keine der

beobachteten Läsionen durch BoHV-2 verursacht war.

Auch in den Niederlanden, der Schweiz und Belgien wurden BoHV-2-Ak nachgewiesen, obwohl es in diesen Ländern bis dato keine Beschreibung der BHM und keine Isolation von BoHV-2 gegeben hatte (SCOTT et al., 1978; ENGELS et al., 1979; PASTORET et al., 1983). Als mögliche Erklärung zogen die Autoren ENGELS et al. (1979) und PASTORET et al. (1983) in Betracht, dass BoHV-2-Infektionen dort prinzipiell subklinisch verlaufen könnten. Außerdem wurde die Möglichkeit atypischer Verläufe diskutiert (ENGELS et al., 1979). Die Hauptvermutung bestand allerdings darin, dass klinische Infektionen von den Tierhaltern mit Euterpocken verwechselt oder einfach übersehen werden (ENGELS et al., 1979).

Auch in Bayern könnten klinische Symptome übersehen oder nicht beachtet worden sein und daraus die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Serologie und der virologischen Untersuchungen resultieren. Aber auch subklinische Infektionsverläufe sind denkbar. Falls dies die Regel wäre, müsste eine Virusübertragung jedoch ohne sichtbare Läsionen stattfinden. In der klassisch beschriebenen BHM wird infektiöses Virus besonders in den ersten Tagen der BoHV-2-Infektion in großer Menge über die aus den Läsionen austretende, seröse Flüssigkeit ausgeschieden (MARTIN et al., 1969). Die Übertragung auf empfängliche Tiere kann dann per Hautkontakt oder mittels mechanischer Vektoren, z.B. während des Melkaktes erfolgen (siehe Kapitel II.1.6). Das Fehlen derartiger Läsionen könnte darauf hinweisen, dass alternativen Ausscheidungswegen, wie sie durch CASTRUCCI (1975), CASTRUCCI et al. (1982) und HOFMANN et al. (1987) beschrieben werden, eine größere Bedeutung zukäme.

Im Rahmen weiterer Arbeiten ist es wichtig Tierärzte und Tierärztinnen in der Praxis sowie in den Veterinärämtern und besonders Rinderhalter und Rinderhalterinnen verstärkt auf die Thematik der BoHV-2-Infektionen aufmerksam zu machen und zu sensibilisieren. Mit einer deutlichen Steigerung der Anzahl untersuchbaren Proben, stiege auch die Wahrscheinlichkeit des Nachweises klinischer BoHV-2-Infektionen.

2.3. Detektion von Herpesviraler DNA in Haut- und Organproben

Mittels PanHerpes-PCR konnte aus 40 Proben von 25 Tieren DNA in der zu erwartenden Länge von 215-235bp amplifiziert werden. Das Herpesvirus-Genom enthaltende Probenmaterial setzte sich aus 17 Proben von Euter- oder Zitzen-Läsionen, drei Proben von Flotzmaul-Läsionen, zwei Hautgeschabseln von disseminierten Hautveränderungen, zwölf Euter-Lymphknoten, drei Retropharyngeallymphknoten und zwei Trigeminalganglien zusammen.

Nukleinsäuresequenzen wurden für jede Probe aus beiden Leserichtungen bestimmt (Sanger-Sequenzierung, Firma Eurofins Genomics). Aus den erhaltenen Forward- und Reverse-Sequenzen wurden Konsensus-Sequenzen gebildet und, wenn vorhanden, zusätzlich die Sequenzinformation aus weiteren Proben eines Tieres zur Absicherung der Sequenzen genutzt. Es resultierten 24 auf eine Länge von 202-205 bp getrimmte Sequenzen aus den Gewebeproben von 24 Tieren. Sequenzen aus den Proben des fünfundzwanzigsten Tieres waren zwar eindeutig herpesviral, wurden aber auf Grund der schlechten Qualität nicht in die weiteren Analysen einbezogen.

Wie in der Publikation SINGER et al. (2020) erwähnt, ergab der erste Vergleich der Sequenzen, dass sich zwei Sequenzen eindeutig voneinander und von den anderen Sequenzen unterschieden. Eine dieser Sequenzen aus dem Euterlymphknoten einer Ziege wurde nach Abgleich mit Sequenzinformationen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) als *Caprines Gammaherpesvirus 2*-Genom (CpHV-2) identifiziert. Die zweite Sequenz aus dem Gewebe des Flotzmauls und der Trigeminalganglien eines Rindes konnte als *Ovines Gammaherpesvirus 2* (OvHV-2) eingeordnet werden.

Für den Vergleich der übrigen Sequenzen wurde das Sequenz Alignment Programm Clustal Omega genutzt (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Es resultierten schließlich sechs, an einzelnen Nukleotidpositionen voneinander unterscheidbare Sequenzen mit einer Länge von 202bp, die zueinander eine Identität von 99% aufwiesen (Abb. 7). Für einen Vergleich mit bekannten herpesviralen Sequenzen wurde BLAST genutzt und eine

Konsensus-Sequenz gebildet, indem alle Stellen, an welchen die Basen der sechs Sequenzen nicht übereinstimmen, durch eine Lücke („-“) gekennzeichnet wurden. Die höchste Übereinstimmung von ca. 97% im Bereich der 5. bis 200. Base der Konsensus-Sequenz bestand mit dem *Bovinen Gammaherpesvirus 6* (BoHV-6; früher Bovines Herpesvirus 6 bzw., Bovines Lymphotropes Herpesvirus: Abb. 8; Sequenz ID der NCBI-GenBank: KJ705001.1).

Das Bovine Gammaherpesvirus 6 (BoHV-6) ist dem Genus *Macavirus* der Subfamilie *Gammaherpesvirinae* zugeordnet (ANONYMUS, 2018). Es wurde bisher nicht mit einem bestimmten Krankheitsbild assoziiert und man geht davon aus, dass das Virus ubiquitär bei gesunden Rindern vorkommt (ACKERMANN, 2006). Daher ist nicht anzunehmen, dass BoHV-6 ursächlich für die beobachteten Hautveränderungen der Wiederkäuer verantwortlich ist. Interessant ist jedoch, dass die Genome, anders als erwartet, vorrangig in den Haut-Proben und seltener in den Lymphknoten nachgewiesen wurden.

Um den Zusammenhang zwischen den Hautveränderungen der Wiederkäuer und den detektierten Genomsequenzen zu klären, sollen in der Zukunft weitere Gewebeproben von Rindern und anderen Hauswiederkäuern untersucht werden.

Interne Bezeichnung	Alignment
Basen 1 - 60 der Sequenzen	
Sequenz 1	TGGGTTGACGGGGGTTGCGTCCGGTTTGCTTCCTTGCTTGAAAATTGCAGAAACGGTCAC
Sequenz 2	TGGGTTGACGGGGGTTGCGTCCGGTTTGCTTCCTTGCTTGAAAATTGCAGAAACGGTCAC
Sequenz 3	TGGGTTTACGGGGGTTGCGTCCGGTTTGCTTCCTTGCTTGAAAATTGCAGAAACGGTCAC
Sequenz 4	TGGGTTTACGGGGGTTGCGTCCGGTTTGCTTCCTTGCTTGAAAATTGCAGAAACGGTCAC
Sequenz 5	TGGGTTTACGGGGGTTGCGTCCGGTTTGCTTCCTTGCTTGAAAATTGCAGAAACGGTCAC
Sequenz 6	TGGGTTTACGGGGGTTGCGTCCGGTTTGCTTCCTTGCTTGAAAATTGCAGAAACGGTCAC
Basen 61 – 120 der Sequenzen	
Sequenz 1	TCTACAGGGGCGAACCATGCTGGAAAGAATAAGCACTACGTGGAAAGCTTACAGCCCCT
Sequenz 2	TCTACAGGGGCGAACCATGCTGGAAAGAATAAGCACTACGTGGAAAGCTTACAGCCCCT
Sequenz 3	TCTACAGGGGCGAACCATGCTGGAAAGAATAAGCACTACGTGGAAAGCTTACAGCCCCT
Sequenz 4	TCTACAGGGGCGAACCATGCTGGAAAGAATAAGCACTACGTGGAAAGCTTACAGCCCCT
Sequenz 5	TCTACAGGGGCGAACCATGCTGGAAAGAATAAGCACTACGTGGAAAGCTTACAGCCCCT
Sequenz 6	TCTACAGGGGCGAACCATGCTGGAAAGAATAAGCACTACGTGGAAAGCTTACAGCCCCT
Basen 121 – 180 der Sequenzen	
Sequenz 1	AGACTTGGAGCGCATTGCGCAGAGGCCATTGCAGTCGCAGAGGGGGCGCCGATCCTAG
Sequenz 2	AGACTTGGAGCGCATTGCGCAGAGGCCATTGCAGTCGCAGAGGGGGACGCCGATCCTAG
Sequenz 3	AGACTTGGAGCGCATTGCGCAGAGGCCATTGCAGTCGCAGAGGGGGCGCCGATCCTAG
Sequenz 4	AGACTTGGAGCGCATTGCGCAGAGGCCATTGCAGTCGCAGAGGGGGACGCCGATCCTAG
Sequenz 5	AGACTTGGAGCGCATTGCGCAGAGGCCATTGCAGTCGCAGAGGGGGACGCCGATCCTAG
Sequenz 6	AGACTTGGAGCGCATTGCGCAGAGGCCATTGCAGTCGCAGAGGGGGCGCCGATCCTAG
Basen 121 - 180 der Sequenzen	
Sequenz 1	CTTGCGCGTGATTTACGGCGAC
Sequenz 2	CTTGCGCGTGATTTACGGCGAC
Sequenz 3	CTTGCGCGTGATTTACGGCGAC
Sequenz 4	CTTGCGCGTGATTTACGGCGAC
Sequenz 5	CTTGCGCGTGATTTACGGCGAC
Sequenz 6	CTTGCGCGTGATTTACGGCGAC

Abbildung 7: Vergleich von Herpesvirale DNA-Sequenzen, die in Gewebeproben von 21 Hausrindern und einem Auerochsen detektiert wurden. Nukleotidunterschiede an der 7. und der 168. Position sind grau hinterlegt

Sequenz- bezeichnung	Alignment
Basenposition innerhalb der Sequenz: 5 – 64 (Konsensus) 39946 – 40005 (BoHV-6)	
Konsensus	TTAC GGGG GTTGCGTCCGGTTTGCTTCCTTGCTTGAAAATTGCAGAAACGGTCACTCTAC
BoHV-6	TTACT TGGA GTTGCGTCCGGTTTGCTTCCTTGCTTGAAAATTGCAGAAACGGTCACTCTAC
Basenposition innerhalb der Sequenz: 65 – 12 (Konsensus) 40006 - 40065 (BoHV-6)	
Konsensus	AGGGGCGAACCATGCTGGAAAGAACTAAGCACTACGTGGAAAGCTTACAGCCCGTAGACT
BoHV-6	AGGGGCGAACCATGCTGGAAAGAACTAAGCACTACGTGGAAAGCTTACAGCCCGTAGACT
Basenposition innerhalb der Sequenz: 125 – 183 (Konsensus) 40065 - 40125 (BoHV-6)	
Konsensus	TGGAGCGCATTTGCCAGAGGCCCATTCAGTCGCAGAGGGGC-CGCCGATCCTAGCTTGC
BoHV-6	TGGAGCGCATTTGCCAGAGGCCCATTCAGTCGCAGAGGGGC A CGCCGATCCTAGCTTGC
Basenposition innerhalb der Sequenz: 184 – 200 (Konsensus) 40126 - 40142 (BoHV-6)	
Konsensus	GCGTG A TTTACGGCGAC
BoHV-6	GCGTG G TTTATGGAGAC

Abbildung 8: Vergleich der bestimmten herpesviralen DNA-Sequenz (Konsensussequenz) mit der in der NCBI Datenbank hinterlegten Sequenz des BoHV-6-Isolats „Pensylvania 47“ (Sequenz ID: KJ705001.1). Das als „Konsensussequenz“ bezeichnete DNA-Fragment entstand aus dem Alignment von 22 herpesviralen DNA-Sequenzen, die in Gewebeproben von 21 Hausrindern und einem Auerochsen detektiert wurden. Vor dem Abgleich mit Sequenzen der NCBI Datenbank wurden abweichende Basen an den Positionen 7 und 168 durch eine Lücke („-“) ersetzt

2.4. Untersuchung von Nasentupfer-Proben auf BoHV-2-Genom

Eine BoHV-2-Ausscheidung über den oberen Respirationstrakt ist gezeigt (siehe Kapitel II.1.6). CASTRUCCI (1975) isolierten BoHV-2 aus Nasentupfern von sechs Kälbern, nachdem diese intravenös mit BoHV-2 infiziert worden waren. Es ist allerdings unklar, ob das Virus hier tatsächlich über den Respirationstrakt ausgeschieden wurde, oder über kleine Läsionen, die in und um die Nase der Tiere beobachtet wurden. In einer zweiten Studie wurde BoHV-2 sowohl einige Tage nach der initialen intradermalen bzw. intravenösen Infektion, als auch nach der später erfolgenden experimentellen

Reaktivierung mittels Dexamethasongabe aus den Nasentupfern von sieben Kälbern isoliert (CASTRUCCI et al., 1982). Interessanterweise wurde nach der Reaktivierung bei sechs von sieben Tieren BoHV-2 ausschließlich aus den Nasentupfern isoliert, alle anderen Proben blieben negativ.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in keinem der untersuchten 918 Nasentupfer BoHV-2-Genom nachgewiesen, obwohl entsprechend der Seroprävalenzdaten ca. 6% der bayerischen Rinder BoHV-2-Träger sein müssten. Diese Untersuchungsergebnisse könnten zum einen darauf hinweisen, dass eine Reaktivierung von BoHV-2-Infektionen mit nachfolgender Ausscheidung über den Respirationstrakt selten vorkommt. Zum anderen könnten die vorliegenden respiratorischen Erkrankungen nicht zur Reaktivierung einer BoHV-2-Infektion geführt haben.

In beiden Studien, in welchen BoHV-2 aus Nasentupfern isoliert wurde, wurden Kälber als Versuchstiere genutzt (CASTRUCCI, 1975; CASTRUCCI et al., 1982). Es wäre denkbar, dass eine Ausscheidung von BoHV-2 über den Respirationstrakt vom ursprünglichen Infektionsweg abhängen könnte. Die Notwendigkeit, weitere Untersuchungen zu BoHV-2-Infektionen durchzuführen, um wichtige epidemiologische Fragestellungen zu klären, wird erneut deutlich.

2.5. Virologische Untersuchung von Rotwild-Organproben auf BoHV-2-Genom

Wie in der Publikation SINGER et al. (2020) diskutiert, käme Rotwild als Wildtier-Reservoir für BoHV-2-Infektionen in Betracht. BoHV-2-Infektionen wurden bereits bei mehreren Spezies heimischer und exotischer Wildwiederkäuer virologisch oder serologisch nachgewiesen, darunter auch bei Rotwild (PLOWRIGHT und JESSETT, 1971; THIRY et al., 1988; KALMAN und EGYED, 2005). Auch bei afrikanischen Wildwiederkäuern und Paarhufern aus Regionen, in welchen BoHV-2-Infektionen bei Rindern oder Büffeln bekannt waren, wurden BoHV-2-Ak nachgewiesen (PLOWRIGHT und JESSETT (1971), siehe Kapitel II.1.5). Ein Erregeraustausch zwischen Rindern und Wildtieren muss daher in epidemiologische Überlegungen einbezogen werden.

In Bayern sind BoHV-2-Ak positive Rinder gehäuft im südbayerischen Raum, also in Alpennähe zu finden (siehe Publikation SINGER et al. (2020)). In diesen Gebieten befindet sich der Hauptteil der bayerischen Rotwildbezirke, außerhalb derer Rotwild strikt bejagt wird. Da bekannt ist, dass Rotwild und Rinder aufgrund der extensiven Haltungsform im südbayerischen Raum in Kontakt kommen und die gegenseitige Übertragung von Tuberkulose bereits bewiesen ist (PRODINGER et al., 2002; SCHOEPF et al., 2012; FINK et al., 2015), wäre es denkbar, dass Rotwild auch für BoHV-2-Infektionen ein Virusreservoir darstellen könnte.

Daher wurden die im Rahmen eines Tuberkulose-Monitoring-Programmes gewonnenen Proben von Rotwild auch auf BoHV-2-Genom untersucht. Von jedem erlegten Stück Rotwild wurden, sofern vorhanden, Darm-, Retropharyngeal- und in wenigen Fällen auch Lungenlymphknoten, sowie Tonsillen ausgewählt. Die Präsenz von BoHV-2-Genom in lymphatischem Gewebe war bereits durch frühere Studien gezeigt (CASTRUCCI et al., 1982; KALMAN und EGYED, 2005; TORRES et al., 2009).

Bis zum Abschluss der Arbeiten standen 518 Proben von 195 Stück Rotwild zur Verfügung. Organe, die zu einem Tier gehörten, wurden im Pool extrahiert und mittels PanHerpes-PCR untersucht. Aus 34 der untersuchten 195 Proben-Pools wurde DNA in der Länge der erwarteten Zielsequenz von 215-235bp amplifiziert. Die Sequenz-Analyse erfolgte, wie im Kapitel IV.2.2 beschrieben nach Erstellung einer getrimmten Konsensussequenz. Die resultierenden Sequenzen mit einer Länge von 233bp stimmten mit einer Ausnahme zu ca. 97% überein (Abb. 9). Der Abgleich mit den in der NCBI Datenbank gespeicherten Sequenzinformationen erfolgte mit Hilfe des BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) und ergab eine hohe Übereinstimmung mit verschiedenen Sequenzen des Fallow deer lymphotropic herpesvirus, des Type 2 ruminant rhadinovirus und des Sambar gammaherpesvirus. Die einzige, sich deutlich von den anderen unterscheidende Sequenz hatte die höchste Übereinstimmung mit Isolaten des Elk gammaherpesvirus.

In den bis dato untersuchten Rotwildproben konnte BoHV-2-Genom nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurden andere Gammaherpesviren in der

bayerischen Rotwildpopulation detektiert. Zur genaueren Einordnung der Bedeutung der erhaltenen Sequenzinformationen werden weitere Proben in Anschluss-Arbeiten untersucht.

Interne Bezeichnung	Alignment
Basen 1 - 60 der Sequenzen	
Rotwild 1	TTTGTAACTCGGTGTACCGGGTTACACGGGGGTTGCATCGGGGATGCTTCCGTGCCTTAAAA
Rotwild 2	TTTGTAACTCGGTGTATGGGTTTACGGGGGTTGCATCGGGGATGCTTCCGTGCCTTAAAA
Rotwild 3	TTTGTAACTCGGTGTACCGGGTTACACGGGGGTTGCATCGGGGATGCTTCCGTGCCTTAAAA
Rotwild 4	TTTGTAACTCGGTGTATGGGTTGACGGGGGTTGCATCGGGGATGCTTCCGTGCCTTAAAA
Basen 61 – 120 der Sequenzen	
Rotwild 1	TCGCAGAAACGGTTACACTCAGAGGCAGAACGATGCTGGAATTAACAAAGAATTTTGTCG
Rotwild 2	TCGCAGAAACGGTTACACTCAGAGGCAGAACGATGCTGGAATTAACAAAGAATTTTGTCG
Rotwild 3	TCGCAGAAACGGTTACACTCATAGGCAGAACGATGCTGGAATTAACAAAGAATTTTGTCG
Rotwild 4	TCGCAGAAACGGTTACACTCAGAGGCAGAACGATGCTGGAATTAACAAAGAATTTTGTCG
Basen 121 – 180 der Sequenzen	
Rotwild 1	AAAACCTCACACTGGCAGACATATCCCGAATATGCCAACATGAAGTAAAGGCACCTTGATG
Rotwild 2	AAAACCTCACACTGGCAGACATATCCCGAATATGCCAACATGAAGTAAAGGCACCTTGATG
Rotwild 3	AAAACCTCACACTGGCAGACATATCCCGAATATGCCAACATGAAGTAAAGGCACCTTGATG
Rotwild 4	AAAACCTCACACTGGCAGACATATCCCGAATATGCCAACATGAAGTAAAGGCACCTTGATG
Basen 181 - 233 der Sequenzen	
Rotwild 1	GAATGGCCGAGGCCAGATTTGAGGTTATCTACGGCGACACGGACTCTGGGAGA
Rotwild 2	GAATGGCCGAGGCCAGATTTGAGGTTATTTACGGCGACACGGACTCTGGGAGA
Rotwild 3	GAATGGCCGAGGCCAGATTCGAGGTTATTTACGGCGACACGGACTCTGTGAGA
Rotwild 4	GAATGGCCGAGGCCAGATTCGAGGTTATTTACGGCGACACGGACTCTGTGAGA

Abbildung 9: Sequenzvergleich von vier exemplarischen, herpesviralen DNA-Sequenzen, welche aus Organpools aus Lymphknoten und Tonsillen von Rotwild amplifiziert wurden. Nicht-übereinstimmende Basen an den Stellen 17, 23, 82, 200, 209 und 229 sind grau hinterlegt

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die staatliche Bekämpfung der Infektionen mit Bovinen Alphaherpesviren 1 (BoHV-1) resultierte im Freistaat Bayern im Jahr 2011 in der BoHV-1-Freiheit gemäß Artikel 10 der Richtlinie 64/432/EWG. Zur Aufrechterhaltung dieses Status werden die Rinder nach den Vorgaben der Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV1-Verordnung) in regelmäßigen Abständen auf Antikörper gegen BoHV-1 untersucht. Sporadisch auftretende, reproduzierbare Reaktionen einiger Rinderseren in verschiedenen BoHV-1-ELISAs, die letztendlich aber nicht auf die Präsenz von BoHV-1-spezifischen Antikörpern zurückzuführen sind, stören seither immer wieder den Ablauf der serologischen Überwachung. Es wurde gezeigt, dass das Auftreten dieser sogenannten „nicht-negativen“ Reaktionen in statistischem Zusammenhang mit der Präsenz von Antikörpern gegen das *Bovine Alphaherpesvirus 2* (BoHV-2) steht. Letzteres ist primär als Erreger der Bovinen Herpesmammillitis (BHM), einer vesikulären bis ulzerativen Erkrankung der Euter- und Zitzenhaut von Milchkühen, bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Überblick über das BoHV-2-Infektionsgeschehen in der bayerischen Rinderpopulation zu gewinnen. BoHV-2-Seroprävalenzen sollten nach Untersuchung von Rinderseren aus einer repräsentativen Anzahl an Betrieben ($n_{\text{Seren}}=6801$, $n_{\text{Betriebe}}=406$) bestimmt und auf Regierungsbezirksebene dargestellt werden. Der Zusammenhang zwischen der BoHV-2-Seroprävalenz und den nicht-negativen BoHV-1-Reaktionen sollte außerdem für alle Regierungsbezirke Bayerns analysiert werden. Um akute oder latente BoHV-2-Infektionen nachzuweisen, sollte zunächst eine BoHV-2-spezifische PCR etabliert und Proben von Hautläsionen sowie Nasentupfer von Rindern mit respiratorischer Symptomatik untersucht werden. Durch Analysen entsprechenden Probenmaterials sollte auch die Rolle des Rotwilds als möglicher Reservoirwirt untersucht werden.

Insgesamt wurde für bayerische Rinder eine BoHV-2-Seroprävalenz von 5,51% (CI 4,97%-6,06%) festgestellt, wobei in 19,21% aller untersuchten Betriebe mindestens ein Tier mit BoHV-2-Antikörpern gehalten wurde.

Interessanterweise waren in Schwaben und Oberbayern deutlich mehr Betriebe betroffen (37,59% bzw. 20,73%) als in Nieder- und Nordbayern (3,85% bzw. 4,76%). Trotz der zum Teil relativ hohen Seroprävalenz auf Einzeltierebene, die in Schwaben mit 11,17% (CI 10,42%-11,91%) am höchsten lag, konnte in keiner der untersuchten Gewebe- (n=239) und Nasentupferproben (n=918) BoHV-2-Genom nachgewiesen werden. Daher ist davon auszugehen, dass klinische BoHV-2-Infektionen in Bayern aktuell keine wichtige Rolle spielen. Auch in Proben von 195 Stück Rotwild wurde BoHV-2-Genom nicht detektiert.

Der Zusammenhang zwischen der Präsenz von BoHV-2-Antikörpern und nicht-negativen BoHV-1-Reaktionen in Rinderseren basiert zwar nicht auf einer direkten Kreuzreaktivität auf Einzeltierebene, aber ein statistisch signifikanter Zusammenhang sowohl auf Einzeltierebene als auch auf der Ebene der Rinderhaltungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals statistisch gesicherte Daten zur Verbreitung der BoHV-2-Infektionen in Bayern erarbeitet. Diese Ergebnisse sind insbesondere im Zusammenhang mit der Beurteilung der nicht-negativen Reaktionen in der Überwachung der BoHV-1-Freiheit auch für die Tierseuchen-Bekämpfung in Bayern wichtig. Eine aufmerksame Beobachtung der BoHV-2-Prävalenzen und möglicher Ausbreitungstendenzen muss folgen. Verschiedene, noch offene Aspekte der BoHV-2-Infektionen in Bayern, wie die Genetik regionaler BoHV-2-Stämme und die aktuelle und zukünftige Epidemiologie der Infektionen müssen in anschließenden Arbeiten geklärt werden.

VI. SUMMARY

Bavaria, a large federal state in Germany, has been declared free from infections with *Bovine alphaherpesvirus 1* (BoHV-1) in 2011. To maintain this status, the cattle population is monitored for antibodies against BoHV-1 regularly, following national regulations. Since then, infrequent but recurrent reactivities of single bovine sera in BoHV-1-ELISAs are complicating serological surveillance. These “non-negative” reactions were statistically put into correlation with the presence of antibodies against *Bovine alphaherpesvirus 2* (BoHV-2). In Europe, BoHV-2 is primarily known as the agent causing bovine herpes mammillitis, which is a vesicular to ulcerative disease of the udder and teats of milking cows.

Therefore, the aim of this study was to analyze BoHV-2 infections in Bavarian cattle. Seroprevalences were determined for the individual Bavarian administrative districts after testing bovine blood sera from a representative number of farms ($n_{\text{sera}}=6801$, $n_{\text{farms}}=406$). Additionally, the putative correlation between BoHV-2 antibodies and non-negative BoHV-1 reactions was assessed for each administrative district. To detect acute or latent BoHV-2 infections, a specific PCR was established and tissue samples taken from skin lesions as well as nose swabs from bovines with respiratory symptoms were tested. Furthermore, the potential role of red deer as a reservoir host was addressed by testing relevant tissue samples.

Taken together, an overall seroprevalence of 5.51% (CI 4.97%-6.06%) was determined, with 19.21% of farms holding at least one BoHV-2 antibody positive animal. Interestingly, farms in Swabia and Upper Bavaria were markedly more affected (37.59% and 20.73%, respectively) than those in Lower and North Bavaria (3.85% and 4.76%, respectively). However, BoHV-2 genomes were not detected in any of the tissue samples ($n=239$) or nose swabs ($n=918$) analyzed, indicating that acute clinical cases are relatively rare. In addition, PCR analyses did not reveal the presence of BoHV-2 genomes in tissues of 195 red deer.

The previously reported relation between epidemiologically inexplicable sero-

reactivities in BoHV-1 ELISAs and the presence of BoHV-2 antibodies were statistically corroborated in this study. A direct cross correlation on the single sample level, however, does not exist.

Taken together, statistical valid data on BoHV-2 infections in Bavaria is for the first time presented. Data, which is also important in an administrative point of view, considering recurrent problems in the BoHV-1 sero-surveillance. Therefore, the future spread of BoHV-2 infections throughout Bavaria is an important issue and has to be further monitored. Moreover, as yet unexplained aspects like genetics of regional strains or the current and future epidemiology of infections will be addressed in future studies.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann M, Müller HK, Bruckner L, Riggenbach C, Kihm U. Die Bekämpfung der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (IBR) in der Schweiz von 1978 bis 1988. Schweiz Arch Tierheilkd 1989; 131: 397-407.

Ackermann M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. Vet Microbiol 2006; 113: 211-222.

Alexander RA, Plowright W, D.A. H. Cytopathogenic agents associated with lumpy skin disease of cattle. Bull Epiz Dis Afr 1957; 5: 489-492.

Anonymus. Council Directive 64/432/EEC of 26 June 1964 on animal health problems affecting intra-Community trade in bovine animals and swine. EUR-Lex, 1964: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31964L0432>. 14.06.2019.

Anonymus. Durchführungsbeschluss der Kommission vom 12. Oktober 2011 zur Änderung der Entscheidung 2004/558/EG hinsichtlich des amtlich anerkannten Status bestimmter Verwaltungsregionen Deutschlands als frei von der infektiösen bovinen Rhinotracheitis. EUR-Lex, 2011: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex:32011D0674>. 14.06.2019.

Anonymus. Amtliche Methodensammlung Bovine Herpesvirus Typ 1 Infektion (alle Formen). Friedrich-Loeffler-Institut, 2016a: https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/Document_derivate_00004797/TS8-Bovine-Herpesvirus-Typ12016-12-21.pdf. 11.09.2019.

Anonymus. Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV1-Verordnung). Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, Bundesamt für Justiz, 2016b: <https://www.gesetze-im-internet.de/bhv1v/BJNR275800997.html>. 14.06.2019.

Anonymus. Statistische Berichte - C31323 201700 - Viehbestände in Bayern 2017. Bayerisches Landesamt für Statistik, 2017: https://www.statistik.bayern.de/mam/produkte/veroeffentlichungen/statistische_berichte/c3132c_201700_61819.pdf. 16.04.2019.

Anonymus. Virus Taxonomy: 2018b Release. ICTV, 2018: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. 14.01.2019.

Anonymus. Liste der nach §11 Abs. 2 TierGesG zugelassenen Mittel. Zulassungsstelle für In-vitro-Diagnostika zum Nachweis von anzeigepflichtigen Tierseuchen oder melde- und mitteilungspflichtigen Tierkrankheiten, 2019: https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Service/Zulassungsstelle/deutsch/02_d_Zul_Mittel.pdf. 11.09.2019.

Barthold SW, Bowen RA, Hedrick RP, Knowles DP, Lairmore MD, Parrish CR, Saif LJ, Swayne DE. Herpesvirales. In: Fenner's Veterinary Virology, 4. edn. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. Amsterdam u.a.: Academic Press/Elsevier 2011a:

Barthold SW, Bowen RA, Hedrick RP, Knowles DP, Lairmore MD, Parrish CR, Saif LJ, Swayne DE. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. In: Fenner's Veterinary Virology, 4. edn. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, eds. Amsterdam u.a.: Academic Press/Elsevier 2011b: 101-124.

Böttcher J, Boje J, Janowetz B, Alex M, König P, Hagg M, Götz F, Renner K, Otterbein C, Mages J, Meier N, Wittkowski G. Epidemiologically non-feasible singleton reactors at the final stage of BoHV1 eradication: serological evidence of BoHV2 cross-reactivity. *Vet Microbiol* 2012; 159: 282-290.

Buchman TG, Roizman B. Anatomy of bovine mammillitis DNA. I Restriction endonuclease maps of four populations of molecules that differ in the relative orientation of their long and short components. *J Virol* 1978a; 25: 395-407.

Buchman TG, Roizman B. Anatomy of bovine mammillitis DNA II. Size and arrangements of the deoxynucleotide sequences. *J Virol* 1978b; 27: 239-254.

Campos FS, Franco AC, Oliveira MT, Firpo R, Strelczuk G, Fontoura FE, Kulmann MI, Maidana S, Romera SA, Spilki FR, Silva AD, Hubner SO, Roehe PM. Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 2014; 171: 182-188.

Cargnelutti JF, Weiblen R, Flores EF. A multiplex PCR for viruses associated with exanthematic and vesicular disease in cattle. *J Virol Methods* 2017; 239: 38-41.

Castrucci G, Pedini B, Cilli V, Arancia G. Characterisation of a viral agent resembling bovine herpes mammillitis virus. *Vet Rec* 1972; 90: 325-335.

Castrucci G, Cilli V, Andati HG. A serologic survey in cattle to bovid herpesvirus 2. *Boll Ist Sieroter Milan* 1974; 53: 645-650.

Castrucci G. A comparison in calves of the antigenicity of three strains of bovid herpesvirus 2. *Res Vet Sci* 1975; 18: 208-215.

Castrucci G, Frigeri F, Cilli V, Tesei B, Arush AM, Pedini B, Ranucci S, Rampichini L. Attempts to reactivate bovid herpesvirus-2 in experimentally infected calves. *Am J Vet Res* 1980; 41: 1890-1893.

Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, Ranucci S, Cilli V, Tesei B, Rampichini L. Reactivation in calves of Bovid herpesvirus 2 latent infection. *Arch Virol* 1982; 72: 75-81.

d'Offay JM, Floyd JG, Jr., Eberle R, Saliki JT, Brock KV, D'Andrea GH, McMillan KL. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine herpesvirus type 2 DNA in skin lesions from cattle suspected to have pseudo-lumpy skin disease.

J Am Vet Med Assoc 2003; 222: 1404-1407, 1366-1407.

De-Giuli L, Magnino S, Vigo PG, Labalestra I, Fabbi M. Development of a polymerase chain reaction and restriction typing assay for the diagnosis of bovine herpesvirus 1, bovine herpesvirus 2, and bovine herpesvirus 4 infections. J Vet Diagn Invest 2002; 14: 353-356.

Deas DW, Johnston WS. An outbreak of an ulcerative skin condition of the udder and teats of dairy cattle in the East of Scotland. Vet Rec 1966; 78: 828-829.

Ehlers B, Borchers K, Grund C, Frolich K, Ludwig H, Buhk HJ. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. Virus Genes 1999a; 18: 211-220.

Ehlers B, Goltz M, Ejercito MP, Dasika GK, Letchworth GJ. Bovine herpesvirus type 2 is closely related to the primate alphaherpesviruses. Virus Genes 1999b; 19: 197-203.

Engels M, Metzler A, Wyler R. Ein Virus sucht seine Krankheit: Seroepizootologische Untersuchung über das Vorkommen der Bovinen Herpes Mammillitis in der Schweiz. Schweiz Arch Tierheilkd 1979; 121: 565-576.

Fink M, Schleicher C, Gonano M, Prodinger WM, Pacciarini M, Glawischnig W, Ryser-Degiorgis MP, Walzer C, Stalder GL, Lombardo D, Schobesberger H, Winter P, Buttner M. Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. Emerg Infect Dis 2015; 21: 464-467.

Flint SJ, Equist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Immune Defenses. In: Principles of Virology, 3. edn Washington, DC: ASM Press 2009: 86-133.

Gibbs EP, Johnson RH, Osborne AD. Field observations on the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *Vet Rec* 1972; 91: 395-401.

Gibbs EP, Johnson RH, Osborne AD. Experimental studies of the epidemiology of bovine herpes mammillitis. *Res Vet Sci* 1973a; 14: 139-144.

Gibbs EP, Johnson RH, Gatehouse AG. A laboratory technique for studying the mechanical transmission of bovine herpes mammillitis virus by the stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.). *Res Vet Sci* 1973b; 14: 145-147.

Gonano M, Pikalo J, Schiefer P, Eichinger M, Wodak E, Loitsch A, Schmoll F (2015) Einsatzmöglichkeit eines kommerziellen BoHV-2-ELISAs in der Routinediagnostik boviner Herpesviren. DACH Epidemiologie Tagung, Berlin

Haig DA. Production of generalised skin lesions in calves inoculated with bovine mammillitis virus. *Vet Rec* 1967; 80: 311-312.

Hammerschmidt W, Conraths F, Mankertz J, Pauli G, Ludwig H, Buhk HJ. Conservation of a gene cluster including glycoprotein B in bovine herpesvirus type 2 (BHV-2) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *Virology* 1988; 165: 388-405.

Hofmann M, Engels M, Metzler A, Wyler R. Reaktivierung einer latenten Bovinen Herpesmamillitisvirus (BHV-2)-Infektion bei einem Tier mit fraglicher IBR-Serologie. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1987; 129: 437-442.

Imai K, Ishihara R, Jayawardane GW, Nishimori K, Nishimori T. Development of a shuttle polymerase chain reaction for the detection of bovine herpesvirus 2. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 953-956.

Janett F, Stauber N, Schraner E, Stocker H, Thun R. Bovine Herpes-Mammillitis: klinische Symptome und serologischer Verlauf. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2000; 142: 375-380.

Jelic I, May JT. The UL24 consensus regions of bovine herpesvirus 2 isolate 554 and clinical isolates of herpes simplex viruses 1 and 2. *J Gen Appl Microbiol* 2003; 49: 363-366.

Johnston WS, Deas DW. Production of Generalised Skin Lesions in Calves Inoculated with Bovine Mammillitis Virus. *Veterinary Record* 1967; 80: 420.

Johnston WS, Wray C, Scott JA. An outbreak of bovine herpes mammillitis in a suckler herd. *Vet Rec* 1971; 88: 372.

Kalman D, Egyed L. PCR detection of bovine herpesviruses from nonbovine ruminants in Hungary. *J Wildl Dis* 2005; 41: 482-488.

Kemp R, Holliman A, Nettleton PF. Atypical bovine herpes mammillitis affecting cows and calves. *Vet Rec* 2008; 163: 119-121.

Letchworth GJ, LaDue R. Bovine herpes mammillitis in two New York dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 902-907.

Letchworth GJ, Carmichael LE. Bovid herpesvirus 2 latency: failure to recover virus from central sensory nerve ganglia. *Can J Comp Med* 1982; 46: 76-79.

Levings RL, Kaeberle ML, Reed DE. Cross-reactions of bovine herpesvirus 1 antigens with those of other cattle herpesviruses. *Vet Microbiol* 1984; 9: 329-344.

Maragos C, Shaw R, May JT. Restriction endonuclease cleavage analysis of DNA from two bovine herpes mammillitis viruses, isolated in different parts of Australia. *Aust Vet J* 1986; 63: 372-373.

Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. The isolation of viruses and the detection of virus and viral antigens. In: *Clinical Veterinary*

Microbiology, 2. edn. Edwards R, Hewat C, eds. Edinburgh u.a.: Mosby/Elsevier 2013a: 67-77.

Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Herpesviridae. In: Clinical Veterinary Microbiology, 2. edn. Edwards R, Hewat C, eds. Edinburgh u.a.: Mosby/Elsevier 2013b: 559-573.

Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Molecular techniques in diagnostic microbiology. In: Clinical Veterinary Microbiology, 2. edn. Edwards R, Hewat C, eds. Edinburgh u.a.: Mosby/Elsevier 2013c: 59-65.

Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Serological diagnosis. In: Clinical Veterinary Microbiology, 2. edn. Edwards R, Hewat C, eds. Edinburgh u.a.: Mosby/Elsevier 2013d: 49-58.

Mars MH, Rijsewijk FA, Maris-Veldhuis MA, Hage JJ, van Oirschot JT. Presence of bovine herpesvirus 1 gB-seropositive but gE-seronegative Dutch cattle with no apparent virus exposure. *Vet Rec* 2000; 147: 328-331.

Martin JR, Harvey D, Montpetit C. La mammillite herpetique bovine au Quebec. *Can Vet J* 1987; 28: 529-532.

Martin W, Martin B, Lauder I. Ulceration of cows' teats caused by a virus. *Vet. Rec* 1964; 76: 15-16.

Martin WB, Martin B, Hay D, Lauder IM. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *Vet Rec* 1966a; 78: 494-497.

Martin WB, Hay D, Crawford LV, Bouvier GL, Crawford EM. Characteristics of bovine mammillitis virus. *J Gen Microbiol* 1966b; 45: 325-332.

Martin WB, James ZH, Lauder IM, Murray M, Pirie HM. Pathogenesis of bovine

mamillitis virus infection in cattle. *Am J Vet Res* 1969; 30: 2151-2166.

Martin WB, Scott FM. Latent infection of cattle with bovid herpesvirus 2. *Arch Virol* 1979; 60: 51-58.

May JT. Homology of bovine herpesvirus 2 and herpes simplex virus 1 proteins. *Acta Virol* 2001; 45: 197-199.

Moussa A, Fedida M, Millet A, Arnaud G, Lecomte J. Étude clinique et virologique de cas de thélite ulcéralive bovine apparus dans l'Orne en 1981. *Rec. Méd. vét.* 1982; 158: 197-203.

Müller R, Engels M, Metzler AE, Boller H, Wyler R. Der erste abgeklärte Fall von boviner Herpesmamillitis in der Schweiz. *Tierarztl Prax* 1984; 12: 297-305.

Nathanson N, Gonzalez-Scarano F. Viral Persistence. In: *Viral Pathogenesis and Immunity*, 2. edn Amsterdam a.o.: 2007: 130-145.

Pastoret P-P, Antoine H, Schwers A, Thiry E, Castrucci G (1983) Enquête sérologique sur l'infection par le virus de la mamillite herpétique bovine (Bovine herpesvirus 2, BHV 2) en Belgique. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 267-270

Pepper T, Stafford L, Johnson R, Osborne A. Bovine ulcerative mammillitis caused by a herpesvirus. *Veterinary Record* 1966; 78: 569-570.

Plowright W, Jessett DM. Investigations of Allerton-type herpes virus infection in East African game animals and cattle. *J Hyg (Lond)* 1971; 69: 209-222.

Probert M, Povey RC. Experimental studies concerning the possibility of a latent carrier state in bovine herpes mammillitis (BHM). *Arch Virol* 1975; 48: 29-38.

Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schonbauer M, Glawischnig W. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2270-2272.

Rweyemamu MM, Johnson RH. Bovine herpes mammillitis virus. II. Standardization of an in-vitro serum neutralization test. *Br Vet J* 1968; 124: 9-15.

Rweyemamu MM, Johnson RH, Laurillard RE. Serological findings in bovine herpes mammillitis. *Br Vet J* 1969; 125: 317-325.

Schiefer P (2016) BoHV 1/2 - Fakten und Erkenntnisse aus dem Seuchengeschehen 2015. Labordialog BoHV-1 Diagnostik und BoHV-2 Kreuzreaktionen, Innsbruck

Schoepf K, Prodinger WM, Glawischnig W, Hofer E, Revilla-Fernandez S, Hofrichter J, Fritz J, Kofer J, Schmoll F. A Two-Years' Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in Red Deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN Vet Sci* 2012; 2012: 245138.

Scott FM, Martin WB, Goudswaard J. Antibody to bovid herpesvirus 2 in the sera from cattle in the Netherlands. *Vet Rec* 1978; 102: 464.

Scott FM, Holliman A. Serum antibodies to bovine mammillitis virus in pregnant heifers. *Vet Rec* 1984; 114: 19.

Scott H, Fausa O, Ek J, Brandtzaeg P. Immune response patterns in coeliac disease. Serum antibodies to dietary antigens measured by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 25-32.

Sheppard M, May JT. Location and characterization of the bovine herpesvirus type 2 thymidine kinase gene. *J Gen Virol* 1989; 70 (Pt 11): 3067-3071.

Singer S, Hoffmann B, Hafner-Marx A, Christian J, Forster F, Schneider K, Knubben-Schweizer G, Neubauer-Juric A. Bovine alphaherpesvirus 2 infections in Bavaria: an analysis of the current situation - several years after eradicating Bovine alphaherpesvirus 1. BMC Vet. res., accepted for publication, 10 March 2020.

Sterz H, Ludwig H, Rott R. Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammillitis virus. Intervirology 1974; 2: 1-13.

Tavella A (2016) Herpes-Mammillitis BoHV-2 in Südtirol. Labordialog BoHV-1 Diagnostik und BoHV-2 Kreuzreaktionen, Innsbruck

Thiry E, Vercouter M, Dubuisson J, Barrat J, Sepulchre C, Gerardy C, Meersschaert C, Collin B, Blancou J, Pastoret PP. Serological survey of herpesvirus infections in wild ruminants of France and Belgium. J Wildl Dis 1988; 24: 268-273.

Torres FD, Almeida SR, Silva MS, Weiblen R, Flores EF. Distribution of latent bovine herpesvirus 2 DNA in tissues of experimentally infected sheep. Res Vet Sci 2009; 87: 161-166.

Torres FD, Cargnelutti JF, Masuda EK, Weiblen R, Flores EF. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 2 in a guinea pig model. Microb Pathog 2010; 48: 69-73.

Turner AJ, Morgan IR, Sykes WE, Nicholls WA. Bovine herpes mammillitis of dairy cattle in Victoria. Aust Vet J 1976a; 52: 170-173.

Turner AJ, Kovesdy L, Morgan IR. Isolation and characterisation of bovine herpesvirus mammillitis virus and its pathogenicity for cattle. Aust Vet J 1976b; 52: 166-169.

Watanabe TTN, Moeller RB, Jr., Crossley BM, Blanchard PC. Outbreaks of bovine herpesvirus 2 infections in calves causing ear and facial skin lesions. *J Vet Diagn Invest* 2017; 29: 686-690.

Weaver LD, Dellers RW, Dardiri AH. Bovine herpes mammillitis in New York. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 160: 1643-1644.

Yedloutschnig R, Breese S, Jr., Hess W, Dardiri A, Taylor W, Barnes D, Page R, Ruebke H. Bovine herpes mammillitis-like disease diagnosed in the United States. *Proc. U.S. Anim. Hlth. Assoc.* 1970; 74: 208-212.

VIII. DANKSAGUNG

Ein herzliches Dankeschön an die Verantwortlichen des LGL Oberschleißheim und des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt und Verbraucherschutz für die Ermöglichung des BoHV-2-Projektes und die Bereitstellung aller notwendigen Mittel.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Antonie Neubauer-Juric für die Organisation und Betreuung des Projektes und meiner Doktorarbeit. Liebe Toni, ich danke dir für die immer offenstehende Tür, die interessanten Gespräche und dein Vertrauen in mich. Durch deine Begeisterung an jeder noch so verzwickten Fragestellung hast du es geschafft mich immer wieder zu motivieren. Danke für die herzliche Aufnahme in das Vetviro-Team und die Möglichkeit auch nach der Doktorarbeit noch eine Zeit bei euch zu bleiben. Eine Chefin wie dich kann man sich nur wünschen!

Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer für die unkomplizierte und freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit.

Danke den Kollegen der Pathologie des LGL Oberschleißheim und der Serologie des LGL Oberschleißheim und Erlangen für die fleißige Probenbereitstellung. Besonderer Dank geht an Dr. Friederike Forster, die mir in Sachen Bovine Herpesviren und ELISA immer mit Rat zur Seite stand und die auch in stressigeren Zeiten darauf geachtet hat, dass mir keine Proben durch die Lappen gehen. Danke an Katharina Schneider für die Unterstützung in allen statistischen Fragestellungen.

Ein ganz großes Dankeschön an all meine lieben aktuellen und ehemaligen Kolleginnen aus der Veterinärvirologie des LGL. Ich habe mich sehr wohl bei euch gefühlt und möchte mich für die Herzlichkeit, mit der ihr mich aufgenommen habt, bedanken. Ein besonderer Dank geht an Susanne Gellert für die tolle Einarbeitung in die PCR, an Birgit von Kölln-Braun für die oft sehr kurzfristige Bereitstellung von Zellplatten, an Isabella Dzijan für die stets

geduldigen Erklärungen, an Manuela Nienhaus, die mir mein Unbehagen vor dem SNT genommen hat, und an Anika Schüle, meine „Leidensgenossin“ während der Zeit der Doktorarbeit.

Danke liebe Corinna, für die Hilfe bei der Gestaltung der Grafiken und Tabellen. Du warst mir in den vergangenen Jahren auch in allen anderen Lebensbereichen mit tatkräftiger Unterstützung zur Seite gestanden. Ich konnte mir deiner Freundschaft immer sicher sein und dafür bin ich dir sehr dankbar.

Danke Andrea für die sehr kurzfristige und zuverlässige Überarbeitung der englischen Texte.

Ein großer Dank geht an Pauline mit ihren Eltern und Großeltern. Liebe Pauli, ich danke euch, dass ihr mich stets so herzlich bei euch aufgenommen habt. Ich finde wir waren und sind immer noch ein gutes Team!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, bei meinen Eltern und Großeltern, meinen beiden Schwestern und meinem Ehemann. Liebe Mama, lieber Papa, ich bin euch von Herzen dankbar für die Zuneigung und Hilfe, die ihr mir in jeder Lebenslage entgegenbringt. Danke, dass ihr mir durch eure moralische und finanzielle Unterstützung das Tiermedizin-Studium ermöglicht habt. Danke, liebe Susi und Anika, dass ich mich immer auf euch verlassen kann. Schwestern wie euch zu haben ist unbezahlbar! Lieber Stephan, ich danke dir für deinen Rückhalt, dein offenes Ohr, deine Zuneigung und dein Vertrauen.

Liebe Oma, lieber Opa, ihr habt uns drei von klein auf begleitet, habt euch mit uns gefreut, mit uns gelitten, für uns gebetet. Ich wünschte ihr könntet noch miterleben, dass ich auch den letzten Schritt zum „richtigen Doktor“ gemeistert habe. Ich vermisse euch und hab euch lieb.

DANKE