

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. E. Märtlbauer

**Untersuchungen zum Nachweis des  
Virus der Bovinen Virusdiarrhoe in Hautgewebeproben von  
transient infizierten Rindern mittels *real time* RT-PCR und  
Antigen-ELISA**

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

Von  
Corinna Pfahler, geb. Baudy  
aus  
Landau i. d. Pfalz

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer  
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Klee

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

meiner Familie

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Schrifttum</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Taxonomie und Aufbau des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Methoden und bedeutsame Virusstrukturen für den Virusnachweis</b>	<b>5</b>
2.2.1 Virusisolierung	5
2.2.2 Nachweis von BVDV-Antigen	6
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	6
Durchflusszytometrie/Fluorescence activated cell sorting (FACS)	7
Immunhistochemische Untersuchungen (IHC)	7
2.2.3 Nachweis von BVDV-Antikörpern	8
Serumneutralisationstest (SNT)	8
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	8
2.2.4 RT-Polymerase chain reaction (RT-PCR)	11
<b>2.3 Infektionen mit dem BVD-Virus</b>	<b>14</b>
2.3.1 Postnatale Infektion	14
2.3.2 Intrauterine Infektion	17
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Kälber für Laborversuch und aus der Feldstudie</b>	<b>20</b>
3.1.1 Infektionsversuch	20
BVDV-freie Kälber	20
Infektion	20
Probennahme	21
3.1.2 Studientiere aus dem Feld	22
<b>3.2 Gewinnung und Bearbeitung des Probenmaterials</b>	<b>24</b>
3.2.1 EDTA-Blut	24
Leukozytenpellets	24
Blutplasma	24
3.2.2 Serum	24
3.2.3 Hautgewebe	25
3.2.4 Nasen- und Speichelsekret	25

<b>3.3</b>	<b>Methoden zum Virusnachweis</b>	<b>26</b>
3.3.1	Virusisolierung	26
	Zellkultur	26
	Animpfen der Proben auf die Zellkultur	26
3.3.2	<i>Real time</i> RT-PCR	27
	Isolierung der BVDV-RNA	27
	Durchführung der real time RT-PCR	27
	Auswertung	28
3.3.3	BVDV-NS3-Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz	29
3.3.4	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	30
	BVDV-E <sup>ms</sup> -spezifischer Antigen-ELISA	30
	BVDV-NS3-spezifischer Antikörper-ELISA	30
	Auswertung der ELISAs	30
3.3.5	Serumneutralisationstest	31
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse des Infektionsversuches</b>	<b>32</b>
4.1.1	Temperaturverlauf und klinische Erkrankung	32
4.1.2	Gesamtleukozytenzahl	34
4.1.3	Virusisolierung	34
4.1.4	<i>Real time</i> RT-PCR	36
	Virusnachweis aus Leukozytenpellets	36
	Virusnachweis aus Plasma	37
	Virusnachweis im Hautgewebe	38
	Virusnachweis aus Nasen- und Speichelsekret	38
4.1.5	BVDV-NS3-Nachweis	40
4.1.6	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	40
	BVDV-E <sup>ms</sup> -spezifischer Antigen-ELISA	40
	BVDV-NS3-spezifischer Antikörper-ELISA	41
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse transient infizierter Kälber aus der Feldstudie</b>	<b>43</b>
4.2.1	Studientier M	43
	<i>Real time</i> RT-PCR	43
	BVDV-NS3-Nachweis	47
	Enzyme linked immunosorbent assay	47

Virusisolierung und Genotypisierung	49
Nachweis neutralisierender Antikörper	50
4.2.2 Transiente Infektion junger Kälber aus der Feldstudie	51
<b>5. Diskussion</b>	<b>55</b>
5.1 Infektionsversuch	55
5.2 Transiente Infektion junger Kälber aus der Feldstudie	60
5.3 Studientier M	63
5.4 Resumee	67
<b>6. Zusammenfassung/Summary</b>	<b>69</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>73</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>91</b>
8.1 Materialliste	91
8.1.1 Geräte und Laborhilfsmittel	91
8.1.2 Zellen	92
8.1.3 Kommerzielle Kits	93
8.1.4 Chemikalien, Enzyme und Lösungen	93
8.2 Verwendete Abkürzungen	96

## 1. Einleitung

Die Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) gilt weltweit als bedeutsame Virusinfektion der Rinder. Große Verluste entstehen durch eine Vielzahl von Krankheitsbildern, wie Störungen der Fruchtbarkeit, Aborte, missgebildete und lebensschwache Kälber, gastrointestinale und respiratorische Schleimhauterkrankungen, schwere hämorrhagische akute Erkrankungen und die letal endende *Mucosal Disease*. Welchen Verlauf eine Infektion nimmt hängt wesentlich vom Wirtstier (Immunstatus, Trächtigkeit) und vom Virus (Virulenz, Genotyp, Biotyp) ab.

Postnatale Infektionen gehen meist mit milden Symptomen, wie einer Erhöhung der Körpertemperatur und geringem Nasenausfluss oder Durchfall einher oder verlaufen klinisch völlig inapparent. Als Reaktion auf die Infektion kommt es zur Serokonversion. Bei Infektionen seronegativer trächtiger Tiere kann es zur transplazentaren Infektion des Fetus kommen. Im ersten Trächtigkeitsdrittel entstehen dabei durch Ausbildung einer Immuntoleranz des Fetus persistent infizierte Tiere (PI-Tiere). Solche Tiere scheiden das Virus mit allen Se- und Exkreten lebenslang in großen Mengen aus und stellen die wichtigste Transmissionsquelle für das BVDV dar. Transient infizierten Tieren wird diesbezüglich nur eine untergeordnete Rolle eingeräumt. Neuere BVDV-Bekämpfungskonzepte beruhen auf dem Virusnachweis in Ohrstanzen neugeborener Kälber zur Detektion und Merzung der PI-Tiere. Transiente prä- und postnatale BVDV-Infektionen führen vermutlich auch zur Virusvermehrung im Hautgewebe. Dabei ist bisher nicht bekannt, welche Mengen an Virusantigen und Virusnukleinsäure in den Hautbiopsien solcher Kälber nachweisbar sind.

In dieser Arbeit wurde die transiente BVDV-Infektion junger Tiere untersucht. Hierzu wurde ein Infektionsversuch mit Kälbern durchgeführt. Zur Frage prä- und postnataler transienter Infektion wurden auch Untersuchungen an Kälbern aus einer bayerischen Feldstudie („Studie zur Eignung der Ohrstanzmethode bei neugeborenen Kälbern zur Bekämpfung der BVD/MD“) durchgeführt und begleitend epidemiologische Daten zu den Herkunftsbetrieben ausgewertet.

## 2. Schrifttum

### 2.1 Taxonomie und Aufbau des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) mit den beiden Genotypen I und II bildet zusammen mit dem Border Disease Virus (BDV) und dem Virus der Klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus*, CSFV) das Genus *Pestivirus* (Fauquet et al., 2005). Neben den Pestiviren gehören die zwei Genera *Flavivirus* (u. a. Gelbfiebervirus) und *Hepacivirus* (HCV, Hepatitis C-Virus) zur Familie *Flaviviridae*. Die Vertreter der drei Gattungen sind eng verwandt. Sie weisen deutliche Übereinstimmungen in ihrer Genomorganisation auf (Collett et al., 1988a). Sie besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und einen offenen Leserahmen, in dem die Anordnung der Gene große Homologien zeigt (Chambers et al., 1990; Collett et al., 1988a). Ebenfalls ist der Replikationszyklus identisch (Deng und Brock, 1992).

Die Zuordnung der Pestiviren in die ehemals drei Spezies BVDV, CSFV und BDV erfolgte anfänglich anhand des Wirtsspektrums und durch serologische Untersuchungen mit Hilfe mono- und polyklonaler Antikörper (Corapi et al., 1990a; Edwards et al., 1988; Edwards und Paton, 1995). Da Pestiviren nicht streng wirtsspezifisch sind und durch die serologische Differenzierung nur ein Teil der genetischen Variabilität im Bereich der Antigene dargestellt werden kann, wird heute die Einteilung der Pestiviren in Genotypen und deren Untergruppen mit Hilfe der Genomanalyse vorgenommen. Diese beruht in erster Linie auf der Sequenzierung bestimmter Abschnitte im Genom, wobei insbesondere die Bereiche des N<sup>pro</sup>, des E2 und der hochkonservierten 5'UTR (*untranslated region*) von Bedeutung sind (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Becher et al., 2003; Harasawa, 1996; Ridpath et al., 1994; Van Rijn et al., 1997; Vilcek et al., 1997). Das BVDV wird in die zwei Genotypen BVDV-1 und BVDV-2 unterteilt, wobei in Deutschland BVDV-1 vorherrschend ist und BVDV-2 seltener gefunden wird (Beer und Wolf, 1999; Pellerin et al., 1994; Wolfmeyer et al., 1997). Infolge der Beschreibung immer neuer Isolate ist die Einteilung der Pestiviren einem laufenden Wandel unterzogen. Aktuell werden für den BVDV-1 Genotyp 15 Subgruppen beschrieben (Jackova et al., 2008; Nagai et al., 2008; Vilcek et al., 2005). Das BVDV-2 wird derzeit in zwei oder drei Untergruppen gegliedert und das CSFV wurde in zwei Subgruppen unterteilt (Becher et al., 1999b; Beer et al., 2002). Für das BDV wurden bislang vier mögliche Genotypen beschrieben (Arnal et al., 2004; Becher et al., 2003), daneben sind weitere Isolate beschrieben (Giraffe-1, Reindeer-1), die nicht mit den "klassischen" Gruppen in engerer

Beziehung stehen und somit potentielle neue Genotypen darstellen (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Becher et al., 2003).

Die behüllten BVD-Virionen haben einen Durchmesser von 40-60nm. Unter dem Elektronenmikroskop stellen sie sich als pleomorphe, sphärische Partikel mit knopfähnlichen Projektionen dar (Bielefeldt und Bloch, 1982; Gray und Nettleton, 1987; Ward und Kaeberle, 1984). Das Nukleokapsid besitzt einen Durchmesser von 20-25nm (Ohmann, 1990) und wird von einer Lipiddoppelmembran umgeben. An deren Oberfläche befinden sich die drei glykolisierten Hüllproteine E<sup>ms</sup>, E1 und E2 (Collett et al., 1988b; Thiel et al., 1991). Sie bilden zusammen mit dem Kapsidprotein C die Strukturproteine des BVDV. Daneben werden sieben (nzp BVDV) bzw. acht (zp BVDV) Nichtstrukturproteine codiert (Donis, 1995).

Das BVDV weist ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und einer Größe von zirka 12500 Nukleotiden auf. Am 5'-Ende befindet sich ein nicht translaterter Bereich (5'-UTR) mit einer Länge von zirka 385 Nukleotiden (Collett et al., 1988c). Innerhalb der 5'-UTR liegt ein Abschnitt, der als Ribosomenbindungsstelle (IRES, *internal ribosomal entry site*) dient. Die IRES ist entscheidend für die Initiation der Translation der viralen Struktur- und Nichtstrukturproteine (Chon et al., 1998). Im Anschluss folgt ein offener Leserahmen (ORF, *open reading frame*), der für zirka 4000 Aminosäuren codiert (Collett et al., 1988c; Collett et al., 1988b). Das N<sup>pro</sup> ist das erste vom ORF codierte Protein, gefolgt vom Strukturprotein C sowie den drei Strukturproteinen der Virushülle (E1, E2 und E<sup>ms</sup>), danach folgen die Nichtstrukturproteine (NS) p7, NS2/3, NS4a und b sowie NS5a und b. Abschließend folgt im BVDV-Genom die 3'UTR, welche mehr als 200 Nukleotide umfasst und wie bei allen Vertretern der *Flaviviridae* nicht polyadenyliert ist (Collett et al., 1988c).

Die Bezeichnung N<sup>pro</sup> steht für N-terminale Protease. Hier handelt es sich um eine Autoprotease, die sich selbstständig vom Polyprotein abspaltet (Wiskerchen et al., 1991). Das Strukturprotein C bildet das Nukleokapsid. Außerdem spielt es eine wichtige Rolle für die Translokation der nachfolgenden Proteine in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Bei den Hüllproteinen E<sup>ms</sup>, E1 und E2 handelt es sich um Glykoproteine, welche Bestandteil der Virushülle sind. Das E1 wird sowohl in infizierten Zellen als auch in Virionen in kovalenter Bindung mit dem E2 nachgewiesen. Neben den Heterodimeren von E1 und E2 bilden das E<sup>ms</sup> und E2 Homodimere. Mit Hilfe von Disulfidbrücken werden die Homo- bzw. Heterodimere stabilisiert (Rümenapf et al., 1993; Thiel et al., 1991). Das E2 ist ein Hauptbestandteil der Hülle und spielt eine entscheidende Rolle für den Rezeptor-abhängigen Eintritt des Virus in die Wirtszelle (Hulst und Moormann, 1997; Xue und Minocha, 1996). Dieses Glykoprotein

stellt das Hauptimmunogen dar und bewirkt die Bildung neutralisierender Antikörper (Donis et al., 1988; Donis, 1995). Gegen das E<sup>ms</sup> und E1 werden nur wenig bzw. keine neutralisierenden Antikörper gebildet (König et al., 1995; Rügenapf et al., 1993).

Das Nichtstrukturprotein p7 liegt im Genom zwischen dem E2 und NS2/3. Da die proteolytische Spaltung zwischen dem E2 und p7 nicht immer vollständig abläuft, kann es zu E2p7 Mischprodukten kommen, über deren Einfluss im Infektionsgeschehen bislang wenig bekannt ist (Elbers et al., 1996). Dem NS2/3 kommt beim BVD-Virus eine besondere Bedeutung zu, da infolge seiner Prozessierung zwischen nicht zytopathogenem (nzp) und zytopathogenem (zp) Virus unterschieden werden kann, was für die Pathogenese der *Mucosal Disease* entscheidend ist. Die Nichtstrukturproteine 2 und 3 sind Spaltungsprodukte des größten viralen Nichtstrukturproteins, dem NS 2/3. Bei nzp BVD-Viren kann, mit Ausnahme eines kurzen Zeitraumes nach der Zellinfektion, nur das ungespaltene NS2/3 nachgewiesen werden, dagegen kommen bei zp BVD-Viren neben dem NS2/3-Protein auch die Spaltprodukte NS2 und NS3 vor. Das NS3 gilt dabei als Marker für die Zytopathogenität (Donis et al., 1991; Donis und Dubovi, 1987a; Lackner et al., 2004). Die Spaltung des NS2/3 beruht auf Mutationen im Virusgenom. Insertionen von RNA-Sequenzen aus der Wirtszelle in das BVDV-Genom (Greiser-Wilke et al., 1993; Meyers et al., 1991), Punktmutationen oder Duplikationen im Bereich des NS2/3-Gens (Kummerer und Meyers, 2000; Meyers et al., 1992) sowie die Rekombination eines nzp Biotyps mit einem zp Biotyp (Becher et al., 1999a) können zur Spaltung von NS2 und NS3 führen. Das NS3 stellt einen wichtigen Teil des pestiviralen Replikationsapparates dar (Tautz et al., 1999; Xu et al., 1997). Es hat eine Helikase- und eine NTPase- Aktivität. Beide spielen in der frühen Phase der Virusreplikation eine zentrale Rolle (Grassmann et al., 1999). Gu et al. (2000) konnten ferner zeigen, dass die Helikase-Aktivität für die Synthese des Negativ-Stranges wichtig ist. Außerdem ist das NS3 für die posttranslationale proteolytische Prozessierung weiterer Nichtstrukturproteine zuständig (Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997). Das NS3-Protein ist aufgrund seiner funktionell wichtigen Domänen hochkonserviert und induziert die Bildung von nicht neutralisierenden Antikörpern (Corapi et al., 1990a; Deregt et al., 1990).

Zusammen mit dem NS2/3 bilden die Nichtstrukturproteine NS4a und 4b, NS5a und 5b den Replikationsapparat der Pestiviren (Behrens et al., 1998). Die 3'UTR ist im Gegensatz zu der 5'UTR weniger konserviert und hat bei der Replikationssteuerung Bedeutung (Yu et al., 1999).

## **2.2 Methoden und bedeutsame Virusstrukturen für den BVDV-Nachweis**

Für den BVDV-Nachweis wurden verschiedene Testsysteme entwickelt. Diese basieren auf der Detektion unterschiedlicher Virusstrukturen und -eigenschaften.

### **2.2.1 Virusisolierung**

Die Virusisolierung in der Zellkultur stellt die „Goldstandardmethode“ zum Nachweis infektiösen Virusmaterials dar. Zur Validierung von Testsystemen oder zur Überprüfung neuer Methoden wird sie wegen ihrer hohen Sensitivität als Referenzsystem angewandt (Graham et al., 1998; Saliki und Dubovi, 2004; Sandvik und Krogsrud, 1995). Bei der Virusisolierung wird Probenmaterial auf Zellen (z.B. bovine Nierenzellen, bovine Turbinalzellen, bovine Hodenzellen) gegeben und mehrere Tage kultiviert (Gillespie et al., 1963). Als Probenmaterial dienen unter anderem Vollblut, Serum, Nasensekret, Gewebe oder Organproben. Die besten Ergebnisse lassen sich mit isolierten Leukozyten erreichen (Brock, 1995). Die Auswertung erfolgt nach Fixation der Zellen mit Hilfe enzym- oder fluoreszenzmarkierter Antikörper im Fluoreszenzmikroskop, im Durchflusszytometer oder als Immunoperoxidase-Assay oder Monolayer-ELISA im Photometer (Afshar et al., 1991; Ward und Kaeberle, 1984). Dabei werden in den infizierten Zellen virale Proteine nachgewiesen. BVDV Isolate lassen sich anhand ihres Verhaltens in der Zellkultur in einen nicht zytopathogen (nzp) und einen zytopathogen (zp) Biotyp unterscheiden. Bei einem zp Virus kann in der Zellkultur nach etwa 48 Stunden der Zelltod durch Apoptose beobachtet werden (Gillespie et al., 1960; Zhang et al., 1996). Da das zp BVDV nicht zu persistierenden Infektionen führen kann, handelt es sich bei Proben, welche aus dem Feld stammen, zum großen Teil um Isolate des nzp BVDV. Maternale Antikörper bei jungen PI-Tieren (diagnostische Lücke) oder neutralisierende Antikörper bei einer akuten Infektion, toxische Inhaltsstoffe sowie Pilz- oder Bakterienkontaminationen können die Virusisolierung negativ beeinflussen oder ganz verhindern (Palfi et al., 1993; Saliki und Dubovi, 2004; Schelp und Greiser-Wilke, 2003; Zimmer et al., 2004).

### 2.2.2 Nachweis von BVDV-Antigen

Der Nachweis von BVDV-Antigen stellt im Gegensatz zur Virusisolierung eine schnelle Methode zum Virusnachweis dar. Er beruht auf dem Einsatz mono- oder polyklonaler Antikörper, welche an das in der Probe befindliche Antigen binden. Dazu zählen sowohl hochkonservierte Bindestellen, die für eine „panpesti“-Diagnostik geeignet sind, als auch spezifische Antigenstrukturen, mit denen eine indirekte Klassifizierung von Genotypen möglich ist (Beer und Wolf, 1999; Edwards et al., 1991; Paton et al., 1991b). Je nach Probenmaterial kommen verschiedene Techniken für den Antigen-Nachweis zum Einsatz.

#### Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

In Folge der Entwicklung von BVDV-spezifischen monoklonalen Antikörpern und dem Einsatz von Antiseren wurden verschiedene Antigen-*capture* ELISAs zum Nachweis des Nichtstrukturproteins 2/3 etabliert. Als Probenmaterial dienten dabei isolierte Blutleukozyten oder Gewebeproben (Gottschalk et al., 1992; Mignon et al., 1991; Shannon et al., 1991).

Beim *Capture* ELISA werden Platten mit virusspezifischen Antikörpern beschichtet. Ist BVDV-Antigen in der Probe vorhanden, bindet dieses an den Antikörpern. Die Detektion erfolgt anschließend mit enzymmarkierten Antikörpern. Nach Zugabe des Substrats gibt die Farbintensität Aufschluss über die Menge an gebundenem Antigen. Beim NS3-Protein sind wichtige funktionelle Domänen hochkonserviert und stellen Epitope dar, die eine starke, nicht neutralisierende Antikörperreaktion hervorrufen (Collett, 1992; Deregt et al., 2005). Diese Anti-NS3-Antikörper sind wegen der Konservierung der Antigenepitope innerhalb des Genus Pestivirus kreuzreaktiv (Donis und Dubovi, 1987b). Im Rahmen der Diagnostik stellen kolostral aufgenommene NS3-Antikörper bei der Detektion von jungen PI-Tieren ein Problem dar, da maternale Antikörper bei NS3-ELISAs zu falsch-negativen Ergebnissen führen können (kolostrale Lücke) (Brinkhof et al., 1996). Im Gegensatz zum NS3 werden gegen das Hüllprotein E<sup>ms</sup> nur begrenzt Antikörper gebildet, diese besitzen jedoch neutralisierende Eigenschaften (Weiland et al., 1992). Auch bei der E<sup>ms</sup>-Detektion kommt es durch maternale Antikörper zu falsch-negativen Ergebnissen, man geht aber davon aus, dass diese diagnostische Lücke kürzer ist (Sandvik, 2005). Daher wird in neueren ELISAs bevorzugt das E<sup>ms</sup> als nachzuweisendes Zielantigen verwendet (Kühne et al., 2005; Saliki et al., 2000; Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Das E<sup>ms</sup> ist eines der drei glykosilierten Proteine der Virushülle. Die Bezeichnung E<sup>ms</sup> (*envelope, ribonuclease, soluble*) entstand aufgrund seiner Eigenschaften: ein frei lösliches Hüllprotein mit einer deutlichen Ribonukleaseaktivität. Im

Vergleich zu E1 und E2 besitzt es keinen transmembralen Anker und kann sowohl an der Oberfläche von virusinfizierten Zellen und Virionen, als auch frei im umliegenden Medium gefunden werden (Rümenapf et al., 1993). Folglich können für die E<sup>ms</sup>-ELISAs Serum-, Plasma- und Milchproben genutzt werden (Schelp und Greiser-Wilke, 2003), was eine wesentliche Erleichterung der Testdurchführung zur Folge hat.

Als weiteres Probenmaterial zum BVDV-Nachweis eignet sich auch frisches oder getrocknetes Ohrgewebe. Es wurde mehrmals beschrieben, dass PI-Tiere damit sicher nachgewiesen werden konnten (Cornish et al., 2005; Fux, 2007; Kühne et al., 2005).

### **Durchflusszytometrie/Fluorescence activated cell sorting (FACS)**

Bei dieser Methode werden nach vorangegangener indirekter Immunfluoreszenzfärbung mittels Durchflusszytometrie virale Proteine in infizierten Blutleukozyten detektiert (Qvist et al., 1990; Qvist et al., 1991). Die Leukozyten werden nach Lyse der Erythrozyten und durch einen Zentrifugationsschritt isoliert. Anschließend werden die Zellen fixiert und permeabilisiert und somit für Antikörper durchgängig gemacht. Ein primärer monoklonaler Antikörper, der an das zytoplasmatisch vorliegende NS3 bindet, wird durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers gekennzeichnet. Als primärer Antikörper für den BVDV-Nachweis wird zum Beispiel der monoklonale Antikörper-Mix WB 103/105 eingesetzt. Er wird als reaktiv mit allen getesteten Pestiviren beschrieben („panpesti-reaktiv“) (Beer und Wolf, 1999). Der Anteil fluoreszierender Zellen wird im Anschluss im Durchflusszytometer bestimmt.

### **Immunhistochemische Untersuchungen**

Immunhistochemische Methoden zum Nachweis von BVDV-Antigen im Gewebe wurden schon früh zur Aufklärung der Pathogenese der BVD/MD eingesetzt (Bielefeldt, 1988; Bruscke et al., 1998; Wilhelmsen et al., 1991), werden aber auch im Rahmen der pathologischen Diagnostik angewandt (Ellis et al., 1998; Haines et al., 1992; Liebler-Tenorio et al., 2002; Thür et al., 1996). Es eignen sich Organe wie Thymus, Lymphknoten, Schilddrüse, Maulschleimhaut, Ösophagus und Labmagen als Untersuchungsmaterial. Zur Diagnostik am lebenden Tier haben sich mehrfach Hautbiopsien bewährt (Braun et al., 1999; Thür et al., 1996). Zum Einsatz kommen immunhistologische Nachweismethoden an Gefrier- oder Paraffinschnitten von Organproben (Bielefeldt, 1988; Haines et al., 1992; Thür et al., 1996). Zur Färbung von Kryostatschnitten und formalin-fixierten Paraffinschnitten werden

die LSAB (Labeled Streptavidin Biotin)-Peroxidase-Methode oder fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Für die Sensitivität der Methodik ist dabei die Verknüpfung aus Schnitttechnik, Fixierungsart und Färbung entscheidend. Thür et al. (1996, 1997) konnten bei der Untersuchung verschiedener Organe die besten Ergebnisse mit Kryostatschnitten und der LSAB-Methode erzielen. Dabei ist jedoch die Wahl des primären Antikörpers und damit das nachgewiesene BVDV-Antigen ebenso entscheidend. Fixierung oder autolytische Prozesse können instabile Epitope denaturieren und die Antikörperbindung stören. Thür et al (1996) konnten beobachten, dass ein gegen das NS2/3 gerichteter monoklonaler AK (C16) mit Kryostatschnitten beste Ergebnisse ergab, formalin-fixierte Schnitte allerdings ungeeignet waren. Der E<sup>ms</sup>-Nachweis in formalin-fixierten Proben gelang hingegen mit dem monoklonalen Antikörper 15C5 problemlos (Ellis et al., 1995; Thür et al., 1997).

In experimentellen Infektionsversuchen zur Untersuchung der Pathogenese der transienten Infektion wurde die IHC als geeignete Nachweisweismethode mehrfach beschrieben (Brodersen und Kelling, 1998; Ellis et al., 1998; Liebler-Tenorio et al., 2002; Liebler-Tenorio et al., 2004; Marshall et al., 1996; Wilhelmsen et al., 1990). Rinder wurden mit nzp oder zp Viren infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion euthanasiert. Virales Antigen konnte am frühesten in lymphatischen Geweben (Lymphknoten, Tonsillen, Peyer'sche Platten) gefunden werden, später auch in anderen Organen. Liebler-Tenorio et al. (2002) konnten bereits an Tag 3 nach Infektion in Tonsillen, Thymus und Lymphknoten im Kopfbereich und Darm BVDV-Antigen nachweisen. An Tag 6 nach Infektion konnte in Lunge, Oesophagus, Rumen, Abomasum und Pankreas das Virus gefunden werden.

Persistent infizierte Tiere konnten mittels Hautbiopsie sicher als BVDV-positiv erkannt werden (Grooms und Keilen, 2002; Njaa et al., 2000). Im Gegensatz dazu brachten immunhistochemisch untersuchte Hautproben von transient infizierten Tieren nur vereinzelt (Grooms und Keilen, 2002) oder keine (Ridpath et al., 2002) positiven Ergebnisse.

### **2.2.3 Nachweis von BVDV-Antikörpern**

Zur Detektion von Antikörpern gegen das BVDV wurden verschiedene Methoden beschrieben (Sandvik, 1999). Routinemäßig kommen allerdings vorwiegend der Serumneutralisationstest und der Antikörper-ELISA zum Einsatz.

#### **Serumneutralisationstest (SNT)**

Obwohl der Serumneutralisationstest sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, stellt er den „Goldstandard“ für den Nachweis von BVDV-Antikörpern dar. Es handelt sich um einen sehr sensitiven und spezifischen Test, der zudem die Möglichkeit der Quantifizierung der Antikörpermenge ermöglicht (Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Die Auswertung erfolgt bei nicht zytopathogenen Stämmen nach Immunfärbung der Zellen. Der Nachweis einer transienten BVDV-Infektion ist durch einen signifikanten Titeranstieg in Serumpaaren (im Abstand von zwei Wochen) zu belegen. Allerdings können die SNT-Titer in Abhängigkeit von verwendetem Virusisolat, der Zellkultur-Linie oder Arbeitstechnik vor allem zwischen Laboren deutliche Schwankungen aufzeigen. (Brock, 1995).

#### **Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

Da der Antikörper-ELISA im Gegensatz zum SNT innerhalb weniger Stunden ein Ergebnis liefern kann, wird er heute vorwiegend für die Routinediagnostik verwendet. Als Probenmaterial kommen neben Serum auch Milch oder Plasma zum Einsatz (Beaudeau et al., 2001; Kramps et al., 1999; Niskanen et al., 1991; Niskanen, 1993). Es wurden verschiedene ELISAs zum Antikörper-Nachweis entwickelt, wobei sowohl kompetitive ELISAs (blocking ELISA) (Kramps et al., 1999; Paton et al., 1991a; Westenbrink et al., 1986) als auch *Capture* ELISAs (Juntti et al., 1987; Niskanen et al., 1989) beschrieben wurden. Beim blocking ELISA konkurrieren in der Probe befindliche Antikörper mit testintrinsic markierten Kompetitor-Antikörpern um die Bindungsstellen am Antigen. Befinden sich keine Antikörper in der Probe können die enzymmarkierten Antikörper alle Bindungsstellen besetzen und es kommt in der Folge zur kompletten Umsetzung des Enzymsubstrats. Sind BVDV-Antikörper in der Probe vorhanden, besetzen sie die Bindungsstellen des Antigens, die Kompetitor-Antikörper bleiben nicht an der festen Phase haften und die Indikatorreaktion bleibt aus. Im Vergleich zum SNT weisen diese Testsysteme nicht nur neutralisierende Antikörper nach. So können abhängig von den eingesetzten Antigenen polyklonale BVDV-Antikörper oder gezielt

spezifische Antikörper (zum Beispiel anti-NS3-AK) detektiert werden (Beaudeau et al., 2001; Kramps et al., 1999; Paton et al., 1991a; Schelp und Greiser-Wilke, 2003).

#### 2.2.4 RT-Polymerase chain reaction (RT-PCR)

Die ersten Protokolle für den BVDV-Nachweis mit der RT-PCR wurden zu Beginn der 1990er Jahre beschrieben. Zur Detektion des RNA-Genoms des BVDV muss vor der eigentlichen Amplifikation eine reverse Transkription (RT) erfolgen. In den ersten beschriebenen Protokollen wurden diese beiden Reaktionen getrennt durchgeführt (Belak und Ballagi-Pordany, 1991; Brock, 1991; Easton et al., 1994). Damit ist ein Öffnen der Reaktionsgefäße verbunden, was eine wichtige Quelle für Kontaminationen darstellt (Sandvik, 2005). Mit Entwicklung von „one-tube“ Protokollen konnte diese Kontaminationsgefahr eliminiert werden (Drew et al., 1999; Pfeffer et al., 2000). Um die Sensitivität und Spezifität der konventionellen PCR zu verbessern, wurden verschiedene Assays für eine *nested* RT-PCR entwickelt (Hyndman et al., 1998; Sullivan und Akkina, 1995). Hierbei werden zwei PCR-Reaktionen hintereinander durchgeführt, wobei das Amplifikat der ersten PCR als Template für die zweite dient. Das dafür verwendete Primerpaar (*nested* Primer) liegt innerhalb der Sequenz des ersten PCR-Produkts und führt somit zu einem kürzeren Amplifikat. Bei der konventionellen PCR erfolgt der Nachweis der Reaktionsprodukte in der Regel mittels Gel-Elektrophorese. Das Reaktionsgefäß, in dem bei positiven Proben große Mengen an vervielfältigter cDNA enthalten sind, muss geöffnet werden, um auf das Agarose-Gel aufgetragen zu werden. Es besteht dadurch die Gefahr der Verunreinigung von Labor und Probenmaterial (McGoldrick et al., 1999).

Die *real time* RT-PCR stellt eine Weiterentwicklung der PCR-Verfahren dar. Sie ist eine schnelle und sensitive Methode zur *In-vitro*-Amplifizierung spezifischer Genomabschnitte und ermöglicht die Detektion kleinster DNA-Mengen in einem geschlossenen System, wodurch das Kontaminationsproblem der konventionellen PCR zum größten Teil gelöst werden konnte (Gaede et al., 2005). Bei der *real time* PCR werden fluoreszierende Reportermoleküle, entweder in Form eines interkalierenden Farbstoffs oder einer Sonde, verwendet. Bei Sonden handelt es sich um kurze Oligonukleotid-Fragmente, die an die amplifizierte Zielsequenz komplementär binden. Im Verlauf der PCR steigt die Reporterfluoreszenz, unabhängig von der angewandten Sondentechnik, proportional mit der Produktmenge an. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt durch ein optisches System. Neben dem qualitativen Nachweis des PCR-Produktes lässt sich anhand der Kinetik des Fluoreszenzanstiegs eine Quantifizierung durchführen (Mackay et al., 2002).

In den früheren RT-PCR Systemen wurden verschiedene Genomabschnitte wie das E<sup>ns</sup> oder NS3, als Zielstruktur verwendet (Belak und Ballagi-Pordany, 1991; Brock, 1991). Neuere

Protokolle basieren auf dem Nachweis der hoch konservierten 5'UTR (Gaede et al., 2005; Hoffmann et al., 2006; Radwan et al., 1995; Vilcek et al., 1994). Die 5'UTR ist ein Bereich am 5'-Ende des BVDV-Genoms, der nicht in ein Proteinprodukt übersetzt wird. Innerhalb der 5'UTR befindet sich die IRES (*internal ribosomal entry site*), die eine *cap*-unabhängige Translation der nachfolgenden Proteinsequenzen ermöglicht (Chon et al., 1998; Deng und Brock, 1993). An der Entstehung der IRES sind hochkonservierte Abschnitte beteiligt, welche zum Großteil komplementär zueinander sind. Dadurch kommt es zur Ausbildung von komplexen Sekundär- und Tertiärstrukturen. Innerhalb der 5'UTR befinden sich mehrere AUG-Codons. Allerdings wird nur das direkt nach der IRES gelegene AUG-Codon als Startpunkt für die Translation des ORF (*open reading frame*) von den Ribosomen erkannt (Deng und Brock, 1993; Le et al., 1998; Poole et al., 1995). Fletcher *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die der IRES nachfolgende Nukleotidsequenz und Struktur für eine effektive Initiation der Translation von Bedeutung ist. Die hohe Konservierung ermöglichte die Entwicklung sowohl von genotyp- als auch genusspezifischen Primern für die Diagnostik.

Die Untersuchung diverser Probenmaterialien wie Milch (Gaede et al., 2003; Renshaw et al., 2000), Blut- und Serumproben (Gaede et al., 2003; Weinstock et al., 2001), Samenproben (Da Silva et al., 1995), frische oder formalinfixierte Gewebeproben (Bhudevi und Weinstock, 2003; Scheibner et al., 2000) mittels PCR wurden beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass die RT-PCR vergleichend mit der Virusisolierung oder dem AG-ELISA wesentlich sensitiver ist (Renshaw et al., 2000). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass eine der Probenart angepasste Isolierung der Virus-RNA eine ebenso entscheidende Rolle spielt, um eine hohe Sensitivität zu erreichen (Fux, 2007; Scheibner et al., 2000). Mit der RT-PCR sind Ausgangsmengen von 10 bis 1000 Kopien des BVDV-Genoms nachzuweisen (Brock 1995). Somit kann auch die Detektion von kleinsten Virusmengen erreicht werden. Da solch ein hoch sensitives System die Poolung von Proben erlaubt, ist es für Massenuntersuchungen in der Routinediagnostik durchaus geeignet (Drew et al., 1999; Gaede et al., 2003; Weinstock et al., 2001). Ridpath et al. (2002) beschrieben den Einsatz der RT-PCR zum BVDV-Nachweis bei Kälbern, die sich durch experimentelle Inokulation von verschiedenen Virusstämmen transient mit dem BVDV infizierten. Bei der Untersuchung von Seren konnte bei 3 von 16 Tieren ein positives PCR-Ergebnis erzielt werden.

Die RT-PCR wurde in verschiedenen Studien nicht nur für den BVDV-Nachweis, sondern zur gleichzeitigen Genotypisierung eingesetzt (Bhudevi und Weinstock, 2001; Letellier et al., 1999; Ridpath und Bolin, 1998). Gaede et al. (2005) nutzten ein panpesti-reaktives Primerpaar

in Verbindung mit verschiedenen Sonden, um zwischen BVDV, CSFV und BDV zu differenzieren.

## 2.3 Infektionen mit dem BVD-Virus

Infektionen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe zeigen ein weites Spektrum an klinischen Ausprägungen: von der akuten Infektion mit einem milden oder inapparenten klinischen Verlauf bis hin zur *Mucosal Disease* (MD), die für die Tiere tödlich endet. Dabei stellen persistent infizierte (PI-) Tiere die wichtigste Quelle für die Transmission des BVDV dar, da sie lebenslang das Virus mit allen Se- und Exkreten in großen Mengen ausscheiden. Akut infizierte Tiere spielen für die Übertragung eine untergeordnete Rolle, da eine Virusausscheidung nur über einen kurzen Zeitraum in geringen Mengen erfolgt (Brownlie, 1990; Houe, 1995). Welche Ausprägung eine BVDV-Infektion annimmt und wie die Ausbreitung innerhalb einer Herde abläuft ist vom Virus (Genotyp, Biotyp, Virulenz), vom Wirtstier (Immunstatus, Trächtigkeitsstadium, Kolostrumaufnahme, Sekundärerreger) um vom Umfeld (Bestandsart und -größe, Aufstallung, Umwelteinflüsse) abhängig.

### 2.3.1 Postnatale Infektion

Bei immunkompetenten, seronegativen Rindern kommt eine Infektion mit dem BVDV überwiegend durch direkten oder indirekten Kontakt zu PI-Tieren zustande und verläuft zum größten Teil subklinisch (Baker, 1995; Houe, 1995). Nach der Infektion erfolgt eine primäre Virusvermehrung in der oronasalen Schleimhaut und dem lokalen Lymphgewebe, im Anschluss daran kommt es zur Virämie mit systemischer Virusausbreitung im Organismus (Bolin und Ridpath, 1990). Während der ersten drei bis zehn Tage ist es möglich, geringe Virusmengen aus Nasensekret und Blut zu isolieren (Brownlie, 1990). Mit dem Einsetzen der Immunantwort kommt es zur Eliminierung des Erregers und zur Serokonversion. Die Tiere weisen eine lebenslange Immunität auf (Brownlie, 1990; Harkness et al., 1978). In experimentellen Infektionsversuchen mit Kälbern wurden ein Anstieg der Körpertemperatur, eine Leukozytopenie, sowie die Virusausscheidung mit Nasensekreten beschrieben. Außerdem zeigten die Tiere sporadisch Husten und Nasenausfluss. Die Höchstwerte bei der Körpertemperatur lagen zwischen 40°C und 41,6°C und konnten durchschnittlich um den 8. Tag nach Infektion beobachtet werden. Die Blutleukozyten sanken im Durchschnitt zwischen Tag vier und sechs nach Infektion auf die niedrigsten Werte ab. Die Tiere zeigten in dieser Zeit teilweise ein reduziertes Allgemeinbefinden. Des Weiteren ließ sich zwischen dem 3. und 9. Tag nach Infektion BVD-Virus aus Nasensekret und Blutleukozyten isolieren. Eine Serokonversion als Reaktion des Immunsystems auf die Infektion konnte bei der Mehrheit der

Tiere zwischen dem 14. und dem 21. Tag nach Infektion beobachtet werden (Brodersen und Kelling, 1998; Müller-Doblies et al., 2004; Sandvik et al., 1997; Traven et al., 1991). Brusckke *et al.* (1998) konnten mittels Virusisolierung hohe BVDV-Titer zwei Tage nach Infektion in den Tonsillen und dem umliegenden lymphatischen Gewebe beobachten. Ebenso ließ sich in dieser Zeit Virus aus der Milz und den Peyer Platten im Darm isolieren. Bei einem Tier ließ sich zwischen Tag 2 und 8 nach Infektion durchgehend Virus aus dem Nasensekret mit einem Maximaltiter von  $10^{3,2}$  KID<sub>50</sub>/ml anzüchten. Die restlichen Tiere zeigten vereinzelt positive Ergebnisse zwischen Tag 1 und 8 mit Virustitern zwischen  $10^{2,5}$  und  $10^{3,1}$  KID<sub>50</sub>/ml. Aus Blutleukozyten konnten geringe Mengen Virus zwischen dem 4. und 7. Tag nach Infektion nachgewiesen werden.

Neben der subklinischen Verlaufsform kann es nach einer Infektion mit dem BVDV auch zum Krankheitsbild der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) kommen. Die Tiere zeigten Schwäche, Anorexie, Nasenausfluss, Erosionen und Ulzerationen im Maulbereich und Durchfall. Bei laktierenden Kühen konnte ein Rückgang der Milchleistung beobachtet werden (Moerman et al., 1994). Mehrfach wurden auch Infektionen durch andere Erreger in Verbindung mit einer BVDV-Infektion beschrieben. Man geht davon aus, dass die erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen aufgrund einer sekundären Immunsuppression hervorgerufen wird (Howard, 1990; Potgieter et al., 1984; Reggiardo und Kaeberle, 1981; Yates, 1982). Schwere Verlaufsformen wie das Hämorrhagische Syndrom wurden erstmals in Nordamerika beschrieben. Dabei kam es bei erwachsenen Rindern und Mastkälbern zu einer deutlichen Thrombozytopenie mit multiplen Blutungen. Als klinische Befunde wurden Fieber, Leukozytopenie, Epistaxis und wässriger bis blutiger Durchfall beobachtet. Vereinzelt zeigten Tiere Erosionen in der Maulschleimhaut. Diese hämorrhagische Verlaufsform geht zudem mit einer vergleichsweise hohen Letalität einher (Baker, 1995; Corapi et al., 1990b; Liebler et al., 1995; Rebhun et al., 1989).

Im Gegensatz zu PI-Tieren scheiden transient infizierte Tiere das Virus nur über einen kurzen Zeitraum in geringen Mengen aus. Daher kommt es nur selten durch direkten Kontakt zur Infektion anderer Tiere innerhalb einer Gruppe. Niskanen et al. (2000) führten einen Infektionsversuch durch, bei dem sich fünf Kälber erfolgreich durch direkten Kontakt zu einem PI-Tier in einem Zeitraum von sechs Stunden mit dem BVDV infizierten. Diese akut infizierten Tiere hatten anschließend über zwei Wochen mit 14 BVDV-negativen Kälbern direkten Kontakt. Von diesen 14 Kälbern wurde keines mit dem BVDV-Virus infiziert.

Neben dem direkten oder indirekten Kontakt zu PI-Tieren stellt der Samen eines BVDV-infizierten Bullen eine weitere Quelle für eine Infektion infolge des Deckaktes oder der künstlichen Besamung dar. Es wurde wiederholt beschrieben, dass der Samen von PI-Bullen das BVD-Virus enthält (Grooms, 2004; McClurkin et al., 1979; Meyling und Jensen, 1988). Aber auch bei akut infizierten Bullen kann es während der Virämie zu einer transienten Virusreplikation im Hoden kommen (Baker, 1995; Kirkland et al., 1991). Zudem wurden über einen längeren Zeitraum persistierende BVDV-Infektionen im Hodengewebe bei immunkompetenten Bullen berichtet (Dünser et al., 2005; Voges et al., 1998). Meyling et al. (1988) konnte beobachten, dass von zwölf Antikörper-negativen Kühen, welche mit Sperma eines PI-Bullen besamt wurden, alle innerhalb eines Zeitraumes von zwei Wochen BVDV-Antikörper entwickelten. Eine Kuh brachte ein PI-Kalb zur Welt. Des Weiteren besteht die Gefahr einer Infektion von trächtigen Nachbartieren aufgrund der transienten Infektion der besamten Kühe (Houe, 1995).

Klinische Bedeutung kommt der BVDV-Infektion gravider Kühe als Ursache für die diaplazentare Infektion von Feten zu. Dies kann zur Geburt persistent infizierter Kälber, missgebildeten oder transient infizierter Kälber führen.

### 2.3.2 Intrauterine Infektion

Die Auswirkungen einer intrauterinen Infektion des Fetus mit dem BVDV sind in erster Linie vom Zeitpunkt der Gravidität abhängig. Hat um den Zeitpunkt der Befruchtung eine Infektion stattgefunden, kann dies zu negativen Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit führen. Im Zusammenhang mit der Infektion konnten Entzündungen von Ovarien und Eileiter sowie ein reduziertes Follikelwachstum nachgewiesen werden (Archbald et al., 1973; Fray et al., 1999; Ssentongo et al., 1980). Neben solchen pathologisch-anatomischen Veränderungen wird auch eine gestörte Hormonausschüttung der Eierstöcke als Ursache für Störungen im Reproduktionszyklus diskutiert (Fray et al., 2000; Fray et al., 2002; Grooms et al., 1998). Kommt es in dieser frühen Phase der Gravidität zum Absterben des Embryos wird er resorbiert, was sich in der Herde durch „Umrindern“ bemerkbar macht (McGowan et al., 1993; Virakul et al., 1988).

Erfolgt die Infektion zu einem späteren Zeitpunkt der Trächtigkeit, ist vor allem der Entwicklungszustand des fetalen Immunsystems ausschlaggebend für den weiteren Verlauf. Schon früh wurde von Aborten in Zusammenhang mit einer BVDV-Infektion berichtet (Olafson et al., 1946). Man geht davon aus, dass zu jedem Zeitpunkt der Trächtigkeit der fetale Tod durch eine transplazentare Infektion ausgelöst werden kann. Am häufigsten wurden Aborte jedoch nach Infektionen im ersten und zweiten Trimester der Trächtigkeit beobachtet. (Brownlie et al., 1998; Liebler-Tenorio, 2005). Der fetale Tod tritt vermutlich 10 bis 27 Tage nach der Infektion ein, wobei bis zur Ausstoßung mehrere Wochen oder Monate vergehen und auch mumifizierte Früchte vorkommen können (Baker, 1995; Done et al., 1980; Grooms, 2004; Thierauf, 1993).

Bei Infektionen vor dem 100. Trächtigkeitstag, seltener bis zum 125. Tag kann es zur Ausbildung einer Immuntoleranz gegenüber dem BVD-Virus kommen, was die Geburt von persistent infizierten Kälbern zur Folge hat. Innerhalb dieser Zeitspanne ist das Immunsystem des Fetus noch nicht vollständig entwickelt und es kommt zur Ausbildung einer B- und T-lymphozytären Immuntoleranz (McClurkin et al., 1984). Eine genaue Abgrenzung des Zeitraumes, in der es zur Entwicklung von immuntoleranten Kälbern kommt, ist schwierig. Kirkland et al. (1993) konnten durch experimentelle Infektion von Kühen am 18. oder 30. Trächtigkeitstag bei 86% bzw. 100% der Tiere die Geburt eines PI-Kalbes erzielen. Die Infektion von Kühen zwischen dem 70. und 75. Trächtigkeitstag führte ebenfalls zu ausschließlich persistent infizierten Kälbern (Brock und Chase, 2000; Cortese et al., 1998). Nach dem 100. Trächtigkeitstag kommt es selten zur Ausbildung einer Immuntoleranz, doch

sind Einzelfälle bis zum 125. Gestationstag beschrieben (Liess et al., 1984; McClurkin et al., 1984). Bei PI-Tieren bleibt eine Immunantwort und somit die Bildung von Antikörpern aufgrund der Immuntoleranz aus. Dies bezieht sich allerdings nur auf den homologen Virusstamm, mit dem das Tier persistent infiziert ist. Gegen heterologe, antigenetisch verschiedene BVD-Viren kann auch das PI-Tier mit einer spezifischen Immunabwehr antworten (Bolin, 1988; Bolin, 1995; Brownlie und Clarke, 1993).

PI-Tiere scheiden das Virus lebenslang mit allen Se- und Exkreten in großen Mengen aus, was solche Tiere zur wichtigsten Quelle für eine Infektion macht. Immuntolerante Kälber werden in der Regel ohne klinische Auffälligkeiten als gesunde Tiere geboren. Vereinzelt kann es zur Geburt von lebensschwachen Tieren kommen. Persistent infizierte Kühe gebären stets immuntolerante Kälber was zu familiären PI-Linien führt, die das Virus dadurch in einem Bestand halten (Baker, 1995; McClurkin et al., 1979).

Eine persistente BVDV-Infektion ist Voraussetzung für die Entstehung der *Mucosal Disease* (MD) (Brownlie, 1991). MD entsteht durch Superinfektion immuntoleranter Tiere mit einem homologen, zytopathogenen (zp) BVD-Virus. Dies kann durch Übertragung von einem anderen an MD erkrankten Tier erfolgen oder durch Mutation im PI-Tier. Bei der akuten MD können Fieber, allgemeine Schwäche, Anorexie und Diarrhoe auftreten. Häufig sind Läsionen an allen Schleimhäuten und dem Flotzmaul zu finden. Erosionen und Entzündungen im Interdigitalspalt und Kronsaum können Lahmheiten verursachen. Nach wenigen Tagen oder Wochen endet die Krankheit für die Tiere tödlich, wobei die Tiere oft euthanasiert werden (Baker, 1995).

Fetale Infektionen im zweiten Drittel der Trächtigkeit (vorwiegend zwischen Tag 100 und 150) können zu kongenitalen Missbildungen führen. In diesem Stadium fallen die Endphase der fetalen Organogenese und der Immunsystementwicklung zusammen, was einen Zusammenhang zu den Entwicklungsstörungen vermuten lässt. Störungen des zentralen Nervensystems wie Hydrocephalus und zerebellarer Hypoplasie, wurden am häufigsten beobachtet. Des Weiteren wurden Katarakt, Retinadegeneration, Skelettdeformationen, Thymushypoplasie und Wachstumsstörungen beobachtet (Baker, 1995; Bielefeldt-Ohmann, 1995; Grooms, 2004). In den meisten Fällen sind die betroffenen Tiere nicht lebensfähig und müssen euthanasiert werden.

Das fetale Immunsystem ist nach dem 125. Trächtigkeitstag so weit ausgebildet, dass es auf eine BVDV-Infektion mit einer spezifischen Abwehrreaktion reagieren kann. Das Virus wird

eliminiert und das Kalb wird mit präkolostralen neutralisierenden Antikörpern geboren (Grooms, 2004).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Kälber für Laborversuch und aus der Feldstudie**

##### **3.1.1 Infektionsversuch**

Zur Untersuchung der transienten BVDV-Infektion wurde ein Tierversuch durchgeführt. Dieser wurde, wie nach dem Tierschutzgesetz vorgeschrieben, bei der Regierung von Oberbayern angezeigt (AZ 55.2-1-54-2531.3-38-07).

##### **BVDV-freie Kälber**

Es wurden sechs Bullenkälber der Rasse „Holstein Friesian“ im Alter von zwei Wochen bis zwei Monaten gekauft. Der Herkunftsbetrieb ist Teilnehmer am „Freiwilligen bayerischen BVD-Bekämpfungsverfahren“ und war seit einem Jahr vor Versuchsbeginn BVDV-negativ (Jungtierfenster-Untersuchung/Einzeltier-Untersuchung). Vor Ankauf wurden die Kälber und deren Muttertiere auf BVDV-RNA, -Antigen und -Antikörperfreiheit getestet. Vor der Infektion (=Tag 0) wurden die Tiere im Abstand von wenigen Tagen nochmals auf BVDV-RNA (Tag -10 und -3), BVDV-NS3 (Tag -10, -7 und -3) und Antikörperfreiheit (Tag -10) getestet. In allen Untersuchungen waren die Ergebnisse negativ. Die Haltung der Kälber erfolgte in den Ställen des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München auf dem Oberwiesenfeld. Es wurden jeweils drei Tiere zusammen in einer Box untergebracht.

##### **Infektion**

Die Infektion erfolgte mit dem BVDV1-Isolat CR4043. Dazu wurde einem institutseigenen PI-Rind wenige Stunden vor Versuchsbeginn EDTA-stabilisiertes Blut und Serum entnommen. Aus dem EDTA-Blut wurden mittels Ammoniumchloridlyse die Leukozyten isoliert. 48 Millionen Zellen wurden in 5 ml Serum resuspendiert und mit 19 ml PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  verdünnt. Das Material wurde bis zur Applikation auf Eis gelagert. Allen Tieren wurde in jede Nasenöffnung 1ml des virushaltigen Materials mittels Pistolenspritze mit Vernebelungsaufsatz (Hauptner) gesprüht. Nach der Applikation wurde aus der Pistolenspritze das Infektionsmaterial entnommen und auf KOP-R Zellen rücktitriert. Es konnte eine Infektiosität von  $10^{5,33}$  KID<sub>50</sub>/ml bestimmt werden. Bei den Tieren wurde im Anschluss an die Infektion täglich rektal die Temperatur gemessen, die Tränke- und Futteraufnahme protokolliert sowie das Allgemeinbefinden beobachtet.

**Probenentnahme**

Der Beprobungszeitraum erstreckte sich über insgesamt sieben Wochen.

**Tab. 1:** Übersicht der Probennahme (Tage p. inf.)

<b>Probennahme</b>	<b>täglich</b>	<b>alle 3 bis 4 Tage</b>	<b>wöchentlich</b>
<b>EDTA-Blut</b>	0-14	15-28	29-49
<b>Serum</b>		0-21	22-49
<b>Hautbiopsie</b>		0-21	22-49
<b>Nasen-/Speichelsekret</b>	0-14		

### 3.1.2 Studientiere aus dem Feld

22 Kälber aus dem bayerischen Pilotprojekte „Studie zur Eignung der Ohrstanzmethode bei neugeborenen Kälbern zur Bekämpfung der BVD/MD“, welche anhand der Ergebnisse aus Ohrgewebe- und Blutuntersuchungen als transient infiziert definiert wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet. Aufgabe und Ziel des Forschungsprojektes war die Tauglichkeit der Ohrgewebediagnostik unter Feldbedingungen zu prüfen. Die Ohrgewebsergebnisse wurden durch Blutuntersuchungen überprüft. Anhand der Blutuntersuchung wurde der Infektionsstatus der Probanden definiert. PI = persistent infiziert; NPI = nicht persistent infiziert; TRI = transient infiziert. Zur Blutuntersuchung wurden prinzipiell drei verschiedene Testsysteme verwendet. Nachweis des BVDV-Nichtstrukturproteins 3, Nachweis der BVDV-5'UTR Ribonukleinsäure mit *real time* RT-PCR und Nachweis des BVDV-Antigens E<sup>ms</sup> mit ELISA. Die Statusvergabe für die Studientiere erfolgte ausschließlich nach den Ergebnissen der Blutuntersuchungen. Der Status PI-Tier wurde vergeben, wenn zwei Blutproben im Abstand von mindestens drei Wochen positiv waren und bei der letzten Blutprobe BVDV-Antigen nachweisbar war. Der Status NPI-Tier wurde vergeben, wenn eine Blutuntersuchung des Tieres im Alter von über 90 Tagen mittels NS3-Test und PCR negativ ausfiel. Im Sinne der Studie wurden Tiere als „transient infiziert“ bezeichnet, welche bei der Ohrgewebeuntersuchung ein positives Ergebnis hatten und bei denen im Alter von unter zwei Monaten eine BVDV-positive Blutprobe vorlag, aber in Folgeproben BVDV-Antigen nicht nachweisbar war. Weitere Blutproben wurden solange genommen, bis in der Einzel-PCR ein negatives Ergebnis erbracht wurde. Darüber hinaus wurden Kälber beobachtet, bei denen im Ohrgewebe BVDV gefunden wurde, in deren Blut jedoch kein Virus nachzuweisen war.

Für die Studie wurden Betriebe ausgewählt, bei denen schon mindestens ein PI-Tier festgestellt worden war, ein positives „Jungtierfenster“ (im Rahmen des freiwilligen bayerischen BVD-Bekämpfungsprogrammes) diagnostiziert wurde oder bei denen Erkrankungen mit positiven BVDV-Antigen- oder Antikörpernachweisen festgestellt wurden (Aborte, akute BVD- oder MD-Symptomatik).

Ein Tier (Kalb „Martin“) aus der Studie mit dem Status „persistent infiziert“ fiel durch ungewöhnliche Befunde auf (siehe 4.2.1). Zur weiteren Untersuchung wurde dieses Bullenkalb („Fleckvieh“x„Weiß-blauer Belgier“) im Alter von vier Monaten gekauft und in den Stallungen des Instituts für Mikrobiologie gehalten. Dem Tier wurden nach Kauf in regelmäßigen Abständen Hautbiopate, Vollblut- und Serumproben sowie Nasen- und Speichelsekrete entnommen und mittels Virusisolierung, *real time* RT-PCR, NS3- und E<sup>ms</sup>-

Nachweis und Antikörper-ELISA untersucht. Im Alter von ca. zehn Monaten wurde der Bulle kastriert und das Hodengewebe mit den oben beschriebenen Methoden getestet.

## 3.2 Gewinnung und Bearbeitung des Probenmaterials

### 3.2.1 EDTA-Blut

Den Rindern wurde mit EDTA-Monovetten (Sarstedt) Blut aus der *V. jugularis* entnommen. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte mit Hilfe des Cell DYN 3500 Analysegerätes (Abbott Laboratories), freundlicherweise von der I. Medizinischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät zu Verfügung gestellt. Aus dem EDTA-Blut wurden sowohl Leukozyten isoliert als auch Plasma abzentrifugiert.

#### Leukozytenpellets

Die Leukozytenisolierung erfolgte durch Ammoniumchloridlyse. Es wurden Pellets mit jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen hergestellt. Die dafür nötige Menge an Blut wurde anhand der Gesamtleukozytenzahl errechnet und in 5ml 4°C kalten Lysepuffer (8,29g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,0g/l  $\text{KHCO}_3$  und 1mM EDTA in A. demin) gegeben. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1700rpm und 5min (Megafuge 1.0, Heraeus), anschließend wurde der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 5ml Lysepuffer resuspendiert, nochmals zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Leukozyten wurden mit 5ml PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen und bei 1700rpm 3min zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Zellen in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  resuspendiert, in 2ml Schraubröhrchen (Sarstedt) überführt und bei 8000rpm für 2min (Centrifuge 5415D, Eppendorf) pelletiert. Die Lagerung erfolgte bis zur Testung bei -80°C.

#### Blutplasma

2 ml EDTA-Blut wurden in einem Reaktionsgefäß bei 13200rpm für 2,5 min zentrifugiert (Centrifuge 5415D, Eppendorf). Das überstehende Plasma wurde in Aliquots zu je 200µl in 2ml Schraubröhrchen (Sarstedt) überführt und bis zur Testung bei -80°C gelagert.

### 3.2.2 Serum

Aus der *V. jugularis* wurde den Tieren Blut mittels Serum-Monovetten (Sarstedt) entnommen. Die Gerinnung und Retraktion des Koagulums erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Blute 10min bei 3000rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf) zentrifugiert und je 500µl Serum in 2ml Schraubenröhrchen (Sarstedt) aliquotiert, welche bei -80°C gelagert wurden.

### 3.2.3 Hautgewebe

Die Entnahme der Hautbiopsie erfolgte seitlich am Hals. Dazu wurden die entsprechenden Stellen rasiert, gereinigt und desinfiziert. Anschließend wurde ca. 1ml Lokalanästhetikum (Hostacain) subkutan injiziert. Nach einer kurzen Wartezeit wurde nochmals alkoholisches Desinfektionsspray auf die Haut gesprüht und im Anschluss die Probe mit einer sterilen Biopsie Stanze (Biopsie Punch; KRUUSE) entnommen und zum Transport in ein Polypropylenröhrchen verbracht. Zum Verschließen der Wunde wurde mit einem *LeukoClip\** *SD* (Smith & Nephew Medical Ltd.) eine Klammer gesetzt, welche nach drei bis vier Tagen wieder entfernt werden konnte. Die Hautstücke wurden mit einem Skalpell in vier gleich große Teile zerlegt und in 2 ml Schraubenröhrchen (Sarstedt) überführt, welche mit ca. 20 aktivierten (1h bei 250°C) Molekularsiebperlen befüllt waren. Die Proben wurden für einen Tag bei Raumtemperatur und danach bis zur Testung bei 4°C gelagert (Mindestlagerzeit 3 Tage).

### 3.2.4 Nasen- und Speichelsekret

Etwa 100µl Nasen- bzw. Speichelsekret wurden mit sterilen Wattetupfern aus dem Nasenraum oder der Maulhöhle der Tiere gewonnen. Die Tupfer wurden in 900µl Transportmedium eisgekühlt transportiert und anschließend im Puffer gevortext und ausgerollt. Das Sekret-Puffer-Gemisch stellt somit etwa eine 1:10 Verdünnung dar. Aliquots zu je 250µl wurden in 2ml Schraubenröhrchen (Sarstedt) bis zur Testung bei -80°C gelagert.

### 3.3 Methoden zum Virusnachweis

#### 3.3.1 Virusisolierung

##### **Zellkultur**

Zur Virusanzucht wurden Zellen der Linie KOP-R (Friedrich Löffler Institut) verwendet. Für alle Versuche wurde dieselbe Ausgangspassage verwendet, welche mittels NS3-Nachweis auf BVDV-Freiheit untersucht wurde. Die Zellen wurden in *Minimum Essential Medium* (MEM, mit Zusatz von nicht-essentiellen Aminosäuren, NaHCO<sub>3</sub> (8,8 %ig), Penicillin (300000E/l), Streptomycin (200mg/l) kultiviert. Zur Supplementierung wurde Serum eines BVD-Virus- und BVDV-Antikörper-negativen Bullen (Besamungsstation Grub) verwendet. Die Haltung erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37°C im Brutschrank. Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen und mit Hilfe von Saline-Trysin-Versen- (STV) Lösung abgelöst und danach in frischem Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde zurück in Kulturflaschen gegeben, der Rest der Zellen wurde je nach Bedarf auf 24-Loch Platten ausgesät. Anschließend wurden die Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Primäre Virusisolierungen und Passagen wurden für vier bis sechs Tage inkubiert.

##### **Animpfen der Proben auf die Zellkultur**

Die Probenmaterialien wurden auf die ca. 50-100% konfluenten Zellen gegeben. Zusätzlich wurden bei der Animpfung der Sekrete in jedes Loch 30µl Amphotericin B Gebrauchslösung gegeben. Die Inkubation nach der Animpfung betrug zwischen vier und sechs Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Virusnachweis erfolgte durch NS3-Immunfluoreszenz im Durchflusszytometer. Von den aufgetauten und resuspendierten Leukozytenpellets wurden mit MEM log<sub>10</sub> Verdünnungsreihen (10<sup>6</sup> bis 10<sup>4</sup> Zellen/100µl Medium) hergestellt, ebenso von den im Transportpuffer vorverdünnten Sekreten (unverdünnt bis 10<sup>-2</sup>). Die Proben wurden jeweils im Doppelansatz getestet. Die Infektiosität der Leukozyten wurde in Zellen/KID<sub>50</sub> angegeben, die der Sekrete in KID<sub>50</sub>/ml.

### 3.3.2 *Real time* RT-PCR

Der Nachweis der BVDV-Ribonukleinsäure in Leukozyten, Plasma, Hautbiopsien, Nasen- und Speichelsekreten erfolgte durch *real time* RT-PCR. Als Target diente dabei eine bei allen Pestiviren hochkonservierte Sequenz der 5'UTR. Um Kontaminationen zu vermeiden wurde ein *one-step*-RT-PCR-Protokoll verwendet (QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit, Qiagen), zudem wurden die Arbeitsschritte der RNA-Freisetzung, der RNA-Isolierung, der Herstellung des Mastermix und das Ansetzen der PCR-Reaktion räumlich und arbeitstechnisch getrennt durchgeführt. Die *real time* PCR wurde mit einem Mx3005P™ QPCR System (Stratagene) durchgeführt.

#### **Isolierung der BVDV-RNA**

Zur Isolierung der viralen RNA aus Leukozyten ( $5 \times 10^6$  Zellen), Plasma (200µl), Nasen- und Speichelsekreten (je 200µl Transportpuffer-Gemisch) wurde das High Pure Viral RNA Kit (Roche) verwendet. Die Gewinnung der BVDV-RNA aus dem Hautgewebe erfolgte nach Fux (2007). Die Hautproben wurden mit 300µl RLT Puffer und einer Stahlkugel in ein 2ml Reaktionsgefäß gegeben und in einer Laborschwingmühle (Retsch) für 2,5min bei 25 Hz mechanisch aufgearbeitet, das entstandene Homogenat enzymatisch mit Proteinase K verdaut und daraus anschließend die RNA mittels RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Durchführung der Isolierungs-Kits erfolgte jeweils entsprechend den Gebrauchsanweisungen des Herstellers.

#### **Durchführung der *real time* RT-PCR**

Es wurde ein TaqMan Assay (Panpesti-System 1.1) nach Hoffmann (2006) durchgeführt. Primer und Sonde wurden von der Firma Operon Biotechnologies (Köln) bezogen, deren Sequenzen sind Tabelle 2 zu entnehmen. Als Basis der *real time* RT-PCR diente das QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit (Qiagen). Jeder Reaktionsansatz (25µl) setzte sich aus 12,5µl RT-PCR Master Mix, 5,25µl RNase-free water, 0,25µl RT Mix, 2µl Primer-Sonden Mix und 5µl RNA-Template zusammen. Jeweils 20µl Mastermix wurden in ein *Optical Tube* (Stratagene) vorgelegt. Im Anschluss wurden je Probe 5µl Eluat in die Tubes pipettiert, diese mit *Optical Caps* (Stratagene) verschlossen und in das *real time* Gerät eingesetzt. Folgendes Temperaturprofil wurde durchgeführt: Reverse Transkription (30min bei 50°C), Aktivierung der Polymerase (15min bei 95°C) und anschließend 42 Zyklen mit Denaturierung (30sec bei 95°C), Annealing (1min bei 57°C) und Extension (1min bei 68°C). Die Messung der Reporter-Fluoreszenz erfolgte in der Annealingphase.

**Tab. 2:** Sequenzen der Primer und Sonde des Panpesti-Systems 1.1 (Hoffmann, 2006)

	Name	Sequenz
<b>Forward Primer</b>	BVD190-F	5'-GRA GTC GTC ART GGT TCG AC-3'
<b>Reverse Primer</b>	V326	5'-TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC-3'
<b>Sonde</b>	TQ-Pesti	Fam-TGC YAY GTG GAC GAG GGC ATG C-BHQ1

### Auswertung

Die Auswertung der *real time* PCR erfolgte mittels Mx Pro™ QPCR Software (Stratagene). Der *Threshold* wurde manuell festgelegt. Zur absoluten Quantifizierung der nachgewiesenen BVDV-RNA wurde als Standard eine *in vitro* transkribierte RNA (Friedrich Löffler Institut) verwendet. Anhand einer log<sub>10</sub> Verdünnungsreihe (10<sup>7</sup> bis 10<sup>3</sup> copies/well) wurde bei jedem PCR-Lauf eine Standardkurve ermittelt und die BVDV-RNA-Menge in den Proben errechnet. Beim Studientier **M** und bei den übrigen Proben aus der bayerischen Feldstudie erfolgte der Vergleich der Proben auf Basis des *Threshold Cycle* (Ct-Wert). Verglichen mit den Gewebeuntersuchungen des Infektionsversuches und den Geweben von Tier **M** (Ausnahme Ohrstanze Tag 3, siehe 4.2.1), wurden in der Feldstudie geringere Probenaliquots in der PCR getestet. Die Sensitivität ist daher rechnerisch 7fach geringer.

### 3.3.3 BVDV-NS3-Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz

Die Darstellung des Nichtstrukturproteins 3 erfolgte zum Virusnachweis in isolierten Blutleukozyten und in der Zellkultur. Die Leukozyten wurden aus frischem EDTA-Blut mittels Ammoniumchloridlyse isoliert und sofort getestet. Zellen aus der Virusanzucht wurden nach Waschung mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  mittels Saline-Trypsin-Versen (STV)-Lösung abgelöst, mittels mehrmaligem Pipettieren vereinzelt und in 96-Loch-Rundbodenplatten überführt. Sowohl Leukozyten als auch Kulturzellen wurden mit 100 $\mu\text{l}$  1%iger Paraformaldehydlösung für 10min auf Eis fixiert. Anschließend wurde 100 $\mu\text{l}$  PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  dazugegeben und die Platte für 2min bei 2000rpm (SIGMA Laborzentrifuge 3-16) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und zur Permeabilisierung der Zellmembran 100 $\mu\text{l}$  Digitonin auf die Zellen gegeben und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 $\mu\text{l}$  PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  und Zentrifugation folgte ein Waschschriff durch Zugabe von 200 $\mu\text{l}$  PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  und Zentrifugation. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 50 $\mu\text{l}$  der monoklonalen Antikörper WB103/105. Diese beiden Antikörper binden panpesti-spezifisch an das zytoplasmatische Nichtstrukturprotein 3. Die Inkubationszeit betrug 45min. Nach zweimaliger Waschung wurden 50 $\mu\text{l}$  des sekundären Antikörpers (ALEXA 488-markiertes Ziege-anti-Maus-Konjugat) zugegeben und für 30min inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Abschließend wurde auf die Zellpellets 50 $\mu\text{l}$  Propidiumjodid gegeben. Die Messung der Fluoreszenzsignale der markierten Zellen erfolgte im Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Cell Quest Pro (Becton Dickinson). Waren mehr als 1% der Leukozyten bzw. mehr als 3% der Zellen aus der Virusanzucht spezifisch gefärbt, wurde die Probe als BVDV-positiv gewertet.

### 3.3.4 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

#### **BVDV-E<sup>rns</sup>-spezifischer Antigen-ELISA**

Das BVDV-E<sup>rns</sup> im Plasma sowie im Hautgewebe der Tiere wurde mit dem ELISA HERDCHEK BVDV Ag/Serum Plus (IDEXX Laboratories) nachgewiesen. Hautgewebe wurde über Nacht bei 4°C in 150µl *1x Puffer für Ohrgewebe-Stanzproben* (IDEXX Laboratories) auf einem Intervall-Rüttler inkubiert. Das Plasma und die Hautlysate wurden in einer log<sub>4</sub>-Verdünnungsreihe (bis 1:256) getestet. Die Durchführung des ELISAs sowie die Messung der Optischen Dichte (OD-Wert) erfolgte nach Herstelleranweisung an einem Pipettierautomaten (Behring). Eine Korrektur der OD-Werte wurde wie vom Hersteller vorgeschrieben vorgenommen.

#### **BVDV-NS3-spezifischer Antikörper-ELISA**

BVDV-NS3-spezifische Antikörper in Serum und Hautgewebe wurden mit dem kompetitiven ELISA Testkit Ceditest® BVDV (Cedi-Diagnostics) nachgewiesen. Zur Antikörper-Freisetzung wurden die eingetrockneten Hautproben in 1%igem Triton X100 über Nacht inkubiert. Log<sub>4</sub>-Verdünnungsreihen von Seren und Hautlysaten wurden getestet. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Herstelleranweisung. Die OD-Werte wurden mit einem *Sunrise Touchscreen* (Tecan) Photometer und der *Magellan* (Tecan) Software gemessen.

#### **Auswertung der ELISAs**

Zur Auswertung der Ergebnisse erfolgte die Berechnung des jeweiligen Titers einer Probe. Dazu wurden für jede Probe die gemessenen OD-Werte gegen die Verdünnung aufgetragen, woraus sich die jeweilige Titrationskurve ergab. Die Verdünnung am Schnittpunkt dieser Kurve mit dem vom Hersteller festgelegten *cut off* (positive Freigabegrenze) wurde als Antigen- bzw. Antikörper-Titer definiert. Ein Titer von 0 wurde vergeben, wenn keine relevante Testreaktion hinsichtlich OD-Wert und Kurvenverlauf zu erkennen war.

### 3.3.5 Serumneutralisationstest

Als Probenmaterial diente Serum des Studientieres **M**, welches im Dreifachansatz untersucht wurde. Es wurden Vorverdünnungen von 1:100 und 1:1000 hergestellt. Die Durchführung erfolgte in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit einem BVDV-1- (CR 4043: Isolat, welches für den Infektionsversuch verwendet wurde) und einem BVDV-2-Isolat (MS071113: Virus, welches aus den Hodenzellen des Studientieres **M** isoliert wurde). Die Seren wurden in log<sub>2</sub> Schritten auf der Platte in Zellkulturmedium verdünnt (Endvolumen 50µl/Loch). Anschließend wurden die Gebrauchslösungen beider Virusstämme (100 KID<sub>50</sub>/50µl) hergestellt und zu den verdünnten Seren pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 100µl Zellsuspension (KOP-R) in jedes Loch gegeben. Für jedes Virus wurde eine Kontrollplatte mit standardisiertem Positiv- und Negativ-Serum, sowie einer Rücktitration der Virus-Gebrauchslösungen in log<sub>4</sub> Schritten mit je sechs Ansätzen mitgeführt. Die Platten wurden für fünf Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und im Anschluss daran durch NS3-Immunfluoreszenzfärbung mit Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die Berechnung der Antikörpertiter erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Behrens und Kaerber (Mayr et al. 1977).

## **4. Ergebnisse**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Diagnostik der transienten BVDV-Infektion anhand eines Infektionsversuches und mittels Daten aus der bayerischen Feldstudie zur Ohrgewebsdiagnostik untersucht. Des Weiteren wurde ein Studientier (**M**) näher charakterisiert, welches als persistent BVDV-infiziertes Tier definiert wurde, zugleich aber eine Serokonversion zeigte.

### **4.1 Ergebnisse des Infektionsversuches**

#### **4.1.1 Temperaturverlauf und klinische Erkrankung**

In der Zeit vor der experimentellen Infektion war das Allgemeinbefinden aller sechs Kälber ungestört. Kalb **A** hatte von Tag -2 bis Tag 1 p. inf. geringgradigen Durchfall. Kalb **E** zeigte seit Aufstallung am Oberwiesenfeld (10 Tage vor Versuchsbeginn) bis etwa Tag 12 p. inf. intermittierend geringgradigen Durchfall. Des Weiteren wurde bei Kalb **E** seit Aufstallung ein deutliches Husten beobachtet. Da während der Eingewöhnungszeit keine Verschlechterung oder Änderung seines Zustandes zu beobachten war und das Kalb durchgehend ungestört im Allgemeinbefinden war, wurde **E** zum Infektionsversuch zugelassen.

Zwischen Tag 8 und 10 p. inf. erkrankten vier Kälber (**A**, **B**, **C** und **F**) leicht. Sie zeigten eine erhöhte Körpertemperatur (maximale Werte zwischen 40,1 und 41,1°C) und ein reduziertes Allgemeinbefinden mit Apathie und Mattigkeit (Abbildung 1). Bei Kalb **C** konnte zugleich ein leichter Nasenausfluss beobachtet werden. Die Tränke- und Futteraufnahme waren ungestört. Eine medikamentöse Behandlung war nicht notwendig. Nach ein bis zwei Tagen erholten sich alle Tiere vollständig. Es konnte bei **A** an den Tagen 9, 10 und 12 p. inf. und bei **F** an den Tagen 8, 12 und 15 p. inf. geringgradiger Durchfall beobachtet werden. Bei einem der sechs Tiere (Kalb **E**) konnte nach der Virusapplikation keine BVDV-Infektion nachgewiesen werden. Es konnte zu keinem Zeitpunkt BVD-Virus mittels real time RT-PCR oder AG-Nachweis gezeigt werden, auch wies das Tier keine Serokonversion auf (siehe 4.1.6).

# Ergebnisse

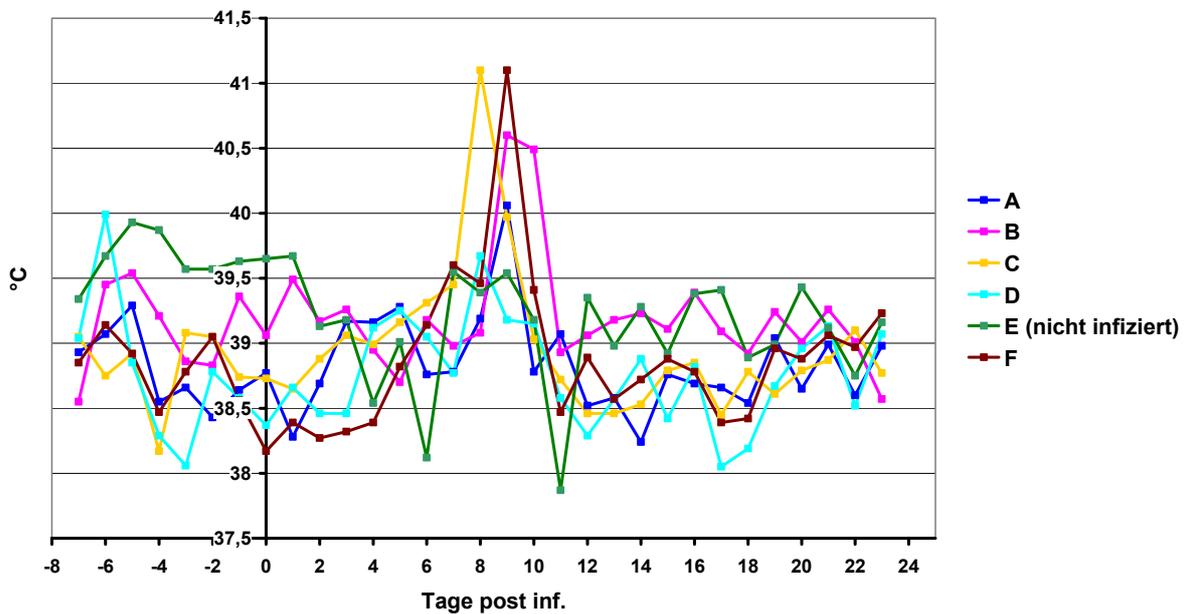


Abb. 1: Verlauf der rektalen Körpertemperatur

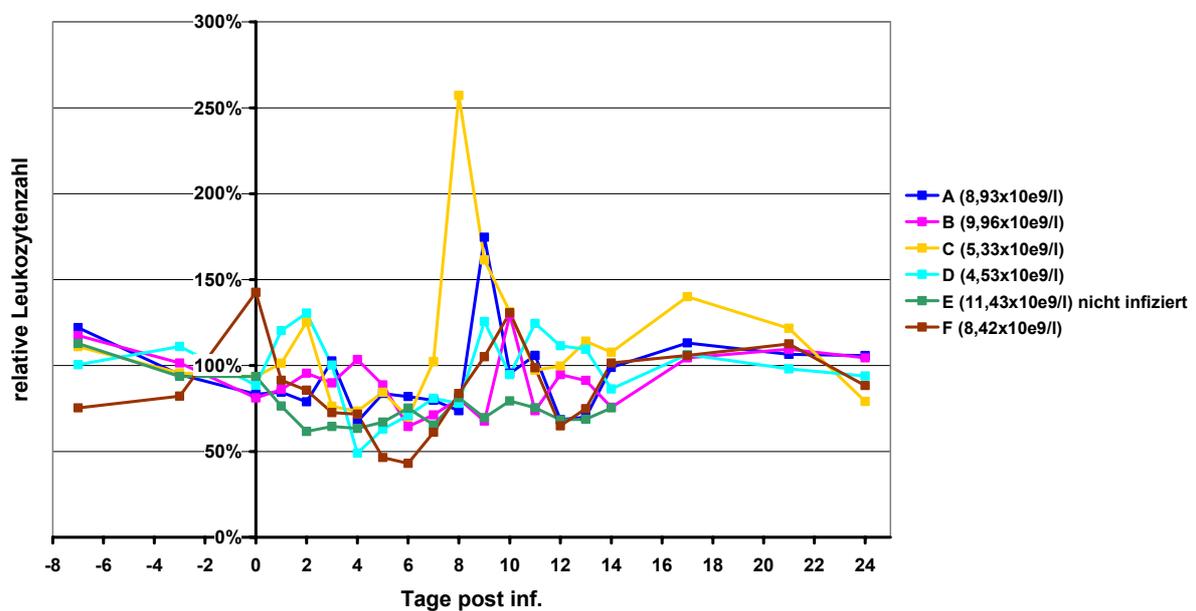


Abb. 2: Relative Leukozytenzahlen vor und während der Infektion (100%= Mittelwert der Einzelwerte von Tag -7, -3 und 0)

#### 4.1.2 Gesamtleukozytenzahl

Um Abweichungen bei den Blutleukozyten darzustellen, zeigt Abbildung 2 die relativierten Gesamtleukozytenzahlen der sechs Versuchstiere. Dazu wurde bei den einzelnen Kälbern der Mittelwert der Leukozytenzahlen der Tage -7, -3 und 0 gebildet (A:  $8,93 \times 10^9/l$ , B:  $9,96 \times 10^9/l$ , C:  $5,33 \times 10^9/l$ , D:  $4,53 \times 10^9/l$ , E:  $11,43 \times 10^9/l$  und F:  $8,42 \times 10^9/l$ ) und als 100% gesetzt. Die Einzelwerte erhielten einen entsprechenden Prozentwert. Kalb **D** und **F** zeigten zwischen Tag 4 und 6 bzw. Tag 5 und 7 p. inf. eine ausgeprägte Leukozytopenie. Bei **D** war ein Abfall auf etwa 50% zu beobachten, bei **F** fielen die Werte um fast 60% ab. Bei Tier **C** konnte ein Leukozytenabfall bis zu 30% zwischen den Tagen 3 bis 6 beobachtet werden. Kalb **B** zeigte am Tag 6 nur 64% der mittleren Leukozytenzahl, doch spricht der Verlauf der Kurve nicht für eine deutliche Leukozytopenie. Bei **A** konnte keine relevante Abnahme der Leukozyten beobachtet werden. Kalb **E** (nicht infiziert) hatte vor Versuchsbeginn hohe Gesamtleukozytenzahlen. Am Kurvenverlauf und den absoluten Werten (Minimum  $7,1 \times 10^9/l$ ) ist zu erkennen, dass keine Leukozytopenie eingetreten ist. Zwischen Tag 8 und 10 p. inf. konnte ein starker Anstieg der weißen Blutzellen bei **A** und **C** beobachtet werden.

#### 4.1.3 Virusisolierung

Es wurden quantitative Virusisolierungen mit Leukozyten sowie mit Sekreten (Nasen-/Speichelsekret) durchgeführt. Die Proben stammten von Tag 1 bis Tag 14 p. inf. und wurden im Doppelansatz auf KOP-R-Zellen getestet. Die Auswertung erfolgte nach indirekter NS3-Immunfluoreszenzfärbung im FACS. Die Infektiosität der Leukozyten wurde in Zellen/KID<sub>50</sub> angegeben, die der Sekrete in KID<sub>50</sub>/ml.

Aus Leukozyten (Tabelle 3) konnte bei den Kälbern **A**, **C**, **D** und **F** zwischen Tag 5 und 8 p. inf. Virus angezüchtet werden. Bei Kalb **B** war die Virusanzucht nur an Tag 7 und 8 p. inf. möglich. Die Kulturinfektiöse Dosis<sub>50</sub> lag dabei zwischen  $10^{3,5}$  und  $10^6$  Zellen.

Bei der Virusisolierung aus den Sekreten waren größere Unterschiede zu beobachten (Tabelle 4). Während bei Kalb **B** weder in Nasen- noch in Speichelsekret BVD-Virus nachgewiesen werden konnte, war der Virusnachweis bei **A** im Nasensekret zwischen Tag 5 und 9 und im Speichel zwischen Tag 7 und 10 positiv. Bei den Kälbern **C**, **D** und **F** konnte im Speichel kein BVDV gefunden werden, wohingegen bei den Nasensekreten zwischen den Tagen 6 und 10 vereinzelt positive Resultate zu beobachten waren. Die maximale Virusmenge lag bei  $10^4$  KID<sub>50</sub>/ml Nasensekret (Tier **A**, Tag 7). Zum Vergleich lag bei einem PI-Tier mit gleichem Virus der Titer in Nasen- und Speichelsekret bei ca.  $10^6$  KID<sub>50</sub>/ml.

## Ergebnisse

**Tab. 3:** BVDV-Isolierung aus Blutleukozyten von Tag 1 bis 14 p. inf.; (Titerangabe  $10^x$  Leukozyten/KID<sub>50</sub>; - : aus  $2 \times 10^6$  Zellen kein Virus isolierbar)

		Tag p. inf.													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>A</b>		-	-	-	-	4,5	5,5	4,5	5,5	-	-	-	-	-	-
<b>B</b>		-	-	-	-	-	-	6	5,5	-	-	-	-	-	-
<b>C</b>		-	-	-	-	3,5	3,5	4,5	5	-	-	-	-	-	-
<b>D</b>		-	-	-	-	3,5	4	3,5	5	-	-	-	-	-	-
<b>F</b>		-	-	-	-	5	5,5	5,5	6	-	-	-	-	-	-

**Tab. 4:** BVDV-Isolierung aus Nasen- (N) und Speichelsekreten (Sp) von Tag 1 bis 14 p. inf. (Titerangabe  $10^x$  KID<sub>50</sub>/ml Sekret; - : aus 20µl Sekret kein Virus isolierbar)

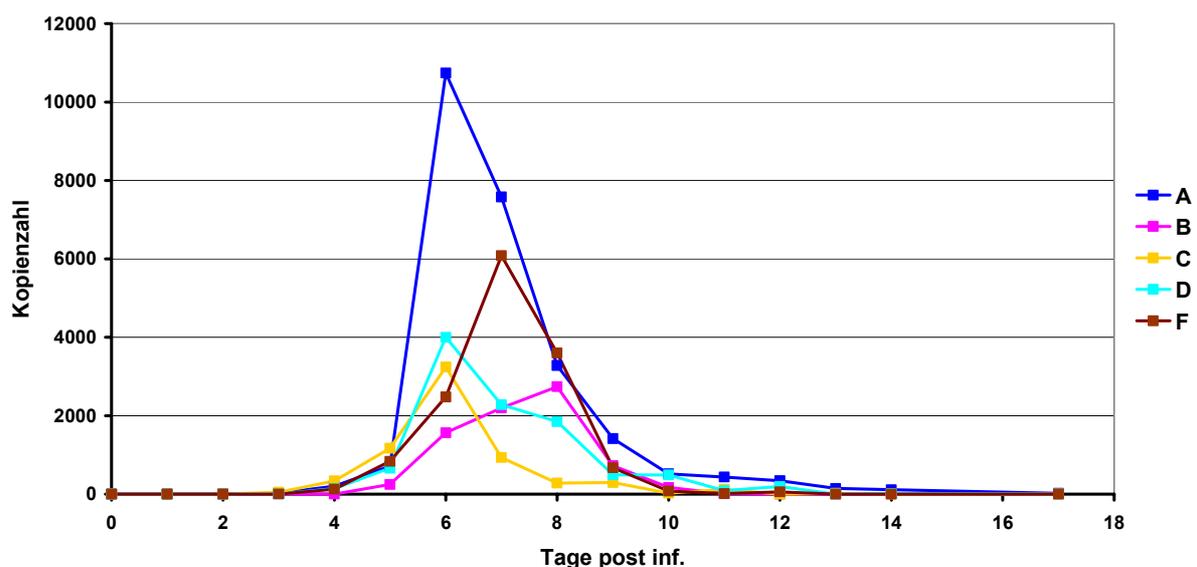
			Tag p. inf.													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>A</b>	N		-	-	-	-	2	3,5	4	2,5	2	-	-	-	-	-
	Sp		-	-	-	-	-	-	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-	-	-
<b>B</b>	N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sp		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C</b>	N		-	-	-	-	-	3,5	-	2,5	-	-	-	-	-	-
	Sp		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D</b>	N		-	-	-	-	-	-	2,5	3	3,5	2,5	-	-	-	-
	Sp		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>F</b>	N		-	-	-	-	-	-	-	2	-	2,5	-	-	-	-
	Sp		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.1.4 Real time RT-PCR

Die *real time* RT-PCR wurde zum Nachweis und zur Quantifizierung der BVDV-5'UTR durchgeführt. Als PCR-Assay wurde das Panpesti-System 1.1 verwendet. Mit einer *in vitro* transkribierten RNA (Verdünnungsreihe  $10^7$  bis  $10^3$  copies/well) wurde bei jedem PCR-Lauf eine Standardkurve ermittelt und die BVDV-RNA-Menge in den Proben errechnet. Untersucht wurden isolierte Blutleukozyten, Plasma, Hautbiopsien, Nasen- und Speichelsekrete.

#### Virusnachweis aus Leukozytenpellets

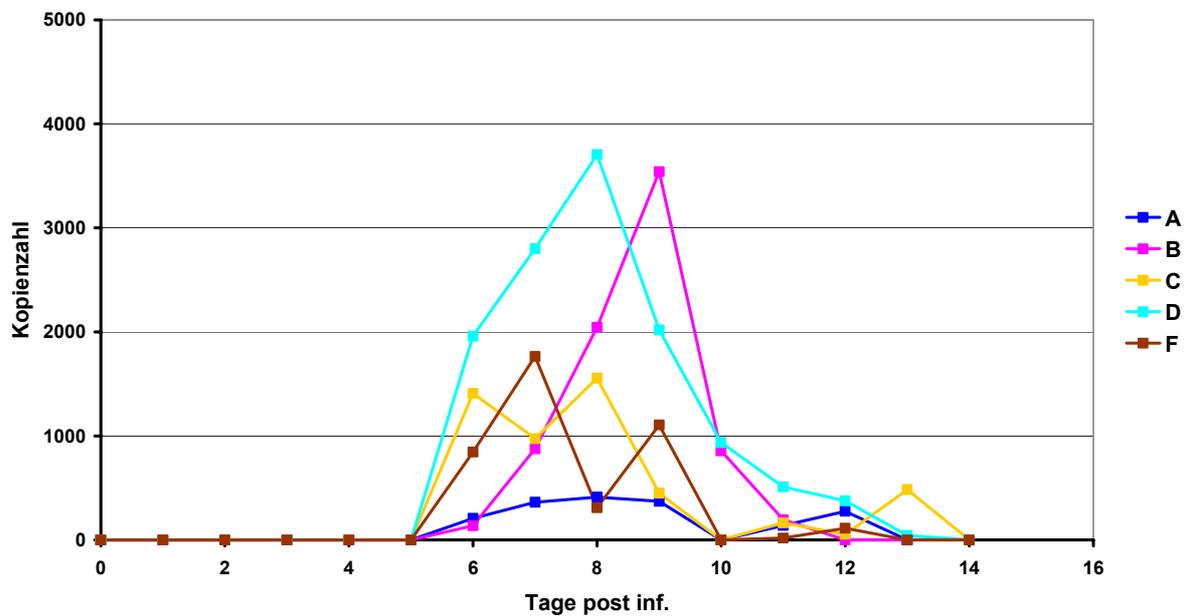
Der Nachweis der BVDV-RNA bei den Versuchskälbern gelang bei **A** über 15 Tage (Tag 3 bis 17 p. inf.), bei **B** nur an sieben Tagen (Tag 5 bis 11 p. inf.). Bei **C** (Tag 3 bis 13 p. inf.) sowie bei **D** (Tag 4 bis 14 p. inf.) konnte über 11 Tage und bei **F** über 9 Tage (Tag 4 bis 12 p. inf.) RNA nachgewiesen werden (Abbildung 3). Bei Tier **E** konnte in keiner Probe BVDV-RNA nachgewiesen werden. Die maximal nachgewiesene RNA-Menge wurde am Tag 6 (**A**, **C** und **D**) bzw. Tag 7 (**F**) oder 8 (**B**) gemessen. Kalb **A** hatte von allen Tieren die meisten Viruskopien in den weißen Blutzellen ( $> 10000$  Kopien/ $10^6$  Zellen, Tag 6 p. inf.). Kalb **B** zeigte die geringste Virus-RNA-Menge (2700 Kopien/ $10^6$  Zellen, Tag 8 p. inf.). Bei den übrigen Tieren lag die Virusmenge zwischen denen von **A** und **B**. Zum Vergleich konnten bei einem PI-Tier mit gleichem Virus  $2 \times 10^6$  Kopien/ $10^6$  Zellen nachgewiesen werden.



**Abb. 3:** BVD-Virusnachweis aus Leukozyten mit *real time* RT-PCR (RNA-Kopien/ $10^6$  Zellen); 0: RNA-Menge im Testaliquot unterhalb der Nachweisgrenze (10 Kopien/well)

**Virusnachweis aus Plasma**

Bei allen fünf Tieren war ab Tag 6 p. inf. Virus-RNA für sechs bis acht Tage nachweisbar. Bei **B** und **D** zeigten die Werte einen kontinuierlichen An- und Abstieg mit dem Höhepunkt am Tag 8 p. inf. bei Tier **D** (3700 Kopien/100µl) und am Tag 9 p. inf. bei **B** (3540 Kopien/100µl). Bei Kalb **A** ließen sich im Gegensatz zu den Leukozytenproben die geringsten Kopienzahlen (Maximalwert 412 Kopien/100µl an Tag 8 p. inf.) nachweisen. Bei **C** und **F** konnte kein gleichmäßiger Verlauf der Virus RNA-Menge beobachtet werden. Zum Vergleich konnten bei einem PI-Tier mit gleichem Virus  $8 \times 10^5$  Kopien/100µl nachgewiesen werden.



**Abb. 4:** BVD-Virusnachweis aus Plasma mit *real time* RT-PCR (RNA-Kopien/100µl Plasma); 0: RNA-Menge im Testaliquot unterhalb der Nachweisgrenze (10 Kopien/well)

### Virusnachweis im Hautgewebe

Im Hautgewebe konnte nur bei Kalb **A** zwischen Tag 2 und 17 p. inf. Virus-RNA nachgewiesen werden (Tabelle 5). Der höchste Wert mit 4160 Kopien konnte am Tag 14 p. inf. nachgewiesen werden. Bei den Kälbern **B**, **C**, **D** und **F** war der Virusnachweis in allen Proben negativ.

**Tab. 5:** BVD-Virusnachweis im Hautgewebe bei Kalb A (RNA-Kopien/Hautstanze)

Tag p. inf.	2	4	7	10	14	17	21
Kopien	150	0	320	120	4160	40	0

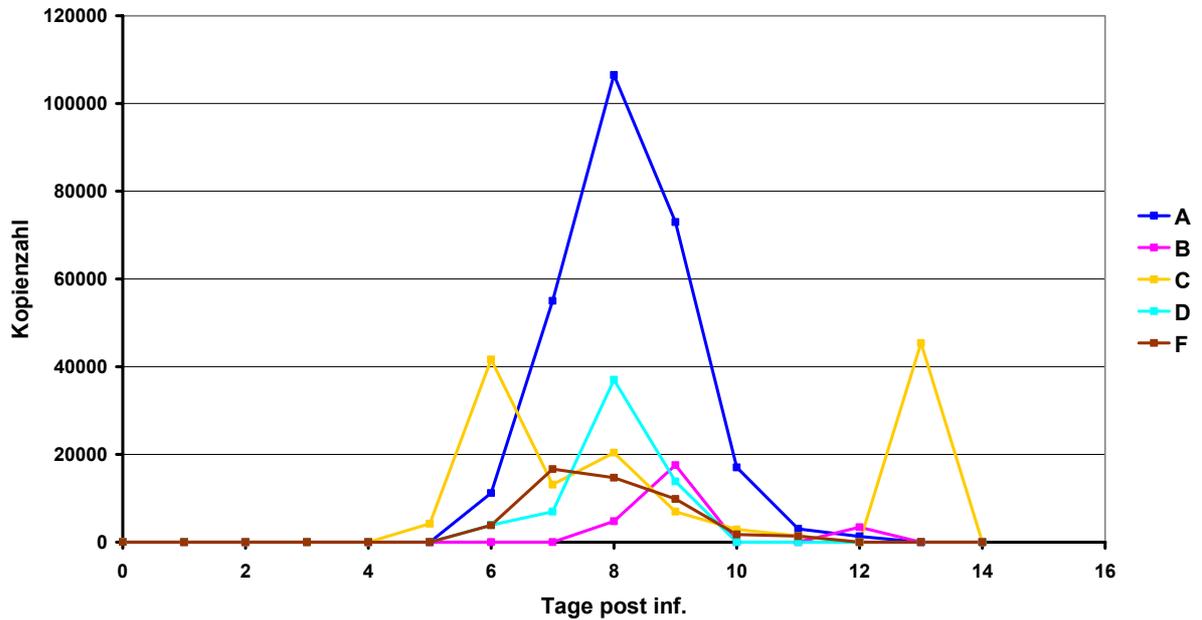
### Virusnachweis aus Nasen- und Speichelsekret

Im Nasensekret konnte Virus-RNA ab Tag 5 p. inf. (**C**), Tag 6 p. inf. (**A**, **D** und **F**) oder Tag 8 p. inf. (**B**) mittels PCR nachgewiesen werden. Die kürzeste Ausscheidung war bei **D** (4 Tage) zu beobachten, die längste bei **A** und **C** (jeweils 7 Tage), wobei **C** an Tag 13 p. inf. nochmals eine hohe Menge RNA zeigte. Bis auf **C** zeigten alle Tiere einen kontinuierlichen An- und Abstieg der Kurven. Die meisten Kopien wurden bei Kalb **A** gefunden (maximal 106500 Kopien/100µl, Tag 8 p. inf.). Bei **B**, **D** und **F** konnten deutlich weniger RNA-Kopien nachgewiesen werden. Die Höchstwerte lagen an Tag 7 (**F**), Tag 8 (**A** und **D**) und Tag 9 p. inf. (**B**).

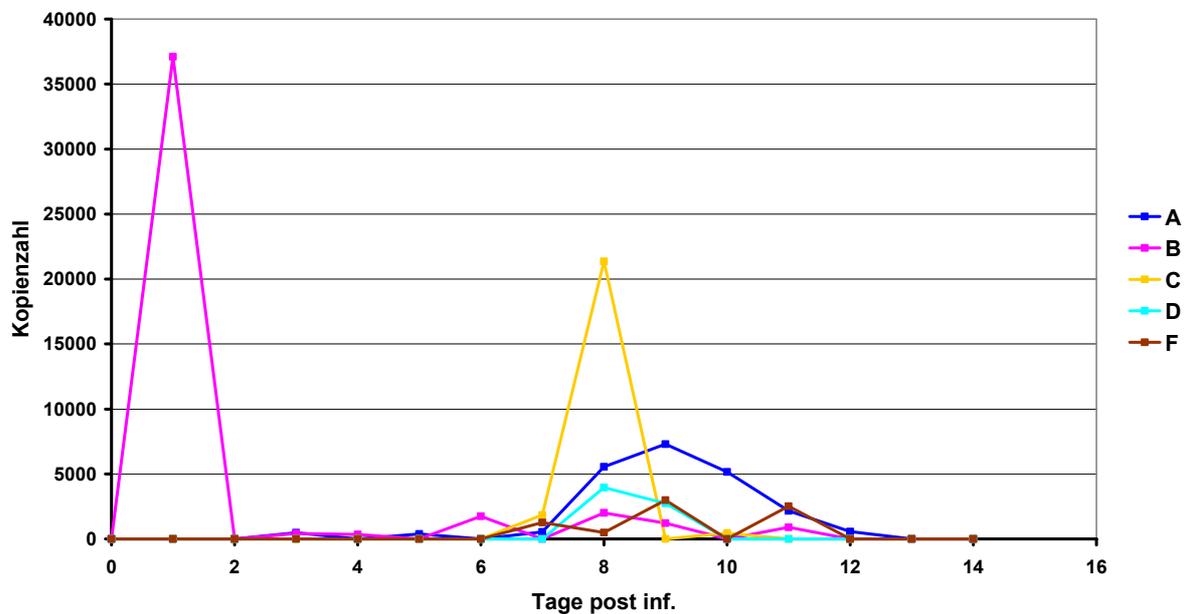
Im Vergleich zu den Nasensekreten konnten im Speichel deutlich geringere RNA-Mengen je Volumeneinheit nachgewiesen werden. Bei **A** war der Nachweis über den längsten Zeitraum möglich (Tag 3 bis 12 p. inf.), wobei an Tag 3 und Tag 5 p. inf. nur sehr geringe Mengen detektiert wurden. Zwischen dem 6. bzw. 7. Tag p. inf. und dem 10. bzw. 11. Tag p. inf. konnte bei **B**, **C** und **F** Virus nachgewiesen werden. Bei **D** war nur an Tag 8 und 9 p. inf. Virus-RNA detektierbar. Des Weiteren wurde bei **B** am 1. Tag p. inf. eine vergleichsweise hohe Virus-RNA-Menge (37000 Kopien/100µl) nachgewiesen, gefolgt von niedrigen RNA-Mengen über den restlichen Detektionszeitraum.

Bei einem PI-Tier mit gleichem Virus konnten zum Vergleich  $5,6 \times 10^6$  RNA-Kopien/100µl im Nasensekret und  $7,4 \times 10^6$  RNA-Kopien/100µl im Speichel nachgewiesen werden.

## Ergebnisse



**Abb. 5:** BVDV-Nachweis aus Nasensekreten mit *real time* RT-PCR (RNA-Kopien/100 $\mu$ l Sekret) 0: RNA-Mengen im Testaliquot unterhalb der Nachweisgrenze (10 Kopien/well)



**Abb. 6:** BVDV-Nachweis aus Speichelsekreten mit *real time* RT-PCR (RNA-Kopien/100 $\mu$ l Sekret) 0: RNA-Menge im Testaliquot unterhalb der Nachweisgrenze (10 Kopien/well)

#### 4.1.5 BVDV-NS3-Nachweis

Isolierte Leukozyten wurden mit Zytofluorometrie auf das BVDV-Antigen NS3 untersucht. Eine spezifische Reaktion war über den gesamten Beprobungszeitraum bei keinem der Versuchskälber nachweisbar.

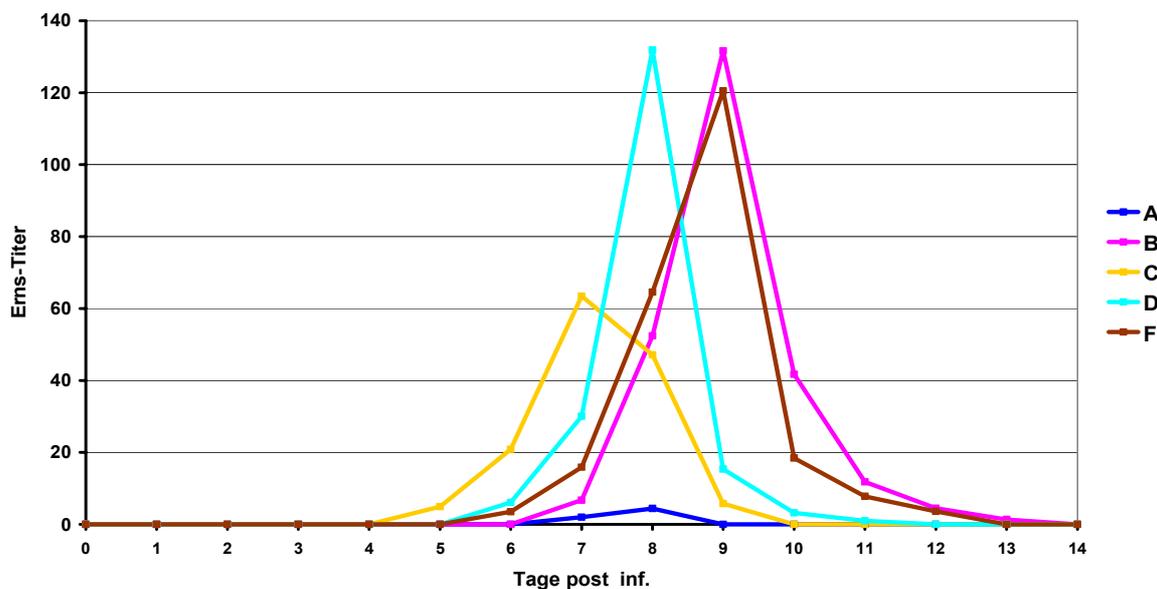
#### 4.1.6 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

##### BVDV-E<sup>rns</sup>-spezifischer Antigen-ELISA

Zum Nachweis des BVDV-spezifischen Hüllproteins E<sup>rns</sup> wurde der ELISA HERDCHEK BVDV Ag/Serum Plus (IDEXX Laboratories) sowohl für Plasma als auch für Hautgewebe eingesetzt. Es wurden log<sub>4</sub>-Verdünnungsreihen getestet, aus welchen der jeweilige Titer berechnet wurde.

Abbildung 7 zeigt die gemessenen AG-Titer im Plasma. Der Nachweis war ab Tag 5 (C), Tag 6 (D und F) bzw. ab Tag 7 p. inf. (B) möglich. Bei A wurden die niedrigsten E<sup>rns</sup>-Mengen (Titer 2 und 4,4, Tag 7/8 p. inf.) detektiert. Dagegen zeigten B, D und F maximale Titer von über 120 (Tag 8 bzw. 9 p. inf.). Bei C lag der Höhepunkt bei Titer 64 (Tag 7 p. inf.). Das E<sup>rns</sup> lies sich mit Ausnahme von A für fünf bis sieben Tage im Plasma nachweisen. Ein PI-Tier mit gleichem Virus zeigte zum Vergleich einen AG-Titer von 353.

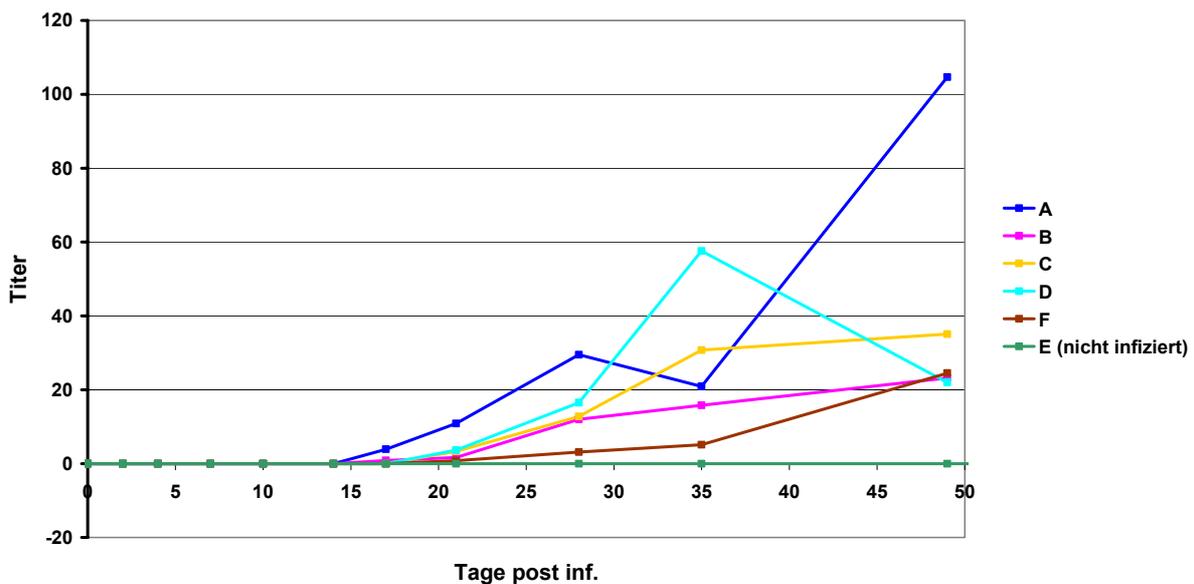
In den lysierten Hautgewebeprobeen konnte das BVDV-E<sup>rns</sup> während des gesamten Beprobungszeitraumes nicht nachgewiesen werden (entnommen an den Tagen 2, 4, 7, 10, 14, 17 und 21 p. inf.).



**Abb. 7:** Nachweis des E<sup>rns</sup> in Plasma (Darstellung der AG-Titer)

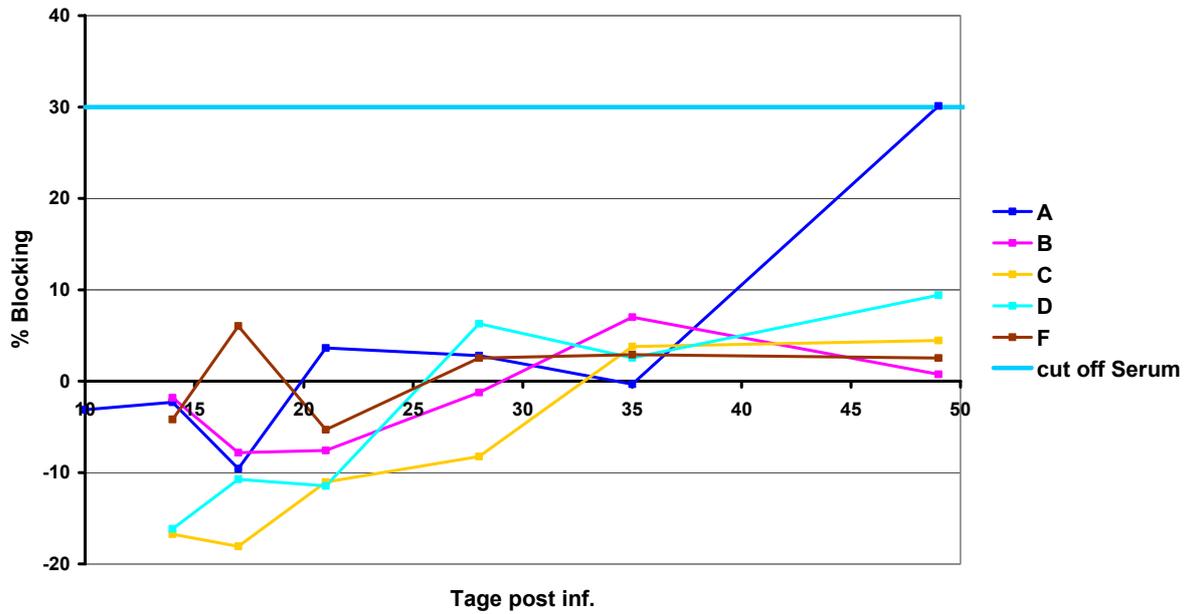
**BVDV-NS3-spezifischer Antikörper-ELISA**

Der Nachweis von BVDV-NS3-spezifischen Antikörpern in Serum wurde mit Hilfe des kompetitiven ELISA Ceditest® BVDV (Cedi Diagnostics B.V.) durchgeführt. Es wurden log<sub>4</sub>-Verdünnungsreihen getestet und die Titer berechnet. In Abbildung 8 sind die gemessenen Antikörper-Titer der Serumproben graphisch dargestellt. 17 Tage nach Infektion konnten bei **A** signifikante Mengen NS3-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Bei den übrigen Kälbern war dies erst ab Tag 21 p. inf. möglich. Maximale Titer am Tag 49 p. inf. lagen in Bereichen zwischen 22 und 35, mit Ausnahme von Kalb **A**, bei dem die Antikörpermenge mehr als 100fach über der Nachweisgrenze lag. Der inhomogene Kurvenverlauf der Titer bei **A** und **D** stellte sich bei der Testung von analogen Plasmaproben genauso dar. Beim nicht infizierten Kalb **E** konnten zu keinem Testzeitpunkt Antikörper nachgewiesen werden (letzte Probennahme im Alter von ca. 9 Monaten).



**Abb. 8:** Nachweis BVDV-NS3-spezifischer Antikörper im Serum (Darstellung der AK-Titer)

Neben den Seren wurden ebenfalls Hautgewebeproben auf NS3-Antikörper untersucht. Abbildung 9 zeigt die gemessenen OD-Werte in den unverdünnten Hautlysaten. Lediglich bei Kalb A konnte am Tag 49 p. inf. eine spezifische Reaktion beobachtet werden.



**Abb. 9:** Nachweis BVDV-NS3-spezifischer Antikörper im Hautgewebe (Darstellung %Blocking)

## 4.2 Ergebnisse der Studientiere aus dem Feld

Neben dem Infektionsversuch wurden in dieser Arbeit auch die Ergebnisse von transient infizierten Tieren aus der bayerischen Feldstudie zur Ohrgewebsdiagnostik ausgewertet. Außerdem erfolgt die Vorstellung von Daten zum Studientier **M**, welches als persistent definiert wurde, gleichzeitig aber Merkmale eines immunkompetenten Tieres zeigt.

### 4.2.1 Studientier M

Kalb **M** wurde zunächst im Rahmen der bayerischen Studie beprobt, im Alter von 122 Tagen wurde das Tier gekauft, um eine weitergehende Untersuchung zu ermöglichen. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Blutproben, Hautgewebebiopsien und Sekrete, auf BVDV Antigen, RNA- oder BVDV-spezifische Antikörper untersucht. Außerdem wurden Blutleukozyten und Sekrete zur Virusisolierung angesetzt. Anzeichen einer Erkrankung konnten während des gesamten Zeitraums nicht beobachtet werden. Ein halbes Jahr nach dem Kauf wurde Tier **M** kastriert und das Hodengewebe ebenfalls auf das BVDV untersucht.

#### ***Real time RT-PCR***

In Tabelle 6 sind die *real time* PCR-Ergebnisse von Blutleukozyten, Plasma und Sekreten dargestellt. Über den Untersuchungszeitraum wurden 22 EDTA-Blutproben entnommen und getestet. Bei der Untersuchung der isolierten Leukozyten (aus 1ml EDTA-Blut) fallen die für ein PI-Tier vergleichsweise hohen Ct-Werte auf. Lagen diese in den ersten 120 Lebenstagen zwischen Ct 30 und 35, konnte im folgenden Zeitraum ein Anstieg beobachtet werden. Ab Tag 304 lag die nachweisbare RNA-Menge regelmäßig unter der Nachweisgrenze des PCR-Systems, wobei negative Ergebnisse stets mittels Wiederholungsuntersuchung bestätigt wurden. Bei der Testung der Plasmaproben (200µl) waren in der Regel niedrigere Ct-Werte zu erreichen als mit den entsprechenden Leukozyten. Bis einschließlich Tag 391 konnte das BVDV im Plasma nachgewiesen werden, obgleich ein tendenzieller Abfall in der RNA-Menge über die Untersuchungszeit zu erkennen war. Am Tag 425 konnte erstmals weder in den Leukozyten noch im Plasma BVDV-RNA nachgewiesen werden.

Nasen- und Speichelproben wurden im Alter von 186, 304 und 391 Tagen als Doppelproben entnommen und getestet. Während in den ersten Proben eine hohe Menge an BVDV-RNA nachgewiesen werden konnte, steigt der Ct-Wert bei den zuletzt genommenen Sekreten deutlich an. Bei zwei Proben lag die RNA-Menge unterhalb der Nachweisgrenze der PCR.

**Tab. 6: Studientier M:** BVDV-RNA-Nachweis in Blutleukozyten (aus 1ml EDTA-Blut), Plasma (200µl), Nasen- und Speichelsekreten (20µl) mittels *real time* RT-PCR (Darstellung der Ct-Werte)

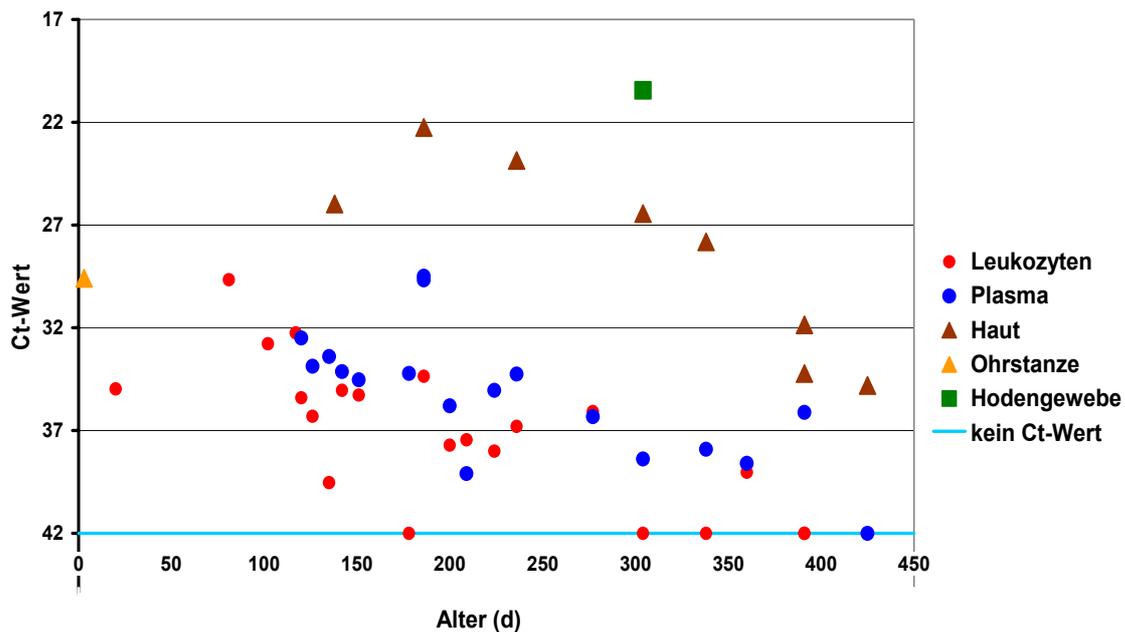
Alter (d)	Leukozyten	Plasma	Nasensekret	Speichelsekret
20	35,0	nd	nd	nd
81	29,7	nd	nd	nd
102	32,8	nd	nd	nd
117	32,3	nd	nd	nd
120	35,4	33,0	nd	nd
126	36,3	33,9	nd	nd
135	39,5	33,4	nd	nd
142	35,1	34,1	nd	nd
151	35,3	34,5	nd	nd
178	>42	34,2	nd	nd
186	34,4	29,7	24,0/23,0	24,1/24,2
200	37,7	35,8	nd	nd
209	37,5	39,1	nd	nd
224	38,0	35,1	nd	nd
236	36,8	34,3	nd	nd
277	36,1	36,3	nd	nd
304	>42	38,4	29,3/31,2	28,0/29,0
338	>42	37,9	nd	nd
360	39,0	38,6	nd	nd
391	>42	36,12	34,4/>42	41,9/>42
425	>42	>42	nd	nd

Vom Landwirt wurden von Kalb **M** an Tag 3 p. n. im Rahmen der Tiermarkierung zwei Ohrgewebeproben entnommen. Es konnte mit *real time* RT-PCR ein Ct-Wert von 29,6 und mittels ELISA ein OD-Wert von 0,69 gemessen werden. Nach Kauf des Tieres wurden im Abstand von ein bis zwei Monaten Hautbiopsien entnommen und ebenfalls auf BVDV-RNA und E<sup>ms</sup> untersucht. In Tabelle 7 sind die gemessenen Ct-Werte und berechneten AG-Titer dargestellt. Mit der PCR konnte am Tag 186 der niedrigste Ct-Wert (22) ermittelt werden. Im Anschluss fällt ein Anstieg der Ct-Werte auf, wobei ab Tag 391 etwa 1000fach weniger Virus-RNA in der Probe enthalten sein dürfte als zu Beginn der Messreihe. Bisher konnte mit der PCR im Hautgewebe stets das BVDV nachgewiesen werden, doch bleibt die weitere Entwicklung abzuwarten. Auch beim E<sup>ms</sup>-Nachweis konnte am Tag 186 das meiste Antigen (Titer 236) detektiert werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es beim E<sup>ms</sup> zu einer Reduktion in der nachweisbaren Menge, bis ab Tag 391 kein E<sup>ms</sup> mehr mittels ELISA nachweisbar ist.

**Tab. 7: Studientier M:** Nachweisbarkeit des BVDV mittels real time RT-PCR und E<sup>ms</sup>-ELISA im Hautgewebe (Darstellung der Ct-Werte und der AG-Titer)

Alter (d)	Ct-Werte	E <sup>ms</sup> -Titer
138	26,0	172
186	22,3	236
236	23,9	134
304	26,4	157
338	27,8	93
391	34,2/31,9	0
425	34,8	0

In Abbildung 10 sind zusammenfassend die Ct-Werte von Leukozyten, Plasma, Haut- und Hodengewebe graphisch dargestellt. Aus der Abbildung geht der parallele Abfall der RNA-Menge sowohl im Blut als auch im Hautgewebe hervor. Im Gewebe lässt sich jedoch nach wie vor wesentlich mehr der Virus-RNA nachweisen. Hodengewebe (ca.  $10^6$  Zellen) wurde unmittelbar nach der Kastration (Tag 304) mit PCR untersucht. Es wurde ein Ct-Wert von 20,5 gemessen.



**Abb. 10: Studientier M:** BVDV-RNA-Nachweis in Blutleukozyten (aus 1ml EDTA-Blut), Plasma (200µl), Haut- und Hodengewebe ( $10^6$  Zellen) mittels *real time* RT-PCR (Darstellung der Ct-Werte); Ohrstanze an Tag 3 p. n. wurde im Rahmen der Feldstudie untersucht (vgl. 3.3.2); Ct 42:= keine BVDV-RNA nachweisbar (kein Ct-Wert)

### **BVDV-NS3-Nachweis**

An den Lebenstagen 20, 81, 102, 117, 120, 126, 151, 178, 200, 224 und 391 wurden Blutleukozyten isoliert und mittels NS3-Immunfluoreszenzfärbung und FACScan auf das BVDV untersucht. Eine spezifische Reaktion war über die gesamte Beprobungszeit bei keiner der Proben nachweisbar.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay**

Zum Nachweis des E<sup>ms</sup>-Antigens wurde Plasma untersucht. Der Nachweis von BVDV-Antikörpern erfolgte aus Serum. Die erzielten AG- und AK-Titer beziehungsweise die PP-Werte (percent positivity values) sind in Tabelle 8 dargestellt. Beim AK-Nachweis konnte mit einem indirekten ELISA am Tag 81 ein fragliches Ergebnis erzielt werden, ab Tag 117 stets positive Resultate mit steigender Tendenz. Proben ab Tag 120 wurden zudem mit Hilfe eines NS3-blocking-ELISAs austitriert. An den Tagen 120 bis 186 wurden gleich bleibend niedrige Antikörpertiter von 5 bis 10 nachgewiesen. Im weiteren zeitlichen Verlauf kam es dann zu einem starken Anstieg des AK-Titer bis zu maximalen Werten von >4096 ab Tag 338.

Beim Nachweis des E<sup>ms</sup> im Plasma konnten in den ersten 190 Lebenstagen hohe Titer ermittelt werden. Der Maximalwert (Titer 495) wurde am Tag 178 gemessen. Ab diesem Zeitpunkt konnte eine starke Reduktion der nachweisbaren Antigenmenge beobachtet werden, bis ab Tag 338 kein E<sup>ms</sup> mehr detektierbar war.

**Tab. 8: Studientier M:** Nachweis von BVDV-E<sup>rns</sup> und -Antikörpern in Plasma und Seren, mittels ELISA (Darstellung der AG-Titer, AK-Titer und PP (percent positivity)-Werte)

Alter (d)	<u>E<sup>rns</sup>-ELISA</u>	<u>NS3-blocking</u> <u>ELISA</u>	<u>Indirekter ELISA</u>
	AG-Titer	AK-Titer	PP-Wert (%)
81	nd	nd	29
102	nd	nd	nd
117	nd	nd	43
120	274	8	44
126	317	8	54
135	379	6	nd
142	383	5	nd
151	419	6	59
178	495	6	74
186	267	10	67
200	137	90	81
209	106	120	nd
224	133	324	81
236	21	422	nd
277	4	1924	68
304	1	2265	62
338	0	>4096	60
360	0	>4096	87
391	0	>4096	90
425	0	>4096	114

### Virusisolierung und Genotypisierung

Um zu überprüfen, ob das Studientier **M** infektiöses Virus ausscheidet, wurden Sekrete mittels Zellkulturen getestet. Des Weiteren wurde versucht aus den Blutleukozyten und aus den Hodenzellen BVD-Virus zu isolieren (Tabelle 9). An den Lebenstagen 207 und 250 konnte das Virus aus dem Speichel gewonnen werden, wobei die Infektiosität bei mindestens  $1\text{KID}_{50}/\mu\text{l}$  Sekret lag. Zu späteren Zeitpunkten (Tag 304 und 391) war das Ergebnis der Virusisolierung aus den Sekreten negativ. Aus den getesteten Leukozyten gelang keine Virusanzucht, wohingegen aus Hodenzellen am Tag 304 BVDV isoliert werden konnte. Dabei entsprachen etwa 20 Hodenzellen einer  $\text{KID}_{50}$ .

Bei den gewonnenen Virusisolaten wurden mit Hilfe genotyp-spezifischer Immunfluoreszenz (monoklonaler Antikörper WB160), sowie einer diskriminierenden *Multiplex*-PCR (*cador* BVDV Type 1/2 RT-PCR, Qiagen) der BVDV-Genotyp bestimmt (Tabelle 7). Alle Isolate konnten eindeutig als BVDV-2-Genotyp identifiziert werden.

**Tab. 9: Studientier M:** BVDV-Isolierung aus Nasen- und Speichelsekreten, Blutleukozyten und Hodenzellen

Alter (d)	Probenmaterial	Ergebnis	Genotyp
207	<b>Speichelsekret</b> (100 $\mu\text{l}$ , ohne Quantifizierung)	positiv	BVDV-2
250	<b>Nasensekret</b> (30 $\mu\text{l}$ ; Doppelansatz)	negativ	-
	<b>Speichelsekret</b> (30 $\mu\text{l}$ uv und 1:10; Doppelansatz)	positiv, $\geq 1\text{KID}_{50}/\mu\text{l}$	BVDV-2
304	<b>Hodenzellen</b> (log10-Titration; 4-fach Ansatz)	positiv, 1 $\text{KID}_{50}$ in ca. 20 HZ	BVDV-2
	<b>Leukozyten</b> ( $10^6$ bis $10^2$ Zellen; 4-fach Ansatz)	negativ	-
	<b>Nasensekret</b> (10 $\mu\text{l}$ ; 4-fach Ansatz)	negativ	-
	<b>Speichelsekret</b> (10 $\mu\text{l}$ ; 4-fach Ansatz)	negativ	-
391	<b>Leukozyten</b> ( $5 \times 10^6$ Zellen; Doppelansatz)	negativ	-
	<b>Nasensekret</b> (10 $\mu\text{l}$ ; Doppelansatz)	negativ	-
	<b>Speichelsekret</b> (10 $\mu\text{l}$ ; Doppelansatz)	negativ	-

### **Nachweis neutralisierender Antikörper**

Um die Serotypisierung der von Tier **M** gebildeten neutralisierenden Antikörper vorzunehmen, wurde ein Serumneutralisationstest (SNT, Serum von Tag 304) durchgeführt. Dafür wurden ein BVD-Virusisolat Genotyp 1 (CR4043: wurde im Infektionsversuch eingesetzt) und ein BVDV Genotyp 2 (MS071113: in **M** persistierendes Virus, welches aus Hodenzellen isoliert wurde) eingesetzt. Für das BVDV-1 konnte ein Titer von 1:3225 ermittelt werden, für das persistierende BVDV-2-Isolat konnte ein Titer von 1:25600 gemessen werden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Antikörperbildung bei **M** aufgrund einer heterologen BVDV-Infektion mit dem Virus aus dem Infektionsversuch induziert wurde. Das Tier bildet spezifische Antikörper gegen das persistierende Virus.

#### 4.2.2 Transiente Infektion junger Kälber aus der Feldstudie

Im Rahmen der bayerischen Feldstudie zur Ohrgewebediagnostik konnten 22 junge Kälber aus 16 Betrieben mit dem Status transient infiziert definiert werden (vgl. 3.1.2). Die Tiere wurden zur leichteren Interpretation der Resultate in drei Gruppen (A, B, und C) eingeteilt und im besonderen Fall einzeln betrachtet. Tiere einer Gruppe D konnten im Rahmen der Feldstudie nicht mittels Blutproben als transient infiziert definiert werden, doch ist eine solche Infektion aufgrund von Daten der Herdeninfektion hochwahrscheinlich.

In der Gruppe A befindliche Tiere (n=14) zeigten alle eine kurzfristige Infektion im jungen Alter mit folgenden Ergebnissen: Stanzung des Ohrgewebes im Rahmen der Tiermarkierung zwischen Tag 0 und 6 p. n. (Mittel Tag 2,7). Bei 12 Tieren erbrachte das Ohrgewebe in der PCR ein positives Resultat mit Ct-Werten zwischen 28,3 und 38,6 (Mittel: 34,9) und im E<sup>ns</sup>-ELISA ein negatives Ergebnis. Ohrstanzen eines Tieres waren sowohl PCR-positiv (Ct 38,6) als auch schwach Antigen-positiv (OD 0,38), bei einem weiteren Kalb konnte keine BVDV-RNA nachgewiesen werden, jedoch der Antigen-ELISA war mit schwach positivem Resultat (OD 0,46). Die erste Blutprobennahme erfolgte zwischen Tag 13 und 30 p. n. Neun Kälber zeigten bei der Untersuchung von Leukozyten Ct-Werte zwischen 34,4 und 38,5 (Mittel: 36,6) wobei mittels Immunfluoreszenz kein NS3-Antigen in den Zellen nachgewiesen werden konnte. Eine Probe war PCR negativ, zeigte aber ein fragliches Ergebnis beim Antigennachweis und eine Probe war sowohl deutlich NS3-positiv (2% bzw. 9% positive Lymphozyten/Myeloische Zellen) als auch PCR-positiv (Ct 32,9). Von zwei Tieren wurden nur Seren eingesandt, beide waren PCR-positiv (Ct 29,3 und 35,1). Folgeblutproben zur Bestätigung oder zum Ausschluss einer persistenten Infektion wurden zwischen dem 35. und 53. Lebenstag genommen (Mittel: Tag 43). In allen Fällen waren die Leukozyten BVDV-RNA und -Antigen negativ. Bei zwölf dieser transient infizierten Tiere konnte vor der Geburt mindestens ein PI-Tier im Betrieb nachgewiesen werden. Bei den verbleibenden zwei transient infizierten Kälbern wurde in den Herkunftsbetrieben im Rahmen des freiwilligen bayerischen BVD-Bekämpfungsverfahrens ein positives „Jungtierfenster“ diagnostiziert. Des Weiteren wurden bei sechs Betrieben im Verlauf der Studienteilnahme weitere PI-Tiere nachgewiesen.

Bei Kälbern der Gruppe B konnte das BVDV, verglichen mit Gruppe A, über einen längeren Zeitraum im Blut nachgewiesen werden (Tabelle 10). Die Tiere B1 bis B4 stammen aus dem gleichen Betrieb, in dem während der Studienlaufzeit auch acht PI-Tiere nachgewiesen werden konnten. Besonders fallen die Tiere B2 und B3 auf. Bei diesen konnte die Virus-RNA kontinuierlich bis zum Tag 62 bzw. 99 p. n. in den Leukozyten nachgewiesen werden. Bei B5

Ergebnisse

und B6 war der Virusnachweis bis Tag 77 bzw. 61 p. n. möglich. Ebenso wie bei B1 bis B4 standen bei B5 während der zweiten Graviditätshälfte nachweislich PI-Tiere im Bestand. Das Muttertier von B6 wurde drei Monate vor der Geburt aus einem Betrieb mit unbekanntem BVDV-Status zugekauft. Bei B2, B3 und B4 konnten am Tag 94, 62/99 bzw. 33 p. n. BVDV-Antikörper nachgewiesen werden.

**Tab. 10: Tiere der Feldstudie: Ergebnisse Gruppe B**

Tier	<u>Ohrgewebe</u>			<u>Blut</u>			
	Stanzung (Tag p .p.)	PCR (Ct-Wert)	E <sup>ms</sup> Elisa (OD-Wert)	Entnahme (Tag p .p.)	NS3- Nachweis	PCR (Ct-Wert)	AK-ELISA (indirekt)
B1	2	28,3	0,06	69	negativ	38,1	nd
				124	negativ	>42	nd
B2	2	31,2	1,76	16	negativ	33,5	nd
				24	negativ	34,5	nd
				45	negativ	37,0	nd
				51	negativ	>42	nd
				62	negativ	37,1	nd
				94	negativ	>42	positiv
B3	5	34,2	>2,5	21	positiv	nd	nd
				42	negativ	32,0	nd
				51	negativ	34,3	nd
				63	negativ	33,4	positiv
				99	negativ	37,8	positiv
				120	negativ	>42	nd
B4	0	36,3	0,06	12	negativ	34,8	nd
				33	fraglich	36,2	positiv
				54	negativ	>42	nd
B5	0	37,3	0,08	62	negativ	37,0	nd
				77	nd	35,4	nd
				83	negativ	>42	nd
B6	29	33,8	0,45	40	negativ	37,0	nd
				61	negativ	37,9	nd
				82	negativ	>42	nd

Gruppe C bilden zwei Studientiere (C1, C2), deren Muttertiere während der Gravidität (C2: 48d a. p.) mit einer Lebendvakzine gegen BVDV geimpft wurden. In Tabelle 11 ist eine Teilübersicht des Betriebs dargestellt, in dem Tier C1 geboren wurde. In diesem Betrieb, in dem regelmäßig gegen Ende der Gravidität geimpft wird, kamen während der Studienteilnahme fünf weitere Kälber (X) mit einem positiven Wert in der Ohrgewebeuntersuchung zur Welt. Es wurden bei allen sechs Kälbern niedrige Ct-Werte gemessen. Bis auf C1 konnten in den daraufhin entnommenen Blutproben keine Virus-RNA mehr nachgewiesen werden. Wie aus Tabelle 9 ersichtlich, erfolgte die Blutentnahme von C1 bereits an Tag 11 p. n., bei den anderen Kälbern zu einem späteren Zeitpunkt.

**Tab. 11: Tiere der Feldstudie:** Übersicht der Ergebnisse eines Impfbetriebs

Tier	<u>Ohr</u>			<u>Blut</u>			
	Stanzung (Tage p. p.)	PCR (Ct-Wert)	E <sup>ms</sup> Elisa (OD-Wert)	Entnahme (Tage p. n.)	NS3- Nachweis	PCR (Ct-Wert)	AK- ELISA (indirekt)
<b>C1</b>	<b>1</b>	<b>31,8</b>	<b>1,08</b>	<b>11</b>	<b>negativ</b>	<b>36,4</b>	<b>positiv</b>
				<b>21</b>	<b>negativ</b>	<b>&gt;42</b>	<b>nd</b>
				<b>43</b>	<b>negativ</b>	<b>&gt;42</b>	<b>positiv</b>
X	1	31,0	0,20	42	negativ	>42	nd
X	3	33,8	0,07	33	negativ	>42	nd
X	1	29,1	0,10	19	negativ	>42	nd
X	1	30,3	0,33	25	negativ	>42	nd
X verkauft	2	35,0	0,09	nd	nd	nd	nd

Die Ergebnisse des Tieres C2 stellen sich wie folgt dar: Die Stanzung erfolgte am Tag 7 p. n. In der PCR war die Ohrgewebeprobe negativ, im E<sup>ms</sup> ELISA zeigte sich ein OD-Wert >2,5. Die erste Blutprobe wurde an Tag 18 p. n. entnommen und war beim NS3-Nachweis negativ und hatte in der PCR einen Ct-Wert von 34,0. Zwei weitere Blutproben entnommen an Tag 39 und 103 p. n. folgten, welche beide BVDV negativ waren. In dem Betrieb konnte während der Studienteilnahme kein weiteres Kalb mit positiven BVDV-Ergebnissen gefunden werden.

## Ergebnisse

Tiere der Gruppe D wurden im Sinn der Feldstudie nicht als transient infiziert definiert, da bei ihnen nach einem BVDV-positiven Ergebnis der Ohrstanze kein Virus im Blut nachgewiesen werden konnte. Vom epidemiologischen Standpunkt aus betrachtet, handelt es sich wahrscheinlich um transient infizierte Tiere, da sie in verschiedenen Betrieben als „Vorboten“ von PI-Tieren beobachtet wurden (Tabelle 12). Diese D-Tiere kamen zwischen einem und vier Monaten vor der Geburt des ersten PI-Tieres zur Welt. Daher ist die intrauterine Infektion - eine gleichzeitige Bestandsdurchseuchung vorausgesetzt - bei diesen Tieren Ende des zweiten, Anfang des dritten Trächtigkeitsdrittels anzunehmen.

**Tab. 12: Tiere der Feldstudie: Ergebnisse Gruppe D**

Tier	Stanzung (Tage p. n.)	Ohrgewebe		Tage vor erstem PI-Tier geboren
		PCR (Ct-Wert)	E <sup>rns</sup> ELISA (OD-Wert)	
<b>Betrieb 1:</b> 3 PI-Tiere innerhalb von 44 Tagen geboren;				
D1	1	33,1	0,12	104
D2	2	30,7	0,13	104
D3	0	30,8	0,08	33
<b>Betrieb 2:</b> 3 PI-Tiere innerhalb 26 Tagen geboren; weitere 7 PI innerhalb von 316 Tagen;				
D4	0	31,4	0,06	130
D5	0	34,5	0,08	76
D6	0	30,7	0,05	63
D7	0	34,0	0,05	51
<b>Betrieb 3:</b> zwei Perioden (A+B) mit PI-Tieren im Abstand von 1,5 Jahren;				
A: 3 PI-Tiere innerhalb von 42 Tagen geboren; B: 2 PI-Tiere innerhalb von 33 Tagen geboren;				
D8 (A)	2	35,5	0,10	32
D9 (B)	3	32,1	0,08	99
D10 (B)	2	30,8	0,07	74
D11 (B)	2	36,3	0,08	74

## 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die transiente BVDV-Infektion, insbesondere in Bezug auf die Diagnostik mit Hautgewebeproben, näher untersucht werden. Es wurden BVDV-freie Kälber in einem experimentellen Infektionsversuch intranasal inokuliert und in einem Zeitraum von sieben Wochen beprobt. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Diagnostik der Infektion mit Hilfe verschiedener Nachweissysteme.

Des Weiteren wurden Ergebnisse aus dem bayerischen Pilotprojekt „Studie zur Eignung der Ohrgebiediagnostik bei neugeborenen Kälbern“, welche anhand der Untersuchungen von Ohrgewebe- und Blut als transient infiziert definiert wurden, ausgewertet.

### 5.1 Infektionsversuch

Akute Infektionen mit dem BVDV verlaufen in den meisten Fällen subklinisch. Daneben kann es zu einem milden klinischen Erscheinungsbild mit leichtem Anstieg der Körpertemperatur, einer Leukozytopenie und vereinzelt mildem Nasenausfluss kommen (Baker, 1995; Brownlie, 1990).

In dieser Arbeit wurden sechs BVDV-freie Kälber mit einem BVDV-1 Isolat (CR4043) intranasal inokuliert. Fünf dieser Tiere zeigten darauf hin eine transiente BVDV-Infektion. Bei Kalb **E** konnte nach Virusapplikation keine BVDV-Infektion nachgewiesen werden. Seit der Aufstallung im Versuchsstall konnte bei **E** ein regelmäßiges und deutliches Husten beobachtet werden. Ursächlich für das Fehlschlagen der Infektion könnte daher eine unspezifische Anregung des Immunsystems sein. Alternativ kann ein Versagen bei der Virusapplikation nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Zwischen dem 8. und 10. Tag nach Infektion war bei **A**, **B**, **C**, und **F** ein Anstieg der Körpertemperatur zu beobachten. Die Maximalwerte lagen zwischen 40,1 und 41,1°C. Die Tiere zeigten dabei ein reduziertes Allgemeinbefinden, bei **C** konnte leichter Nasenausfluss beobachtet werden. Die Futter- und Tränkeaufnahme blieb ungestört und alle Tiere erholten sich innerhalb ein bis zwei Tage vollständig. Eine medikamentelle Behandlung war nicht nötig. In anderen Infektionsversuchen konnte zwischen Tag 8 und 9 nach Infektion ebenfalls ein Anstieg der Körpertemperatur beobachtet werden. Die Höchstwerte lagen bei 41,3 und 41,6°C (Niskanen et al., 2000; Traven et al., 1991).

**A** zeigte von Tag -2 bis Tag 1 p. inf. und in der zweiten Versuchswoche an einzelnen Tagen leichten Durchfall. Bei **F** konnte in der zweiten Versuchswoche ebenfalls tageweise geringgradiger Durchfall beobachtet werden. **E** zeigte seit Anlieferung in die Stallungen bis

zum Tag 12 p. inf. intermittierend geringgradigen Durchfall. Daher lässt sich vermuten, dass auch der Durchfall bei **A** und **F** nicht BVDV-infektionsbedingt war.

Bei der Betrachtung der Gesamtleukozytenzahl konnte zwischen Tag 3/4 und 6/7 p. inf. bei **D** und **F** eine deutliche Leukozytopenie beobachtet werden (Abfall auf etwa 50 bis 60%), wohingegen **B** und **C** nur einen geringgradigen Rückgang der Zellzahl zeigten. **A** sowie das nicht infizierte Kalb **E** ließen keine relevante Abnahme der Leukozyten erkennen. Vergleichend dazu zeigten die Tiere aus anderen Studien nach der Infektion alle eine Leukozytopenie (Müller-Doblies et al., 2004; Niskanen et al., 2000; Traven et al., 1991)

Parallel zur Erhöhung der Körpertemperatur konnte ein starker Anstieg der Leukozyten zwischen Tag 8 und 10 p. inf. bei **A**, **B**, **C** und **F** beobachtet werden, was sich mit den Ergebnissen aus der Studie von Traven et al. (1991) und Müller-Doblies et al. (2004) deckt.

Mit Leukozyten sowie mit Nasen- und Speichelsekreten wurden Virustitrationen durchgeführt. Aus Leukozyten konnte bei **A**, **C**, **D** und **F** zwischen dem 5. und 8. Tag p. inf. Virus angezüchtet werden, wohingegen bei **B** nur an Tag 7 und 8 p. inf. Virus zu isolieren war. Bei **B** konnte aus Nasen- und Speichelsekret kein BVDV angezüchtet werden. Bei Tier **A** war der Virusnachweis im Nasensekret zwischen Tag 5 und 9 p. inf. möglich, bei **C**, **D** und **F** konnten zwischen Tag 6 und 10 p. inf. vereinzelt positive Ergebnisse beobachtet werden. Bruscke et al. (1998) konnten im Experiment ab Tag 4 nach Infektion BVDV aus Blutleukozyten isolieren. Allerdings ist der weitere Verlauf nicht eindeutig zu klären, da die Tiere in dieser Studie zu weiteren Untersuchungen euthanasiert wurden. Aus Nasensekret konnte zwischen Tag 1 und 8 p. inf. Virus nachgewiesen werden.

Im Speichelsekret konnte nur bei **A** zwischen Tag 7 und 10 p. inf. Virus nachgewiesen werden. Dieser Zeitraum deckt sich mit der Periode, in der das BVDV aus Nasensekret isoliert werden konnte.

Bisher ist die Untersuchung von transienten BVDV-Infektionen mittels *real time* RT-PCR nur vereinzelt beschrieben. In dieser Arbeit wurde diese Methode zur Quantifizierung der BVDV-5'UTR eingesetzt. Untersucht wurden Blutleukozyten, Plasma, Hautbiopsien, Nasen- und Speichelsekrete.

In den Leukozytenpellets ( $5 \times 10^6$  Zellen) konnte bereits ab Tag 3 p. inf. bei Kalb **A** und **C** Virus-RNA detektiert werden. Bei **D** und **F** war der Nachweis einen Tag und bei **B** zwei Tage später möglich. Mittels PCR konnte das Virus somit früher und über eine längere Zeitspanne nachgewiesen werden, als dies mit der Virusisolierung gelang. Bei **A** konnte das Virus am längsten (15 Tage) und bei **B** am kürzesten (7 Tage) detektiert werden. Die maximalen RNA-Mengen konnten bei allen Tieren zwischen Tag 6 und 8 p. inf. nachgewiesen werden. In einer

Studie (Cornish et al., 2005) konnten mit der PCR aus Leukozyten bei transient infizierten Tieren keine positiven Resultate erzielt werden. Da es sich hier um Proben aus dem Feld handelt, wurden keine weiteren Angaben zum Infektionszeitpunkt gemacht. Vergleichend konnte in der Studie bei PI-Tieren die Virus-RNA problemlos detektiert werden.

Im Blutplasma (200 $\mu$ l) konnte das BVDV erst ab dem 6. Tag p. inf. gefunden werden und war bei allen Tieren zwischen 6 und 8 Tage nachweisbar. Die höchsten Kopienzahlen wurden an Tag 8 p. inf. (**D**) und Tag 9 p. inf. (**B**) ermittelt. Im Gegensatz zu den Leukozyten konnten im Plasma bei **A** die wenigsten RNA-Kopien nachgewiesen werden. Ridpath et al. (2002) führten im Rahmen eines Infektionsversuchs die PCR mit Serumproben durch. Die Proben wurden ab Infektion (Tag 0) bis Tag 13 p. inf. im Abstand von vier bis fünf Tagen entnommen. Bei drei von 16 Tieren konnte an Tag 4, 9 und 13 p. inf. Virus-RNA nachgewiesen werden. Mit Seren aus dem Feld konnten Hilbe et al. (2007) drei transient infizierte Kälber mittels real time PCR nachweisen, wohingegen Hautproben der Tiere mit IHC und Antigen-ELISA negativ getestet wurden.

Im Nasensekret (10 $\mu$ l) konnte das Virus mittels PCR im Gegensatz zur Virusisolierung bis zu sieben Tage detektiert werden. Auch bei Tieren, bei denen die Virusisolierung nur vereinzelt (**C** und **F**) oder keine (**B**) positiven Ergebnisse brachte, konnte in der PCR über mehrere Tage Virus nachgewiesen werden. Die meisten Viruskopien wurden bei **A** gefunden.

Im Speichelsekret (10 $\mu$ l) konnte bei allen Tieren Virus-RNA nachgewiesen werden, die Virusisolierung gelang hingegen nur bei **A**. Allerdings konnten im Vergleich zu den Nasensekreten deutlich geringere RNA-Mengen gefunden werden. Dies dürfte dadurch zu erklären sein, dass es durch die hohe Speichelproduktion des Rindes zur Verdünnung des freigesetzten Virus kommt. Die hohe RNA-Menge an Tag 1 nach Infektion bei Kalb **B** überrascht. Eine Probenkontamination kann hier nicht ausgeschlossen werden, obwohl kein Hinweis dazu vorliegt. Auch wäre der Kontakt zu einem BVDV-infizierten Schleimhautfokus im Maul bei der Probenahme denkbar. Bei keinem der anderen Tiere wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht.

Der BVDV-Nachweis aus Hautproben gelang mit der PCR nur bei einem von fünf Tieren. Bei **A** konnten zwischen Tag 2 und 17 p. inf. geringe Mengen an Virus-RNA gemessen werden, der Höchstwert wurde an Tag 14 p. inf. beobachtet. In einer Studie von Ridpath et al. (2002) wurden Hautproben von akut infizierten Kälbern mittels PCR untersucht, was zu ähnlichen Ergebnissen führte. Dort ließ sich bei drei von 16 Tieren eine BVDV-Infektion detektieren. Im Gegensatz dazu konnte Fux (2007) in seiner Arbeit zeigen, dass sich PI-Tiere mit der PCR aus Ohrstanzen sicher detektieren lassen.

Bei der Untersuchung von Blutplasma mit E<sup>ms</sup>-ELISA zeigten alle Tiere einen gleichmäßigen An- und Abstieg der Antigen-Menge. Das E<sup>ms</sup> lies sich mit Ausnahme von **A** für fünf bis sieben Tage im Plasma nachweisen. Die maximalen Werte konnten entsprechend den PCR-Werten an Tag 8 und 9 p. inf. beobachtet werden, dabei lagen die E<sup>ms</sup>-Titer bei **B**, **D** und **F** über 120. Bei **A** konnten an Tag 8 und 9 p. inf. nur Titer von 2 und 4,4 detektiert werden. Dieses Tier zeigte in der Plasma-PCR ebenfalls die niedrigsten Virusmengen. Vergleichend zur PCR konnte das BVDV mit dem AG-ELISA bei einem Tier einen Tag früher nachgewiesen werden, war allerdings bei allen Tieren über einen kürzeren Zeitraum zu finden. In der Arbeit von Arquint (2003) konnte nur bei einem von sechs Tieren nach experimenteller Infektion an Tag 7 p. inf. Virus-Antigen nachgewiesen werden.

Der AG-Nachweis aus Hautproben mit dem E<sup>ms</sup> ELISA brachte bei allen Tieren negative Ergebnisse. In der Studie von Hilbe et al. (2007) wurden vergleichbare Resultate beobachtet. Dort konnten bei drei akut infizierten Rindern positive Ergebnisse von Serumproben mittels PCR und AG-ELISA beobachtet werden. Aus Hautproben der entsprechenden Tiere konnte hingegen mit dem ELISA kein virales Antigen detektiert werden. Weitere Ergebnisse beschreibt eine Studie von Cornish et al. (2005). Hier wurden in einem Herdensing (insgesamt 559 Rinder) Ohrgewebeproben mittels Immunhistochemie (IHC) und AG-ELISA (sowie Virusisolierung, RT-PCR und SNT) untersucht. Davon waren acht Tiere im E<sup>ms</sup>-ELISA und sechs Tiere in der IHC Untersuchung positiv. Folgeproben dieser Tiere in monatlichen Abständen brachten negative Ergebnisse. Somit wurden diese Tiere als transient infiziert eingeordnet. Wie viele transiente Infektionen beim primären Screening übersehen wurden, wurde im Rahmen dieser Studie nicht überprüft. In den verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Isolate zur Infektion eingesetzt oder aus dem Feld charakterisiert. Eine mögliche Erklärung für die divergierenden Ergebnisse im AG-Nachweis aus Hautproben könnte sein, dass die Virus-Isolate in ihrer Virulenz variieren und dadurch mehr oder weniger in der Haut zu finden sind. Njaa et al. (2000) konnten nach Inokulation unterschiedlich hoher Virusmengen nur bei den Tieren BVDV-Antigen mit Immunhistochemie nachweisen, die mit der höheren Dosis infiziert wurden. Es stellt sich die Frage, ob die Menge an infektiösem Material ausschlaggebend ist für einen Nachweis im transient infizierten Tier. Für die Infektion der empfänglichen Zellen in der Haut ist die systemische Virämie entscheidend, deren quantitative Ausprägung jedoch eher vom Virusisolat und der Vermehrung am primären Infektionsort abhängen wird.

Vergleichend ließ sich aus Hautproben von persistent infizierten Tieren das BVDV-Antigen problemlos detektieren. Dies entspricht den Untersuchungen von Fux (2007) und Kühne et al.

(2005). Dort konnten PI-Tiere anhand von Hautproben mit einem E<sup>ms</sup>-ELISA sicher nachgewiesen werden.

Der Nachweis von BVDV-NS3-spezifischen Antikörpern aus Serumproben wurde mit Hilfe eines blocking ELISAs durchgeführt. Bei **A** konnten ab Tag 17 p. inf. signifikante Mengen an Antikörpern detektiert werden. Bei **B**, **C**, **D** und **F** war der Antikörper-Nachweis ab Tag 21 p. inf. möglich. Kalb **A** zeigte den höchsten Antikörpertiter. Beim heterogenen Kurvenverlauf von **A** und **D** ließ sich eine Vertauschung von Serumproben durch eine wiederholte Testung der analogen Plasmaproben ausschließen. In vergleichbaren Studien mit experimenteller Inokulation von Kälbern konnte eine Serokonversion nach erfolgreicher BVDV-Infektion zwischen Tag 14 und 28 p. inf. beobachtet werden (Niskanen et al., 2000; Sandvik et al., 1997; Traven et al., 1991). Die in dieser Arbeit erzielten Resultate liegen ebenfalls in diesem Zeitraum und entsprechen somit den Ergebnissen oben genannter Studien.

Bei Kalb **E**, welches sich nicht infizierte, konnten zu keinem Testzeitpunkt (**E** wurde noch mehrere Monate über den Versuchszeitraum hinaus gehalten und getestet) Antikörper nachgewiesen werden.

Die Hautgewebeproben wurden mit demselben Testsystem wie die Seren auf die Anwesenheit von NS3-Antikörpern untersucht. Allein bei **A** konnte an Tag 49 p. inf. eine spezifische Reaktion beobachtet werden. Fux (2007) konnte bei PI-Tieren, die mit dem Kolostrum große Mengen maternale BVDV-Antikörper aufnahmen, ebenfalls Antikörper gegen das NS3 nachweisen. Man kann also davon ausgehen, dass die Detektion von Antikörpern in der Haut möglich ist. Das Ausbleiben einer spezifischen Reaktion bei den vier anderen Kälbern in dieser Arbeit lässt sich dadurch erklären, dass diese Kälber im Vergleich zu **A** deutlich geringere Mengen Antikörper produzierten (vgl. AK-Titer Serum). Die in Lymphe und Plasma der Hautproben enthaltenen Antikörper lagen unterhalb der Nachweisgrenze des Testsystems.

## 5.2 Transiente Infektion junger Kälber aus der Feldstudie

Als transient infiziert wurden alle neugeborenen Kälber definiert, die in der Ohrgewebeuntersuchung ein positives Ergebnis zeigten, deren erste Blutprobenuntersuchung (innerhalb der ersten 60 Lebenstage) positiv war und bei denen in den Folgeblutproben BVDV-Antigen und -RNA schließlich nicht mehr nachzuweisen war. Es wurden 22 Tiere aus 16 Betrieben nach diesen Kriterien definiert. Zur leichteren Interpretation der Ergebnisse wurden diese Tiere in drei Gruppen A (n=14), B (n=6) und C (n=2) eingeteilt.

Die Gruppe D wurde aus Studienkälbern gebildet, die mit Blutproben nicht als transient infiziert definiert werden konnten, eine solche Infektion aufgrund von Daten der Herdeninfektion dennoch hochwahrscheinlich ist.

Die Tiere aus Gruppe A wurden alle in den ersten (0 bis 6) Lebenstagen gestanzt. Dies lässt vermuten, dass eine Infektion bereits im Mutterleib stattgefunden haben muss. Vergleichend mit den Ergebnissen des Infektionsversuches konnte dort bei einem Tier erst um den 14. Tag nach Infektion relevante Virusmengen nachgewiesen werden. Die erste Blutprobennahme erfolgte zwischen zwei und vier Wochen nach der Geburt. Bei allen Tieren konnte ein positives Ergebnis nachgewiesen werden. Vergleichend dazu war der Virusnachweis im Infektionsversuch in Leukozyten im Durchschnitt 11 Tage und Plasma zwischen 6 und 8 Tagen möglich, also deutlich kürzer als bei den Tieren der Feldstudie. Bei zehn Tieren war der Nachweis von NS3-Antigen in Leukozyten mittels Immunfluoreszenz nicht möglich. Dies entspricht den Ergebnissen aus dem Infektionsversuch. Mögliche Ursachen könnten sein, dass es bei der akuten BVDV-Infektion nur zu einer geringen zellulären Virämie mit Virusreplikation kommt, welche mit dieser Methode nicht detektierbar ist oder aber dass bereits die Immunantwort mit Antikörperbildung eingesetzt hat. Die Folgeblutproben wurden zwischen Tag 35 und 53 p. n. entnommen, es konnte bei allen 14 Tieren kein BVDV mehr detektiert werden. Bei zwölf von diesen 14 Tieren konnte im Bestand mindestens ein PI-Tier vor Geburt sicher nachgewiesen werden. Die zwei anderen Tiere wurden in Betrieben mit positiven „Jungtierfenster“ geboren. In sechs Betrieben wurden im Verlauf der Studie weitere PI-Tiere geboren.

Gruppe B besteht aus sechs Tieren. Bei fünf dieser Tiere erfolgte die Stanzung wie in Gruppe A in den ersten Lebenstagen (0 bis 5 p. n.). Bei einem Tier wurde erst am Tag 29 nach der Geburt die Ohrmarke eingezogen. Im Gegensatz zu den Tieren aus Gruppe A konnte bei diesen sechs Tieren das BVDV über einen langen Zeitraum im Blut nachgewiesen werden. Vier dieser Tiere wurden im gleichen Betrieb geboren. Bei zwei dieser Tiere konnte die Virus-RNA kontinuierlich bis zum Tag 62 bzw. 99 p. n. in den Leukozyten nachgewiesen

werden. Bei fünf Tieren waren in der zweiten Trächtigkeitshälfte PI-Tiere im Bestand. Die Mutter des sechsten Tieres wurde drei Monate vor der Geburt aus einem Betrieb mit unbekanntem BVDV-Status zugekauft. Das Kalb wurde erst am Tag 29 p. n. gestanzt und daher ist eine postnatale Infektion nicht auszuschließen. Wie bei den Tieren aus Gruppe A deutet es bei den fünf anderen Tieren im Hinblick auf die geburtsnahe Stanzung auf eine intrauterine Infektion hin. Auffallend ist der vergleichsweise lange Zeitraum, in dem eine Virämie nachgewiesen werden konnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich intrauterin gesetzte transiente BVDV-Infektionen anders verhalten könnten als postnatal erworbene. Dabei könnte der Infektionszeitpunkt eine wichtige Rolle spielen. Bei Kälbern, die erst kurz vor der Geburt infiziert werden, könnte die Infektion bei Geburt auf dem Höhepunkt sein. Das Immunsystem, das sich weitgehend noch nicht mit Erregern auseinandersetzen musste, könnte zur Eliminierung länger benötigen, als bei Kälbern mit einer postnatalen Infektion. Andererseits könnte auch eine frühe Infektion Anfang des zweiten Trächtigkeitsdrittels zu oben beschriebenen Bild führen. Ein noch nicht voll ausgebildetes Immunsystem könnte zu einer zeitweiligen Tolerierung des Virus führen (vgl. Studientier **Martin**). Dadurch würde keine dauerhafte persistente Infektion entstehen, aber der Zeitraum bis zur Virusfreiheit würde verglichen mit später stattfindenden BVDV-Infektionen deutlich verlängert. Alternativ könnten diese Beobachtungen durch ein schnell replizierendes Virus mit wenig immunogenen Eigenschaften erklärt werden. Dass vier der sechs Tiere aus dieser Gruppe aus demselben Bestand kommen, spräche dafür. Allerdings wurden in diesen Betrieben auch transient infizierte Tiere gefunden, die keine verlängerte Virämie zeigten.

Die zwei Tiere aus Gruppe C wurden in Betrieben geboren, in denen die trächtigen Muttertiere gegen das BVDV mit einer Lebendvakzine geimpft werden. Bei einem Tier ist bekannt, dass die Mutter 48 Tage vor der Geburt geimpft wurde. Dass lebendes Vakzinevirus zu einer fetalen Infektion führen kann ist lange bekannt (Done et al., 1980; Liess et al., 1984; Liess et al., 1987). Bei den zwei Kälbern der Gruppe C, sowie den fünf weiteren beschriebenen Kälbern aus einem der Impfbetriebe, hat sich das Impfvirus höchstwahrscheinlich in den empfänglichen Zellen des Hautgewebes (und vermutlich auch anderer Organe) vermehrt. Dies brachte teilweise deutlich positive Ergebnisse in der *real time* PCR und im AG-ELISA. Die einsetzende Immunantwort führte anschließend zur schnellen Eliminierung des Virus. Nur bei einer frühen Entnahme der Blutprobe (Tag 11 bzw. Tag 18 p. n.) konnte das Virus bei zwei Kälbern noch nachgewiesen werden. Bei den übrigen Kälbern (Beprobung zwischen Tag 19 und 42) war dies nicht mehr möglich.

Bei den Tieren der Gruppe D wurde in der PCR ein positives Ergebnis mit Ohrspeicheldrüsengewebe erzielt, allerdings konnte in der folgenden Blutprobe kein BVDV nachgewiesen werden. Daher wurden die Tiere im Rahmen der Studie nicht als transient infiziert definiert, obwohl aus epidemiologischer Sicht eine transiente Infektion hochwahrscheinlich ist, da in den Herden zeitlich passend jeweils PI-Tiere geboren wurden. Kommt es in einem Bestand zur Durchseuchung mit dem BVDV, infizieren sich gravide Kühe in verschiedenen Trächtigkeitsstadien. Daraus resultiert eine Abfolge verschiedener klinischer Erscheinungen. Infizierte spätgravide Kühe können in der Folge Kälber gebären, die sich intrauterin mit dem Virus auseinandergesetzt haben und serokonvertiert sind. Gleichzeitig kann es bei Tieren um den Konzeptionszeitpunkt und bei Frühgraviden zu Störungen in der Fruchtbarkeit kommen (Umrindern, Aborte) (Grooms, 2004). In der darauf folgenden Periode können Kälber mit kongenitalen Missbildungen geboren werden (intrauterine Infektion zwischen Tag 100 und 150) (Duffell und Harkness, 1985). Erst später sind dann Kälber zu erwarten, die im ersten Trächtigkeitsdrittel infiziert wurden und eine Immuntoleranz entwickelten (McClurkin et al., 1984). Die Tiere der Gruppe D stellen somit Kälber dar, die in der zweiten Trächtigkeitshälfte infiziert wurden und eine intrauterine transiente Infektion durchmachten. In der Ohrspeicheldrüse konnte das Virus bei den Neugeborenen noch nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr in späteren Blutproben. Besondere Bedeutung könnten solche Tiere im Rahmen einer kontinuierlichen Bestandsdiagnostik (zum Beispiel innerhalb eines Bekämpfungsverfahrens) als Vorboten von zu erwartenden PI-Tieren erlangen.

### 5.3 Studientier M

Studientier **M** stammt aus einem Betrieb, in dem 253 bzw. 220 Tage vor der Geburt von **M** zwei PI-Tiere geboren wurden. Diese wurden genauso wie **M** im Rahmen der bayerischen Ohrgewebsstudie als BVDV-positiv erkannt und für die Statusbestimmung weiter untersucht. Sowohl mit der PCR als auch mit dem E<sup>ms</sup>-ELISA konnte in den nach der Geburt entnommenen Ohrstanzen von **M** BVD-Virus (Ct 29,6 und OD 0,69) nachgewiesen werden. Bei den nachfolgenden Untersuchungen von Blut, Haut und Hodengewebe ergab sich ein Gesamtbild an Ergebnissen, dass in dieser Form in der Literatur noch nicht beschrieben wurde.

Der Nachweis des Nichtstrukturproteins 3 in Blutleukozyten mittels FACS-Analyse ist eine sensitive und spezifische Methode zum Nachweis persistent infizierter Rinder. Ausgenommen davon ist die kolostrale Phase, da diese Nachweismethode durch maternale Antikörper bis zu drei Monate nach der Geburt gestört werden kann (Beer und Wolf, 1999; Qvist et al., 1990; Wolf, 2005). Bei Tier **M** konnte zu keinem Zeitpunkt das NS3 mit FACS-Analyse nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu konnten beim Nachweis des E<sup>ms</sup> im Plasma zunächst hohe Antigen-Titer ermittelt werden. Im Alter von zirka sechs Monaten konnte die größte E<sup>ms</sup>-Menge mit Titer 495 beobachtet werden. Im nachfolgenden Zeitraum fiel die gemessene Antigenmenge im Plasma stetig ab, bis sie Ende des 10. Lebensmonats die Nachweisgrenze des ELISAs erreichte und danach diese unterschritt. Das Strukturprotein E<sup>ms</sup> ist im Vergleich zum NS3 nur wenig immunogen und induziert nur geringe Mengen neutralisierender Antikörper, weswegen auch die „Diagnostische Lücke“ in der kolostralen Phase kürzer ist als beim NS3 (Sandvik, 2005; Weiland et al., 1992; Wolf, 2005). In den Hautbioptaten ließ sich das E<sup>ms</sup> bis zum Tag 338 konstant mit vergleichsweise hohen Titern nachweisen. Etwa acht Wochen später konnte das Antigen nicht mehr detektiert werden.

Beim Nachweis der BVDV-RNA im Blut mittels *real time* RT-PCR konnte ebenfalls ein Abfall beobachtet werden. **M** zeigte seit Geburt verglichen mit PI-Tieren hohe Ct-Werte (= geringe RNA-Menge), die im Laufe der Zeit noch weiter anstiegen. Untersuchte Blutleukozyten lieferten ab dem 11. Lebensmonat, Plasmaproben erstmals Ende des 14. Lebensmonats negative Ergebnisse. Da der RNA-Nachweis nicht durch Antikörper inhibiert wird, spiegeln die PCR-Ergebnisse die tatsächliche Viruslast im Blut wider. Verglichen mit Blutproben ließ sich im Hautgewebe deutlich mehr BVDV-RNA nachweisen. Erst ab Tag 391 kam es zu einer deutlich Reduktion der RNA-Menge. Doch wurde bis zum Ende des

Untersuchungszeitraums für diese Arbeit keine Probe mit negativem Ergebnis getestet. Ob und wann auch die Haut virusfrei wird, bleibt abzuwarten.

Der nachgewiesene Abfall der Virusmenge sowohl beim Antigennachweis als auch bei der RNA-Detektion lässt sich durch die Resultate der Antikörperuntersuchungen erklären. Über den Antikörperstatus in den ersten vier Lebensmonaten liegen nur wenige Daten vor, seit Kalb **M** aber in den Ställen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie gehalten wurde, konnte die Entwicklung der Antikörperlevel lückenlos ermittelt werden. Zwischen Lebenswoche 17 und 27 konnten BVDV-spezifische Antikörper auf gleich bleibendem Niveau (AK-Titer zwischen 5 und 10 mit NS3-blocking-ELISA) nachgewiesen werden. Im folgenden Zeitraum kam es zu einem starken Antikörperanstieg, bis nach 48 Wochen ein Titer von 4096 überschritten wurde.

Aufgrund der Resultate vom E<sup>ms</sup>-Nachweis und der PCR ist **M** als persistent infiziertes Tier definierbar (Antigen- bzw. RNA-positiv im Abstand von mindestens 21 bzw. 42 Tagen). Persistente BVDV-Infektionen beruhen auf der Immuntoleranz des Rindes gegenüber dem infizierenden Virus (Coria und McClurkin, 1978; McClurkin et al., 1984). Das bedeutet, dass PI-Tiere gegen das BVD-Virus keine Antikörper produzieren oder eine zelluläre Immunität ausbilden können. Dies bezieht sich jedoch nur auf den homologen Virusstamm, der die Immuntoleranz induzierte. Gegen heterologe, antigenetisch unterschiedliche BVD-Viren kann eine spezifische Immunität ausgebildet werden (Bolin, 1995; Brownlie und Clarke, 1993). Die Tatsache, dass das bei Tier **M** nachgewiesene Antikörperlevel erst im Alter von sechs Monaten deutlich ansteigt und dass auf dem Gelände, auf dem **M** gehalten wurde in einem anderen Stallgebäude weitere PI-Tiere (BVDV-1) aufgestellt waren, lässt eine solche heterologe Infektion vermuten. Tier **M** ist mit einem BVDV Genotyp 2 infiziert. Durch Serumneutralisationstest konnte gezeigt werden, dass **M** neutralisierende Antikörper gegen das eigene BVDV-Isolat produziert (Titer 25600), gegen das heterologe BVDV-1 des Infektionsversuches wurde ein Titer von etwa 3200 ermittelt.

Brock et al. (1998) und Grooms et al. (2001) berichten über eine adulte PI-Kuh, die über mehrere Jahre neutralisierende Antikörper gegen das persistierende Virus produzierte. Diese Antikörper verhinderten den BVDV-Nachweis im Plasma mittels Virusisolierung, wohingegen das Virus aus WBC isoliert werden konnte. In einem Infektionsversuch konnte die inzwischen achtjährige Kuh einen seronegativen Bullen mit BVDV infizieren.

Lokale persistierende Infektionen im Hodengewebe bei immunkompetenten Jungbullen konnten Voges et al. (1998) und Dünser et al. (2005) beobachten. Beide Tiere schieden das Virus mit dem Ejakulat aus. Mittels Virusisolierung und PCR konnte das BVDV im

Hodengewebe nachgewiesen werden, wohingegen andere Organe und Blutproben virusfrei waren. Im Serum konnten große Mengen neutralisierender Antikörper detektiert werden. Erklärt wurden die Beobachtungen mit einer Infektion der Hoden der immunkompetenten und seronegativen Tiere während der Pubertät und einer anschließenden Abkoppelung des Keimdrüsengewebes vom Immunsystem durch die Ausbildung der Blut-Hodenschranke. Niskanen et al. (2002) führten einen Versuch mit gefrorenen Samenproben des Bullen „Cumulus“ aus der Veröffentlichung von Voges et al. (1998) durch. Von drei besamten Kühen zeigte ein Tier eine Serokonversion wurde aber nicht erfolgreich befruchtet, die zwei anderen Kühe blieben antikörperfrei und aus deren Früchten konnte kein BVD-Virus isoliert werden. Auch wenn in diesem Versuch kein PI-Tier induziert werden konnte, zeigte sich klar das Potential zur Virusübertragung durch das Sperma des Bullen.

Um den Zustand von Tier **M** zu erklären, lassen sich verschiedene Vermutungen aufstellen. Zum einen könnte das Virus in **M** einem Antigen-Drift unterlegen sein, der dazu führte, dass die Antigenepitope soweit verändert wurden, dass sie aus dem Rahmen der Immuntoleranz herausfallen. Dadurch würde das Immunsystem wie auf ein heterologes Virus mit einer Antikörperantwort reagieren. Der starke Anstieg der Antikörper nach dem 6. Lebensmonat ließe sich dadurch erklären. Dagegen spricht, dass sowohl neutralisierende Antikörper als auch nicht neutralisierende NS3-AK deutlich anstiegen. Dazu müsste es in verschiedenen Bereichen des BVDV-Genoms zu erheblichen Mutationen gekommen sein. Gerade für das hochkonservative Nichtstrukturprotein 3 ist das unwahrscheinlich, da es für die Virusreplikation entscheidende Bedeutung hat (Tautz et al., 1997; Tautz et al., 1999; Xu et al., 1997). Außerdem wird dadurch nicht erklärt, warum im Blut kein BVDV mehr zu detektieren ist. Das ursprünglich persistierende Virus müsste weiterhin nachzuweisen sein.

Wahrscheinlicher ist, dass im Fall von Studientier **M** eine partielle Immuntoleranz vorliegt. Die Ausreifung des Immunsystems der Frucht ist im 4. Trächtigkeitsmonat so weit vorangeschritten, dass nur ein kleiner Anteil der infizierten Feten eine Immuntoleranz ausbildet (Liess et al., 1984; McClurkin et al., 1984). Doch dürften bei der Ausbildung der Immunkompetenz fließende Übergänge zu beobachten sein. Bei **M** könnte eine Toleranz gegenüber dem Virus soweit ausgeprägt worden sein, dass sich während der Trächtigkeit und in den ersten Lebensmonaten ein Gleichgewicht zugunsten des Virus eingestellt hat. Über den Antikörperstatus von **M** in den ersten vier Lebensmonaten liegen keine ausreichenden Daten vor, doch lassen die nachgewiesenen stabilen Antikörperlevel im 5. und 6. Monat vermuten, dass zunächst unabhängig von eventuell aufgenommenen kolostralen Antikörpern, eine Antikörperproduktion auf niedrigem Niveau statt gefunden hat. Im Alter von etwa sechs

Monaten scheint das Gleichgewicht zwischen Virus und Immunsystem zugunsten letzterem gekippt zu sein. Durch die massive Aktivierung des humoralen aber auch des zellulären Immunsystems wurde das Virus beinahe gänzlich eliminiert. Ob das BVDV in immunprivilegierten Bereichen wie den Hoden ebenfalls durch die einsetzende Immunreaktion eliminiert worden wäre, bleibt aufgrund der Kastration von **M** unklar. Doch könnten Tiere, wie die oben beschriebenen immunkompetenten Bullen mit persistierender Infektion in den Keimdrüsen, auf diese Weise alternativ erklärt werden (Dünser et al., 2005; Voges et al., 1998).

Von besonderem Interesse für die Epidemiologie und die Seuchenbekämpfung ist das Potential von Tieren wie **M** zur Übertragung des BVDV auf seronegative Rinder. Bei Tier **M** konnten an Tag 186 mittels PCR erhebliche Mengen Virus-RNA im Speichel und Nasensekret nachgewiesen werden. Weiterhin wurde am Tag 207 und 250 Virus aus dem Speichel (mindestens  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml) isoliert. Diese Werte sprechen dafür, dass **M** in den ersten Monaten Virus ausgeschieden hat und somit eine Infektionsquelle für andere Tiere darstellte. Zu späteren Zeitpunkten konnte nur noch wenig oder kein BVDV in den Sekreten nachgewiesen werden. Im Alter von etwa einem Jahr wurde Rind **M** über einen Zeitraum von drei Monaten täglich jeweils für eine Stunde mit dem BVDV-naiven Tier **E** in direkten Kontakt gebracht. Eine Infektion bei **E** konnte durch serologische Untersuchungen ausgeschlossen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

In der Literatur finden sich epidemiologische Untersuchungen von Rinderherden, die über den Nachweis von BVDV-Infektionen über einen langen Zeitraum berichten, ohne dass jemals ein PI-Tier gefunden worden wäre (Barber und Nettleton, 1993; Houe, 1995; Moen et al., 2005). Rinder wie Studientier Martin könnten ursächlich für solche Berichte sein. Sie scheiden das Virus zeitweise massiv aus, sind aber mit verschiedenen Routinenachweisverfahren nicht als BVDV-positiv zu erkennen.

## 5.4 Resumee

Für die Epidemiologie des BVDV und die Transmission des Virus werden akute Infektionen (intrauterine ausgenommen) in der Literatur als eher unbedeutend beschrieben (Houe, 1995). Für die Seuchenbekämpfung steht sowohl auf Bestands- als auch auf regionaler Ebene die Detektion und Eradikation der persistent infizierten Tiere im Vordergrund (Houe, 1999). Im Rahmen einer in Bayern durchgeführten Feldstudie zur Erprobung der Ohrgewebsdiagnostik zur Detektion neugeborener PI-Tiere wurden hingegen Daten gesammelt, die die transiente Infektion sowohl aus diagnostischer als auch aus Sicht der Epidemiologie und Immunologie als besonders interessant erscheinen lassen.

In dieser Feldstudie konnten regelmäßig BVDV-positive Ohrstanzproben von Tieren beobachtet werden, die keine persistente Infektion aufwiesen. Zur Abklärung, in wie weit sich das Virus in der Haut von transient infizierten Tieren nachweisen lässt, wurde ein Infektionsversuch mit Kälbern im Alter zwischen zwei Wochen und zwei Monaten durchgeführt. Beim Virusnachweis in Blut und Sekreten und beim Antikörpernachweis konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden wie bei vorangegangenen Studien zur transienten Infektion (Niskanen et al., 2000; Traven et al., 1991). In der Haut konnte nur bei einem von fünf Tieren mittels PCR BVDV nachgewiesen werden. Die E<sup>ms</sup>-Detektion verlief komplett negativ. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Virus auch mit einer hochsensitiven Nachweismethode wie der *real time* RT-PCR nur bei einem Teil der postnatal infizierten Tiere nachzuweisen ist. Im Rahmen der Feldstudie wurden die Kälber in der Regel sehr kurz nach der Geburt beprobt, so dass hier großteils keine postnatalen, sondern intrauterine Infektionen zu Grunde liegen sollten. In späteren Trächtigkeitsstadien haben solche keine negativen Auswirkungen auf die Frucht. Es kommt zur Anregung des fetalen Immunsystems, zur Viruseliminierung und zur Serokonversion (Grooms, 2004). Von großem praktischen Nutzen für die Bestandssanierung und die Tierseuchenbekämpfung könnte die Beobachtung solcher Tiere sein, wenn sie als Vorboten der Geburt von immuntolerant geborenen Kälbern erkannt werden wie es bei den Tieren der Gruppe D beschrieben ist. In anderen Fällen konnten transient infizierte Neugeborene auf bekannte PI-Tiere im Bestand zurückgeführt werden (Gruppe A).

Aus Sicht der Immunologie sind die Tiere der Gruppe B und das Studientier **M** von besonderem Interesse. Bei ersteren konnte nach intrauteriner Infektion eine vergleichsweise lange Virämie (maximal bis zum 99. Lebenstag) beobachtet werden. Das Tier **M** wurde als persistent BVDV infiziert definiert. Trotzdem konnte bei ihm die Bildung von Antikörpern beobachtet werden, die gegen das homologe Virus neutralisierende Eigenschaften besitzen.

Im Laufe der Zeit führte diese Immunreaktion zur deutlichen Reduktion der Viruslast in **M**, die im weiteren Verlauf sogar zur Virusfreiheit führen könnte. Beide Beobachtungen könnten auf die Ausbildung einer unvollständigen Immuntoleranz während der fetalen Phase zurückzuführen sein. Laut Literatur kann es bis zum Gestationstag 125 zur Ausbildung einer Immuntoleranz kommen (Liess et al., 1984; McClurkin et al., 1984), jedoch bereits viel früher infizierte Feten können auch eine Immunität entwickeln, das heißt die Übergänge sind hier fließend. Eine Semi-Immuntoleranz könnte Ausdruck einer biologischen Abstufung zwischen vollständiger Toleranz und Immunkompetenz sein.

## 6. Zusammenfassung

Persistent infizierte (PI) Tiere stellen die wichtigste Transmissionsquelle für BVDV-Infektionen dar. Neuere Studien konnten zeigen, dass sich der Virusnachweis aus Ohrgebewebeproben für die sichere und frühzeitige Detektion von neugeborenen PI-Kälbern eignet. Inwieweit transiente Infektionen mit dieser Methode erkannt werden, ist bisher nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die transiente BVDV-Infektion mit Hautgebewebeproben zu untersuchen.

Im Rahmen eines Tierversuches wurden sechs Kälber intranasal mit BVDV inokuliert. Bei fünf Tieren konnte in der Folge eine transiente Infektion beobachtet werden, deren Verlauf mit verschiedenen Diagnostikmethoden untersucht wurde. Der BVDV-Nachweis gelang mittels Virusisolierung, E<sup>rns</sup>-Antigen-ELISA und *real time* RT-PCR in Blutleukozyten, Plasma sowie Nasen- und Speichelsekreten. Die höchste Sensitivität zeigte dabei der RNA-Nachweis mittels PCR. Eine Serokonversion konnte zwischen Tag 17 und 21 nach der Virusinokulation durch Antikörper-ELISA nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Hautgebewebeproben (Tag 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21 p. inf.) konnten nur bei einem Kalb zwischen 2. und 17. Tag p. inf. geringe Mengen Virus-RNA (maximal 4000 RNA-Kopien/Probe an Tag 14 p. inf.) detektiert werden. Aus lysierten Hautproben konnte bei keinem Tier E<sup>rns</sup>-Antigen nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden Daten von transient infizierten Rindern aus dem Bayerischen Feldprojekt „Studie zur Eignung der Ohrstanzmethode bei neugeborenen Kälbern zur Bekämpfung der BVD/MD“ näher betrachtet. Bei 22 Tieren ließ sich BVDV mittels PCR sowohl im Ohrgebewe (Ct-Werte zwischen 28 und 39) als auch im Blut nachweisen. Die Ohrstanze von drei dieser Tiere war mit dem E<sup>rns</sup>-ELISA schwach positiv (OD 0,4 bis 0,5), bei vier Tieren konnten deutlich positive (OD >1,1) Ergebnisse beobachtet werden. Darunter waren auch Kälber, deren Muttertiere in der Spätgravidität mit einer Lebendvaccine geimpft wurden. Auffallend waren weiterhin sechs Tiere, die eine sehr lange Virämie (bis zu 99 Tage p. p.) zeigten. Bei einer weiteren Gruppe (elf Tiere) konnte das Virus nur im Ohrgebewe mit PCR (Ct-Werte zwischen 31 und 35) nachgewiesen werden. Diese Kälber wurden in Herden geboren, in denen später mehrere PI-Tiere geboren wurden.

Ein Tier aus der Feldstudie zeigte über ein Jahr hinweg abfallende Virusmengen mittels Virusisolierung, *real time* PCR und E<sup>rns</sup>-ELISA in Hautbiopsien, Blutproben und Sekreten. Im Alter von zehn Lebensmonaten konnten mittels PCR im Hodengewebe große Mengen an Virus-RNA (Ct-Wert 21) detektiert werden. Das Virus war aus nur 20 Hodenzellen isolierbar,

gleichzeitig erwiesen sich Sekrete und Blut als nicht infektiös in der Zellkultur. Im 14. Lebensmonat gelang nur noch der Nachweis der Virus-RNA in der Haut. Weiterhin konnte ein starker Anstieg homologer neutralisierender Antikörper gegen das persistierende Virus bis zum Titer von 25600 gemessen werden.

Insgesamt ist festzustellen, dass transiente fetale und postnatale BVDV Infektionen mittels Hautbiopsien bei jungen Kälbern vereinzelt nachweisbar sind. Die PCR war hierbei deutlich sensitiver als der BVDV-E<sup>ms</sup>-Antigennachweis. Bei Neuinfektionen in Herden werden transient infizierte Kälber bereits vor den persistent infizierten geboren. Auch nach der Vakzination mit BVDV-Lebendimpfstoff sind transiente Infektionen mittels Untersuchung von Hautbiopsaten nachweisbar. Erstmals konnte die fetale Infektion eines männlichen Rindes im Feld mit folgender partieller Immuntoleranz charakterisiert werden, bei dem eine Viruselimination im Blut und auf den Schleimhäuten erfolgte, nicht jedoch im Hodengewebe.

## **Investigations for the detection of bovine viral diarrhoea virus in skin biopsies of transient infected cattle using real time RT-PCR and antigen capture ELISA**

Cattle persistently infected (PI) with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) are the main source of infections. As shown in earlier studies, dried skin biopsies derived from ear tagging are useful for early detection of PI calves. The aim of this study was the evaluation of the diagnostics of transient infections with skin biopsies.

In five of six calves inoculated with BVDV infections occurred, shown by virus isolation, E<sup>ms</sup>-capture-ELISA and real time RT-PCR in blood leucocytes, plasma, nasal secretion and saliva. PCR demonstrated highest sensitivity. Seroconversion was demonstrated by indirect antibody ELISA. Dried skin biopsies taken at day 2, 4, 7, 10, 14, 17 and 21 post infection (dpi) were all negative in the antigen capture ELISA. BVDV-RNA could be detected with PCR in biopsies of only one calf from 2 until 17 dpi with a maximum of 4000 RNA-copies (ct value 33) at day 14.

Further transient infected calves from a field trial in Bavarian dairy farms were evaluated. In dried ear biopsies of 22 newborns, which were later defined as transient BVDV infected by repeated blood diagnostics, BVDV-RNA was detected with Ct values in a range of 28 to 39. Remarkably, a long time viremia up to day 99 after birth was observed in six of these calves. Seven of the 22 calves had detectable BVDV-E<sup>ms</sup> in ear samples. The antigen capture ELISA gave low OD values of 0.4 to 0.5 in three samples and high values of above 1.1 in four samples (cut off 0.3). In two cases the mothers were vaccinated with BVDV-live vaccine strain Oregon C24V during late pregnancy. In another group of eleven newborns out of herds with birth of PI calves later on, BVDV-PCR with ear samples resulted in ct values between 31 and 35.

In one calf from the field study over one year decreasing amounts of BVDV could be demonstrated by virus isolation, real time PCR und E<sup>ms</sup>-capture ELISA in skin biopsies, blood samples and mucosal secretions. A corresponding arise of homologues antibodies was observed, the final neutralizing titer was 25600. At the age of ten months in testicular cells BVDV was found in very high amount by PCR (ct 21) and by virus isolation out of 20 cells. At the same time secretions and 10<sup>6</sup> blood leucocytes were negative in virus isolation. In month 14 no viral RNA was detectable in secretions and in blood, in skin biopsies still a very low amount of BVDV-RNA was seen (ct 35).

In conclusion, transient fetal and postnatal BVDV infections can be detected by testing skin biopsies sporadically. For this PCR is more sensitive compared with BVDV E<sup>ms</sup>-capture

ELISA. In new infected herds transient fetal infections can be detected by ear biopsy diagnostics of newborns preceding the births of persistently infected animals. After vaccination with BVDV live vaccine in the late pregnancy BVDV can be found in the ear biopsies of newborns sporadically. For the first time a fetal infection of a male calf with the consequence of a partial immunotolerance could be characterized. Thereby virus elimination in blood and mucosal tissues occurred, but not in the testicles. They remained BVDV positive with very high infectivity.

## 7. Literatur

- Afshar, A., Dulac, G. C., Dubuc, C., und Howard, T. H.** 1991: Comparative evaluation of the fluorescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhoea virus from bull semen.  
Can. J. Vet. Res. 55, 91-93.
- Archbald, L. F., Gibson, C. D., Schultz, R. H., Fahning, M. L. und Zemjanis, R.,** 1973: Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows.  
Am. J. Vet. Res. 34, 1133-1137.
- Arnal, M., Fernandez-de-Luco, D., Riba, L., Maley, M., Gilray, J., Willoughby, K., Vilcek, S. und Nettleton, P. F.,** 2004: A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*).  
J. Gen. Virol. 85, 3653-3657.
- Arquint, A.,** 2003: Immunhistologische Untersuchungen an Hautbiopsien bei akuter BVD (Bovine Virus Diarrhoe).  
Diss. Vet. Med., Universität Zürich.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H. J. und Becher, P.,** 2001: Evidence for the presence of two novel pestivirus species.  
Virology 286, 456-465.
- Baker, J. C.,** 1995: The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection.  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 425-445.
- Barber, D. M. and Nettleton, P. F.,** 1993: Investigations into bovine viral diarrhoea virus in a dairy herd.  
Vet. Rec. 133, 549-550.
- Beaudeau, F., Belloc, C., Seegers, H., Assie, S., Sellal, E. und Joly, A.,** 2001: Evaluation of a blocking ELISA for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) antibodies in serum and milk.  
Vet. Microbiol. 80, 329-337.
- Becher, P., Avalos, Ramirez R., Orlich, M., Cedillo, Rosales S., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirmer, H. und Thiel, H. J.,** 2003: Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification.  
Virology 311, 96-104.
- Becher, P., Orlich, M., König, M. und Thiel, H. J.,** 1999a: Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhoea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease.  
J. Virol. 73, 5646-5653.

- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. und Thiel, H. J., 1999b:** Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262, 64-71.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A. D., Horner, G., König, M. und Thiel, H. J., 1997:** Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78, 1357-1366.
- Beer, M. und Wolf, G., 1999:** Selektion von BVDV-Genotyp-II-Isolaten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers und FACS-Analyse. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 112, 345-350.
- Beer, M., Wolf, G. und Kaaden, O. R., 2002:** Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of german BVDV type II isolates. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 49, 43-47.
- Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H. J., Meyers, G. und Tautz, N., 1998:** Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* 72, 2364-2372.
- Belak, S. und Ballagi-Pordany, A., 1991:** Bovine viral diarrhea virus infection: rapid diagnosis by the polymerase chain reaction. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 181-190.
- Bhudevi, B. und Weinstock, D., 2001:** Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 83, 1-10.
- Bhudevi, B. und Weinstock, D., 2003:** Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *J. Virol. Methods* 109, 25-30.
- Bielefeldt Ohmann H., 1988:** BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implications for the pathogenesis of clinically fatal disease. *Acta Vet. Scand.* 29, 77-84.
- Bielefeldt Ohmann H. und Bloch, B., 1982:** Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures. *Arch. Virol.* 71, 57-74.
- Bielefeldt Ohmann, H., 1995:** The pathologies of bovine viral diarrhea virus infection. A window on the pathogenesis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11, 447-476.
- Bolin, S. R., 1988:** Viral and viral protein specificity of antibodies induced in cows persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus after vaccination with cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1040-1044.

- Bolin, S. R.**, 1995: The pathogenesis of mucosal disease.  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 489-500.
- Bolin, S. R. und Ridpath, J. F.**, 1990: Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines.  
Am. J. Vet. Res. 51, 703-707.
- Braun, U., Schonmann, M., Ehrensperger, F., Hilbe, M. und Strasser, M.**, 1999. Intrauterine infection with bovine virus diarrhoea virus on alpine communal pastures in Switzerland.  
Zentralbl. Veterinärmed. A 46, 13-17.
- Brinkhof, J., Zimmer, G. und Westenbrink, F.**, 1996: Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle.  
Vet. Microbiol. 50, 1-6.
- Brock, K. V.**, 1991: Detection of persistent bovine viral diarrhoea virus infections by DNA hybridization and polymerase chain reaction assay.  
Arch. Virol. Suppl. 3, 199-208.
- Brock, K. V.**, 1995: Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections.  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 549-561.
- Brock, K. V., Grooms, D. L., Ridpath, J., and Bolin, S. R.**, 1998: Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.  
J. Vet. Diagn. Invest. 10, 22-26.
- Brock, K. V. und Chase, C. C.**, 2000: Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhoea virus vaccines.  
Vet. Microbiol. 77, 209-214.
- Brodersen, B. W. und Kelling, C. L.**, 1998: Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves.  
Am. J. Vet. Res. 59, 1423-1430.
- Brownlie, J.**, 1990: The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections.  
Rev. Sci. Tech. 9, 43-59.
- Brownlie, J.**, 1991: The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease.  
Arch. Virol. Suppl. 3, 79-96.
- Brownlie, J. und Clarke, M. C.**, 1993: Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis.  
Intervirology 35, 51-59.

- Brownlie, J., Hooper, L. B., Thompson, I. und Collins, M. E.,** 1998: Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV)-the bovine pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.* 10, 141-150.
- Bruschke, C. J., Weerdmeester, K., Van Oirschot, J. T. und Van Rijn, P. A.,** 1998: Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet. Microbiol.* 64, 23-32.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. und Rice, C. M.,** 1990: Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 649-688.
- Chon, S. K., Perez, D. R. und Donis, R. O.,** 1998: Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 251, 370-382.
- Collett, M. S.,** 1992: Molecular genetics of pestiviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 145-154.
- Collett, M. S., Anderson, D. K. und Retzel, E.,** 1988a: Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 69, 2637-2643.
- Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K. und Retzel, E.,** 1988b: Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208.
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. und Purchio, A. F.,** 1988c: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191-199.
- Corapi, W. V., Donis, R. O. und Dubovi, E. J.,** 1990a: Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1388-1394.
- Corapi, W. V., Elliott, R. D., French, T. W., Arthur, D. G., Bezek, D. M. und Dubovi, E. J.,** 1990b: Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 590-596.
- Coria, M. F. and McClurkin, A. W.,** 1978: Specific immune tolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 449-451.

- Cornish, T. E., van Olphen, A. L., Cavender, J. L., Edwards, J. M., Jaeger, P. T., Vieyra, L. L., Woodard, L. F., Miller, D. R. und O'Toole, D., 2005:** Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 110-117.
- Cortese, V. S., Grooms, D. L., Ellis, J., Bolin, S. R., Ridpath, J. F. und Brock, K. V., 1998:** Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1409-1413.
- Da Silva, N., Zardoya, R., Santurde, G., Solana, A. und Castro, J. M., 1995:** Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen. *J. Virol. Methods* 55, 209-218.
- Deng, R. und Brock, K. V., 1992:** Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology* 191, 867-879.
- Deng, R. und Brock, K. V., 1993:** 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res.* 21, 1949-1957.
- Deregt, D., Dubovi, E. J., Jolley, M. E., Nguyen, P., Burton, K. M. und Gilbert, S. A., 2005:** Mapping of two antigenic domains on the NS3 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 108, 13-22.
- Deregt, D., Masri, S. A., Cho, H. J. und Bielefeldt Ohmann H., 1990.** Monoclonal antibodies to the p80/125 gp53 proteins of bovine viral diarrhoea virus: their potential use as diagnostic reagents. *Can. J. Vet. Res.* 54, 343-348.
- Done, J. T., Terlecki, S., Richardson, C., Harkness, J. W., Sands, J. J., Patterson, D. S., Sweasey, D., Shaw, I. G., Winkler, C. E. und Duffell, S. J., 1980:** Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet. Rec.* 106, 473-479.
- Donis, R. O., 1995:** Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11, 393-423.
- Donis, R. O., Corapi, W. und Dubovi, E. J., 1988:** Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 69, 77-86.
- Donis, R. O., Corapi, W. V. und Dubovi, E. J., 1991:** Bovine viral diarrhoea virus proteins and their antigenic analyses. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 29-40.

- Donis, R. O. und Dubovi, E. J., 1987a:** Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus.  
Virology 158, 168-173.
- Donis, R. O. und Dubovi, E. J., 1987b:** Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes.  
Am. J. Vet. Res. 48, 1549-1554.
- Drew, T. W., Yapp, F. und Paton, D. J., 1999:** The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR.  
Vet. Microbiol. 64, 145-154.
- Duffell, S. J. and Harkness, J. W., 1985:** Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle.  
Vet. Rec. 117, 240-245.
- Dünser, M., Altmann, M., Dengg, J., Eichinger, M., Loitsch, A., Revilla-Fernandez, S. und Schweighardt, H., 2005:** Nachweis einer persistierenden Infektion des Genitaltraktes mit dem Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV) bei einem nicht immuntoleranten Besamungstier.  
Vet. Med. Austria 92, 1-6.
- Easton, L. A., Vilcek, S. und Nettleton, P. F., 1994:** Evaluation of a 'one tube' reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of ruminant pestiviruses.  
J. Virol. Methods 50, 343-348.
- Edwards, S., Moennig, V. und Wensvoort, G., 1991:** The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses.  
Vet. Microbiol. 29, 101-108.
- Edwards, S. und Paton, D., 1995:** Antigenic differences among pestiviruses.  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 563-577.
- Edwards, S., Sands, J. J. und Harkness, J. W., 1988:** The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain.  
Arch. Virol. 102, 197-206.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rümenapf, T. und Thiel, H. J., 1996:** Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7.  
J. Virol. 70, 4131-4135.
- Ellis, J. A., Martin, K., Norman, G. R. und Haines, D. M., 1995:** Comparison of detection methods for bovine viral diarrhoea virus in bovine abortions and neonatal death.  
J. Vet. Diagn. Invest. 7, 433-436.

- Ellis, J. A., West, K. H., Cortese, V. S., Myers, S. L., Carman, S., Martin, K. M. und Haines, D. M.,** 1998: Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhoea virus-type II.  
Can. J. Vet. Res. 62, 161-169.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. und Ball, L. A.,** 2005: Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses.  
Academic Press, Orlando, USA 981-998.
- Fletcher, S. R., Ali, I. K., Kaminski, A., Digard, P. und Jackson, R. J.,** 2002: The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes.  
RNA 8, 1558-1571.
- Fray, M. D., Mann, G. E., Bleach, E. C., Knight, P. G., Clarke, M. C. und Charleston, B.,** 2002: Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus.  
Reproduction 123, 281-289.
- Fray, M. D., Mann, G. E., Clarke, M. C. und Charleston, B.,** 1999: Bovine viral diarrhoea virus: its effects on estradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow.  
Theriogenology 51, 1533-1546.
- Fray, M. D., Mann, G. E., Clarke, M. C. und Charleston, B.,** 2000: Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow.  
Vet. Microbiol. 77, 185-194.
- Fux, R.,** 2007: Entwicklung und Prüfung von Verfahren zum Nachweis des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe in getrockneten Ohrgewebeprobe mittels Antigen-ELISA und real time RT-PCR.  
Diss. Vet. Med., LMU München
- Gaede, W., Gehrman, B. und Korber, R.,** 2003: BVD-Virämikereliminierung: Effektives Herdensingreening durch Kombination von RT-PCR und Antigen-ELISA in Blut- und Milchproben.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 116, 234-239.
- Gaede, W., Reiting, R., Schirrmeier, H., Depner, K. R. und Beer, M.,** 2005: Nachweis und Spezies-spezifische Differenzierung von Pestiviren mit der real time RT-PCR.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 118, 113-120.
- Gillespie, J. H., Baker, J. A. und McEntee, K.,** 1960: A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus.  
Cornell Vet. 50, 73-79.
- Gillespie, J. H., Madin, S. H. und Darby, N. B., Jr.,** 1963: Studies on virus diarrhoea virus of cattle, with special reference to its growth in tissue culture and its ether susceptibility.  
Cornell Vet. 53, 276-282.

- Gottschalk, E. E., Greiser-Wilke, I., Frey, H. R., Liess, B. und Moennig, V.,** 1992: An antigen capture test for the detection of cattle viremic with bovine viral diarrhoea virus--a comparison with BVD virus isolation from buffy coat cells in bovine kidney cells.  
Zentralbl. Veterinärmed. B 39, 467-472.
- Graham, D. A., McLaren, I. E. und German, A.,** 1998: Evaluation of the suitability of a commercial bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA for diagnostic testing.  
Vet. J. 156, 149-154.
- Grassmann, C. W., Isken, O. und Behrens, S. E.,** 1999: Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study.  
J. Virol. 73, 9196-9205.
- Gray, E. W. und Nettleton, P. F.,** 1987: The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses.  
J. Gen. Virol. 68, 2339-2346.
- Greiser-Wilke, I., Haas, L., Dittmar, K., Liess, B. und Moennig, V.,** 1993: RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains and isolates in vitro and in vivo.  
Virology 193, 977-980.
- Grooms, D. L.,** 2004: Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus.  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 20, 5-19.
- Grooms, D. L., Brock, K. V. und Ward, L. A.,** 1998: Detection of bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus.  
J. Vet. Diagn. Invest. 10, 125-129.
- Grooms, D. L., Kaiser, L., Walz, P. H., and Baker, J. C.,** 2001: Study of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus that lack detectable virus in serum. J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 629-631.
- Grooms, D. L. und Keilen, E. D.,** 2002: Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples.  
Clin. Diagn. Lab Immunol. 9, 898-900.
- Gu, B., Liu, C., Lin-Goerke, J., Maley, D. R., Gutshall, L. L., Feltenberger, C. A. und Del Vecchio, A. M.,** 2000: The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication.  
J. Virol. 74, 1794-1800.
- Haines, D. M., Clark, E. G. und Dubovi, E. J.,** 1992: Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.  
Vet. Pathol. 29, 27-32.

- Harasawa, R.**, 1996: Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5'-untranslated region. *Acta Virol.* 40, 49-54.
- Harkness, J. W., Sands, J. J. und Richards, M. S.**, 1978: Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales. *Res. Vet. Sci.* 24, 98-103.
- Hilbe, M., Stalder, H., Peterhans, E., Haessig, M., Nussbaumer, M., Egli, C., Schelp, C., Zlinszky, K., and Ehrensperger, F.**, 2007: Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 28-34.
- Hoffmann, B., Depner, K., Schirrmeier, H. und Beer, M.**, 2006: A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J. Virol. Methods* 136, 200-209.
- Houe, H.**, 1995: Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11, 521-547.
- Houe, H.**, 1999: Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 64, 89-107.
- Howard, C. J.**, 1990: Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech.* 9, 95-103.
- Hulst, M. M. und Moormann, R. J.**, 1997: Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J. Gen. Virol.* 78, 2779-2787.
- Hyndman, L., Vilcek, S., Conner, J. und Nettleton, P. F.**, 1998: A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *J. Virol. Methods* 71, 69-76.
- Jackova, A., Novackova, M., Pelletier, C., Audeval, C., Gueneau, E., Haffar, A., Petit, E., Rehby, L. und Vilcek, S.**, 2008: The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France. *Vet. Res. Commun.* 32, 7-11.
- Juntti, N., Larsson, B. und Fossum, C.**, 1987: The use of monoclonal antibodies in enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 34, 356-363.
- Kirkland, P. D., Richards, S. G., Rothwell, J. T. und Stanley, D. F.**, 1991: Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 128, 587-590.

- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R. und Thiel, H. J.,** 1995: Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J. Virol.* 69, 6479-6486.
- Kramps, J. A., Van Maanen, C., van de Wetering G., Stienstra, G., Quak, S., Brinkhof, J., Ronsholt, L., und Nylin, B.,** 1999: A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet. Microbiol.* 64, 135-144.
- Kühne, S., Schroeder, C., Holmquist, G., Wolf, G., Horner, S., Brem, G., und Ballagi, A.,** 2005: Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle--testing tissue samples derived from ear tagging using an Erns capture ELISA. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 272-277.
- Kummerer, B. M. und Meyers, G.,** 2000: Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of Bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J. Virol.* 74, 390-400.
- Lackner, T., Müller, A., Pankraz, A., Becher, P., Thiel, H. J., Gorbalenya, A. E., und Tautz, N.,** 2004: Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* 78, 10765-10775.
- Le, S. Y., Liu, W. M., und Maizel, J. V., Jr.,** 1998: Phylogenetic evidence for the improved RNA higher-order structure in internal ribosome entry sequences of HCV and pestiviruses. *Virus Genes* 17, 279-295.
- Letellier, C., Kerkhofs, P., Wellemans, G., und Vanopdenbosch, E.,** 1999: Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet. Microbiol.* 64, 155-167.
- Liebler, E., Johannsen, U., und Pohlenz, J.,** 1995: Die hämorrhagische Verlaufsform der akuten Bovinen Virusdiarrhö: Literaturübersicht und Fallbericht. *Tierärztl. Prax.* 23, 18-25.
- Liebler-Tenorio, E.,** 2005: Pathogenesis. In: *Bovine Viral Diarrhea Virus - Diagnosis, management and control.* Goyal, S.M. und Ridpath, J.F., eds., Iowa, Blackwell Publishing, 121-143.
- Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. E., und Neill, J. D.,** 2002: Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhea virus type 2 in calves. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1575-1584.

- Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. E., und Neill, J. D., 2004:** Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus.  
J. Vet. Diagn. Invest. 16, 388-396.
- Liess, B., Orban, S., Frey, H. R., Trautwein, G., Wiefel, W., und Blindow, H., 1984:** Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation).  
Zentralbl. Veterinärmed. B 31, 669-681.
- Liess, B., Orban, S., Frey, H. R., and Trautwein, G., 1985:** Bedeutung der Immuntoleranz für die Pathogenese der bovinen Virusdiarrhoe.  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 94, 585-587.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., und Nitsche, A., 2002:** Real-time PCR in virology.  
Nucleic Acids Res. 30, 1292-1305.
- Marshall, D. J., Moxley, R. A., und Kelling, C. L., 1996:** Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhea virus.  
Vet. Pathol. 33, 311-318.
- Mayr, A., Bachmann, P. A., Bilbrack, B., und Wittmann, G., 1977:** Virologische Arbeitsmethoden Band II. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- McClurkin, A. W., Coria, M. F., und Cutlip, R. C., 1979:** Reproductive performance of apparently healthy cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 174, 1116-1119.
- McClurkin, A. W., Littledike, E. T., Cutlip, R. C., Frank, G. H., Coria, M. F., und Bolin, S. R., 1984:** Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus.  
Can. J. Comp Med 48, 156-161.
- McGoldrick, A., Bensaude, E., Ibata, G., Sharp, G., und Paton, D. J., 1999:** Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes.  
J. Virol. Methods 79, 85-95.
- McGowan, M. R., Kirkland, P. D., Richards, S. G., und Littlejohns, I. R., 1993:** Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination.  
Vet. Rec. 133, 39-43.
- Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E. J., und Thiel, H. J., 1991:** Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences.  
Virology 180, 602-616.

- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E. J., Collett, M. S., und Thiel, H. J.,** 1992: Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191, 368-386.
- Meyling, A. und Jensen, A. M.,** 1988: Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. *Vet. Microbiol.* 17, 97-105.
- Mignon, B., Dubuisson, J., Baranowski, E., Koromyslov, I., Ernst, E., Boulanger, D., Waxweiler, S., und Pastoret, P. P.,** 1991: A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Methods* 35, 177-188.
- Moen, A., Sol, J., and Sampimon, O.,** 2005: Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. *Prev. Vet. Med* 72, 93-98.
- Moerman, A., Straver, P. J., de Jong, M. C., Quak, J., Baanvinger, T., und Van Oirschot, J. T.,** 1994: Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Vet. Q.* 16, 115-119.
- Müller-Doblies, D., Arquint, A., Schaller, P., Heegaard, P. M., Hilbe, M., Albin, S., Abril, C., Tobler, K., Ehrensperger, F., Peterhans, E., Ackermann, M., und Metzler, A.,** 2004: Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 11, 302-312.
- Nagai, M., Hayashi, M., Itou, M., Fukutomi, T., Akashi, H., Kida, H., und Sakoda, Y.,** 2008: Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes* 36, 135-139.
- Niskanen, R.,** 1993: Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.* 133, 341-344.
- Niskanen, R., Alenius, S., Larsson, B., und Jacobsson, S. O.,** 1991: Determination of level of antibodies to bovine virus diarrhoea virus (BVDV) in bulk tank milk as a tool in the diagnosis and prophylaxis of BVDV infections in dairy herds. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 245-251.
- Niskanen, R., Alenius, S., Larsson, B., und Juntti, N.,** 1989: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 36, 113-118.
- Niskanen, R., Lindberg, A., Larsson, B., und Alenius, S.,** 2000: Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers. *Acta Vet. Scand.* 41, 93-99.

- Niskanen, R., Alenius, S., Belak, K., Baule, C., Belak, S., Voges, H., and Gustafsson, H.,** 2002: Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod. Domest. Anim* 37, 171-175.
- Njaa, B. L., Clark, E. G., Janzen, E., Ellis, J. A., and Haines, D. M.,** 2000: Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 393-399.
- Ohmann, H. B.,** 1990: Electron microscopy of bovine virus diarrhoea virus. *Rev. Sci. Tech.* 9, 61-73.
- Olafson, P., MaCallum, A., and Fox, F.,** 1946: An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36, 205-213.
- Palfi, V., Houe, H., and Philipsen, J.,** 1993: Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. *Acta Vet. Scand.* 34, 105-107.
- Paton, D. J., Ibata, G., Edwards, S., and Wensvoort, G.,** 1991a: An ELISA detecting antibody to conserved pestivirus epitopes. *J. Virol. Methods* 31, 315-324.
- Paton, D. J., Sands, J. J., and Roehle, P. M.,** 1991b: BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 47-54.
- Pellerin, C., van den Hurk J., Lecomte, J., and Tussen, P.,** 1994: Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.
- Pfeffer, M., Freyburg, M. V., Kaaden, O. R., and Beer, M.,** 2000: A universal 'one-tube' RT-PCR protocol for amplifying isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Res. Commun.* 24, 491-503.
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A., and Collett, M. S.,** 1995: Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206, 750-754.
- Potgieter, L. N., McCracken, M. D., Hopkins, F. M., and Walker, R. D.,** 1984: Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 45, 687-690.

- Qvist, P., Aasted, B., Bloch, B., Meyling, A., Ronsholt, L., und Houe, H., 1990:** Flow cytometric detection of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle.  
Can. J. Vet. Res. 54, 469-472.
- Qvist, P., Houe, H., Aasted, B., und Meyling, A., 1991:** Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus.  
J. Clin. Microbiol. 29, 660-661.
- Radwan, G. S., Brock, K. V., Hogan, J. S., und Smith, K. L., 1995:** Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus.  
Vet. Microbiol. 44, 77-91.
- Rebhun, W. C., French, T. W., Perdrizet, J. A., Dubovi, E. J., Dill, S. G., und Karcher, L. F., 1989:** Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhoea infection in cattle.  
J. Vet. Intern. Med. 3, 42-46.
- Reggiardo, C. und Kaeberle, M. L., 1981:** Detection of bacteremia in cattle inoculated with bovine viral diarrhoea virus.  
Am. J. Vet. Res. 42, 218-221.
- Renshaw, R. W., Ray, R., und Dubovi, E. J., 2000:** Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk tank samples.  
J. Vet. Diagn. Invest. 12, 184-186.
- Ridpath, J. F. und Bolin, S. R., 1998:** Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR.  
Mol. Cell Probes 12, 101-106.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., und Dubovi, E. J., 1994:** Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes.  
Virology 205, 66-74.
- Ridpath, J. F., Hietala, S. K., Sorden, S., und Neill, J. D., 2002:** Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhoea infections.  
J. Vet. Diagn. Invest. 14, 303-307.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H., und Thiel, H. J., 1993:** Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses.  
J. Virol. 67, 3288-3294.
- Saliki, J. T. und Dubovi, E. J., 2004.** Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections.  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 20, 69-83.

- Saliki, J. T., Huchzermeier, R., und Dubovi, E. J., 2000:** Evaluation of a new sandwich ELISA kit that uses serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 358-363.
- Sandvik, T., 1999.** Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 64, 123-134.
- Sandvik, T., 2005:** Selection und use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev. Vet. Med.* 72, 3-16.
- Sandvik, T., Fredriksen, B., und Loken, T., 1997:** Level of viral antigen in blood leucocytes from cattle acutely infected with bovine viral diarrhoea virus. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 44, 583-590.
- Sandvik, T. und Krogsrud, J., 1995:** Evaluation of an antigen-capture ELISA for detection of bovine viral diarrhoea virus in cattle blood samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 65-71.
- Scheibner, H., Frey, H. R., Eicken, K., Meyer, H., und Greiser-Wilke, I., 2000:** Nachweis des Genoms des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) mittels Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR): Vergleich von Methoden zur Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) aus klinischen Probenmaterialien. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 107, 431-437.
- Schelp, C. und Greiser-Wilke, I., 2003:** BVD-Diagnostik: Ein Überblick. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 116, 227-233.
- Shannon, A. D., Richards, S. G., Kirkland, P. D., und Moyle, A., 1991:** An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J. Virol. Methods* 34, 1-12.
- Ssentongo, Y. K., Johnson, R. H., und Smith, J. R., 1980:** Association of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus with ovaritis in cattle. *Aust. Vet. J.* 56, 272-273.
- Sullivan, D. G. und Akkina, R. K., 1995:** A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses. *Virus Res.* 38, 231-239.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., und Thiel, H. J., 1997:** Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* 71, 5415-5422.
- Tautz, N., Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S., und Thiel, H. J., 1999:** Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J. Virol.* 73, 9422-9432.

- Thiel, H. J., Stark, R., Weiland, E., Rügenapf, T., und Meyers, G.,** 1991: Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus.  
*J. Virol.* 65, 4705-4712.
- Thierauf, P.,** 1993: Untersuchungen zur Epidemiologie, Diagnose und Immunprophylaxe von BVD/MD-Virusinfektionen in Milchviehzuchtbeständen.  
Diss. Vet. Med., LMU München
- Thür, B., Hilbe, M., Strasser, M., und Ehrensperger, F.,** 1997: Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death.  
*Am. J. Vet. Res.* 58, 1371-1375.
- Thür, B., Zlinszky, K., und Ehrensperger, F.,** 1996: Immunhistologie als zuverlässige und effiziente Methode für die Diagnose von BVDV-Infektionen.  
*Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 138, 476-482.
- Traven, M., Alenius, S., Fossum, C., und Larsson, B.,** 1991: Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf.  
*Zentralbl. Veterinärmed. B* 38, 453-462.
- Van Rijn, P. A., van Gennip, H. G., Leendertse, C. H., Brusckke, C. J., Paton, D. J., Moormann, R. J., und Van Oirschot, J. T.,** 1997: Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2.  
*Virology* 237, 337-348.
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., und Paton, D. J.,** 2005: Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology.  
*Prev. Vet. Med.* 72, 31-35.
- Vilcek, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P., und Paton, D. J.,** 1994: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis.  
*Arch. Virol.* 136, 309-323.
- Vilcek, S., Nettleton, P. F., Paton, D. J., und Belak, S.,** 1997: Molecular characterization of ovine pestiviruses.  
*J. Gen. Virol.* 78, 725-735.
- Virakul, P., Fahning, M. L., Joo, H. S., und Zemjanis, R.,** 1988: Fertility of cows challenged with a cytopathic strain of Bovine Viral Diarrhea virus during an outbreak of spontaneous infection with a noncytopathic strain.  
*Theriogenology* 29, 441-449.
- Voges, H., Horner, G. W., Rowe, S., und Wellenberg, G. J.,** 1998: Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull.  
*Vet. Microbiol.* 61, 165-175.

- Ward, A. C. und Kaeberle, M. L.,** 1984: Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies. *Am. J. Vet. Res.* 45, 165-170.
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., und Thiel, H. J.,** 1992: A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* 66, 3677-3682.
- Weinstock, D., Bhudevi, B., und Castro, A. E.,** 2001: Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *J. Clin. Microbiol.* 39, 343-346.
- Westenbrink, F., Middel, W. G., Straver, P. J., und de Leeuw, P. W.,** 1986: A blocking enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for bovine virus diarrhoea virus serology. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 33, 354-361.
- Wilhelmsen, C. L., Bolin, S. R., Ridpath, J. F., Cheville, N. F., und Kluge, J. P.,** 1990: Experimental primary postnatal bovine viral diarrhoea viral infections in six-month-old calves. *Vet. Pathol.* 27, 235-243.
- Wilhelmsen, C. L., Bolin, S. R., Ridpath, J. F., Cheville, N. F., und Kluge, J. P.,** 1991: Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* 52, 269-275.
- Wiskerchen, M., Belzer, S. K., und Collett, M. S.,** 1991: Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhoea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* 65, 4508-4514.
- Wolf, G.,** 2005: Diagnostik des BVDV-PI-Kalbes mit Blutproben und mit Ohrstanzen. Proc. 2. Riemser Diagnostiktage.
- Wolfmeyer, A., Wolf, G., Beer, M., Strube, W., Hehnen, H. R., Schmeer, N., und Kaaden, O. R.,** 1997: Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142, 2049-2057.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S., und Rice, C. M.,** 1997: Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* 71, 5312-5322.
- Xue, W. und Minocha, H. C.,** 1996: Identification of bovine viral diarrhoea virus receptor in different cell types. *Vet. Microbiol.* 49, 67-79.

- Yates, W. D.**, 1982: A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle.  
Can. J. Comp Med. 46, 225-263.
- Yu, H., Grassmann, C. W., und Behrens, S. E.**, 1999: Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication.  
J. Virol. 73, 3638-3648.
- Zhang, G., Aldridge, S., Clarke, M. C., und McCauley, J. W.**, 1996: Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis.  
J. Gen. Virol. 77, 1677-1681.
- Zimmer, G. M., Van Maanen, C., De, Goey, I, Brinkhof, J., und Wentink, G. H.**, 2004: The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples.  
Vet. Microbiol. 100, 145-149.

## 8. Anhang

### 8.1 Materialliste

#### 8.1.1 Geräte und Laborhilfsmittel

- Analysenwaage, elektronisch, Typ 1219 MP, Sartorius GmbH, Göttingen;
- Analysenwaage, elektronisch, Typ R160P, Sartorius GmbH, Göttingen;
- Biopsy Punch, Ø 6mm, KRUISE, Marslev, Dänemark;
- Brutschrank Memmert Universalschrank, Typ BVM 50, Memmert, Schwabach;
- Cell DYN 3500 Analysegerät, Abbott Laboratories, Illinois, USA;
- EDTA-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht;
- Einmalrasierer, Wilkinson Sword GmbH, Solingen;
- Einmalskalpell, steril, Aesculap AG&Co. KG, Tuttlingen;
- Einwegkanülen Neolus (Nr. 1 Luer 0,9x40mm) Terumo<sup>®</sup>, Leuven, Belgien;
- ELISA-Prozessor BEP II, Dade Behring, Schwalbach;
- Hautklammergerät LeukoClip\*SD, Smith & Nephew Ltd., Hull, England;
- Laborglaswaren, Schott Glas, Mainz;
- Latex Untersuchungshandschuhe Multi-Perfect, Multi-Com Goods, Ahrensburg;
- Labor-Schwingmühle MM300, Retsch GmbH & Co. KG, Haan;
- Messpipetten aus Glas (1ml, 5ml und 10ml), Brand, Wertheim;
- Mikro-Schraubröhre (2ml), Sarstedt, Nümbrecht;
- Mikrotiterplatte, Rundboden, Sarstedt, Nümbrecht;
- MUTO-Spritze (30ml) mit Sprühaufsatz, H. Hauptner & R. Herberholz GmbH&Co.KG, Solingen;
- Mx3005P<sup>™</sup> QPCR System, Stratagene, Amsterdam, Niederlande;
- MxPro<sup>™</sup> QPCR Software, Stratagene, Amsterdam, Niederlande;
- Optical Tube, 8x Stripe Otb 120, Stratagene, Amsterdam, Niederlande;
- Optical Cap, 8x Stripe Otb 120, Stratagene, Amsterdam, Niederlande;
- Pipetten:
  - pipetman (100-1000µl), Abimed, Langenfeld;
  - Research (0,5-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 100-1000µl), Eppendorf, Köln;
  - SL-Pette (25-200µl), Mehrkanalpipette, Süd-Laborbedarf, Gauting;
- Pipettenspitzen:
  - Pipettenspitzen (200µl, 1000µl), Sarstedt, Nümbrecht;

- Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips (20µl, 100µl, 1000µl), Sarstedt, Nümbrecht;
- Pipettierhilfe: Accu-Jet<sup>®</sup>, Brand, Wertheim;
- Photometer: Sunrise Touchscreen, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim;
- Photometer-Software: Magellan-Software, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim;
- Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml), Nunc, Roskilde, Dänemark;
- Reagent Reservoir, 50ml, Corning Inc., Corning, USA;
- Reagiergefäß, 1,5ml, Sarstedt, Nümbrecht;
- Reagiergefäß, 2ml, PP, Sarstedt, Nümbrecht;
- Serum-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht;
- Stahlkugeln, 5mm, TIS Technischer Industrie-Service GmbH, Gauting;
- Sterile Zellkulturplastikwaren:
  - Zellkulturflaschen (80cm<sup>2</sup>, 175cm<sup>2</sup>), Nunc, Roskilde, Dänemark;
  - 24-Loch-Zellkulturplatten, Nunc, Roskilde, Dänemark;
  - 96-Loch-Zellkulturplatten, Nunc, Roskilde, Dänemark;
- Sterile Wattetupfer, BioMérieux®SA, Marcy l'Etoile, France;
- Vortex-Genie, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz;
- Zentrifugen:
  - Capsulefuge PMC-060, Poly Labo, Straßburg, Frankreich;
  - Centrifuge 5417R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf;
  - Centrifuge 5810R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf;
  - Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Osterode;
  - UEC-Force I, Uniequip Laborgerätebau, Martinsried;
  - Zentrifuge 3-16, Sigma, Osterode;
  - Zentrifuge Z233 MK-2, Hermle AG, Gosheim;
- Zytofluorometer
  - FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg;
  - Software Cell Quest Pro, Becton Dickinson, Heidelberg;

### 8.1.2 Zellen

- KOP-R Zelllinie (Rind, Ösopharynxgewebe), ZBV Insel Riems;

### 8.1.3 Kommerzielle Kits

- cador BVDV Type 1/2 RT-PCR, Qiagen, Hilden;
- Ceditest<sup>®</sup> BVDV, Cedi Diagnostics B. V., Lelystad, Niederlande;
- HerdChek BVDV Antigen/Serum Plus, Idexx Laboratories, Wörrstadt;
- High Pure Viral RNA Kit, Roche Diagnostics, Penzberg;
- QuantiTect<sup>™</sup> Probe RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden;
- RNeasy<sup>®</sup> Fibrous Tissue Mini Kit, Qiagen, Hilden;
- Svanovir<sup>®</sup> (BVDV-Ab), Svanova Biotech AB, Uppsala, Schweden;

### 8.1.4 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

- Antibiotika/Antimykotika (dem Zellkulturmedium und Transportpuffer zugesetzt)
  - Penicillin G, Grünenthal GmbH, Aachen;
  - Streptomycin (Strepto-Hefa), PHARMA GmbH, Wernigerode;
  - Amphotericin B, FAGRON GmbH & Co.KG, Barsbüttel;
  - Polymyxin B, OTC Pharma GmbH, Bönen;
- *AlexaFluor*<sup>®</sup>488 Invitrogen, USA;
- Digitonin, Fluka, Buchs, Schweiz;
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Merck, Darmstadt;
- FACS-Puffer, pH 7,4
  - 10mM Hepes
  - 10mM EDTA
  - 2% (v/v) natives Rinderserum
  - 0,1% (w/v) Natriumazid, Sigma-Aldrich, Steinheim;
  - ad 1l PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>
- Hautdesinfektionsmittel, Heiland, Hamburg;
- Hepes (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaciny]-Ethansulfonsäure), Sigma-Aldrich, Steinheim;
- Hostacain (Lokalanästhetikum), Höchst, Unterschleißheim;
- KCl (Kaliumchlorid), Sigma-Aldrich, Steinheim;
- KHCO<sub>3</sub> (Kaliumhydrogencarbonat), Merck, Darmstadt;
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumphosphat), Merck, Darmstadt;

- Lysispuffer
  - 8,29g NH<sub>4</sub>Cl
  - 1,0g KHCO<sub>3</sub>
  - 1mM EDTA
  - ad 1l A. demin, pH 7,4
- *Minimum-Essential-Medium Eagle*(MEM), Sigma-Aldrich, Steinheim;
  - NaHCO (8,8%ig)
  - 300000E/l Penicillin
  - 200mg/l Streptomycin
- Molekularsieb 0,3nm, 2mm Perlen, Merck, Darmstadt;
- Monoklonale Antikörperkombination WB103/105, C·C·Pro GmbH, Neustadt/W.;
- NaCl (Natriumchlorid), Merck, Darmstadt;
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Natriumhydrogenphosphat), Merck, Darmstadt;
- NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat), Merck, Darmstadt;
- NH<sub>4</sub>Cl (Ammoniumchlorid) Merck, Darmstadt;
- Nichtessentielle Aminosäuren (*Non-Essential Amino Acids*) 100x, Biochrom, Berlin;
- PBS (*phosphate buffered saline*) ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>
  - 8g NaCl
  - 0,2g KCl
  - 2,37g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O
  - 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - ad 1l A.demin, pH 7,4
- Paraformaldehyd (PFA), Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe;
- Primer und Sonden für *real time* PCR, Operon Biotechnologies GmbH, Köln;
- Propidiumjodid, Sigma-Aldrich, Steinheim;
- Saline (10x)
  - 8g NaCl
  - 0,2g KCl
  - 1,15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O
  - 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 1g Glucose
  - 10ml Phenolrot (0,1%)
  - ad 1l A. demin, pH 7,4

- STV-Lösung (Saline-Trypsin-Versene-Lösung)
  - 100ml Saline
  - 50ml Trypsin (1,25%)
  - 25ml Versene (1%)
  - ad 1l A. demin, pH 7,4
- Transportpuffer
  - 300000E Penicillin
  - 200mg Streptomycin
  - 200mg Polymycin B
  - 500µg Amphotericin B
  - 100ml natives Rinderserum
  - ad 1l PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- Triton X100, Sigma-Aldrich, Steinheim;
- Trypsin (1:250, bovine pancreas), Serva, Heidelberg;
- Versene (Ethyldiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz), Serva, Heidelberg;

## 8.2 Verwendete Abkürzungen

### A

Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
A. demin	<i>Aqua demineralisata</i>

### B

BDV	Virus der Border Disease
BVD	Bovine Virusdiarrhoe
BVDV	Virus der Bovinen Virusdiarrhoe
bzw.	beziehungsweise

### C

ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CSFV	<i>classical swine fever virus</i> (Virus der Klassischen Schweinepest)
Ct	<i>threshold cycle</i>
°C	Grad Celsius

### D

d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure

### E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
E <sup>rns</sup>	<i>envelope, ribonuclease, soluble</i>

### F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
------	--

### G

g	Gramm
---	-------

**H**

h Stunde(n)

Hz Hertz

**I**

IHC Immunhistochemie

**L**

l Liter

log Logarithmus

**M**

mAK monoklonaler Antikörper

MD *Mucosal Disease*

mg Milligramm

min Minute(n)

ml Milliliter

mm Millimeter

µl Mikroliter

**N**

n Anzahl

NS Nichtstrukturprotein

nzp nicht zytopathogen

**O**

OD *optical density* (optische Dichte)

**P**

PBS *phosphate buffered saline* (Phosphat-gepufferte Saline)

PCR polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

pH *potentia Hydrogenium*

PI persistent BVDV infiziert

p. inf. post infectionem

p. n. post natum

**R**

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minutes</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription

**S**

sec	Sekunde(n)
-----	------------

**T**

Tab.	Tabelle
------	---------

**U**

UTR	<i>untranslated region</i>
-----	----------------------------

**V**

vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenanteil pro Volumenanteil)

**W**

w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumenanteil)
-----	--

**Z**

zp	zytopathogen
z. B.	zum Beispiel

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Erwin Märtlbauer gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme im Institut, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Vertretung dieser Arbeit vor dem Promotionsausschuss.

Herrn Dr. Georg Wolf gilt mein besonderer Dank für das Vertrauen, die fachliche Betreuung und wertvollen Anregungen sowie die jederzeit hilfreiche und freundschaftliche Unterstützung.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. Robert Fux für die Anleitung in molekularbiologischen und virologischen Arbeitstechniken. Für seine liebenswerte und geduldige Unterstützung, so manches aufbauende Wort und seine Freundschaft möchte ich mich vielfach bei ihm bedanken.

Astrid Freudenstein und Gudrun Schulz danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und Hilfe im Labor. Vielen Dank auch allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Den Tierpflegern am Oberwiesenfeld gilt mein Dank für die kompetente Betreuung und Versorgung meiner Tiere und die Unterstützung bei dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuch.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Hellwig und Herrn Dr. Rudolf Birlbauer für die Möglichkeit zur Durchführung von Untersuchungen und die Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim.

Frau Theresa Dittel und Frau Gabriele Stelzer vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit danke ich herzlich für die allzeit hilfsbereite und freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Meinem Mann David und meinen Freunden Ulli und Gregor danke ich von ganzem Herzen, denn ohne ihre Hilfe und Zuversicht wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.