

Aus der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung
Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer: Prof. Dr. W. Klee
im Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von: PD Dr. A. Neubauer-Juric
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Untersuchungen zur Prävalenz von Infektionen mit dem Ovinen Herpesvirus-2 (OvHV-2) in 20 Mischbetrieben mit Rindern und Schafen in Bayern

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

von
Birgit Sabine Rohleder
aus Nürnberg

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Klee

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Werckenthin

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Das Schaf-assoziierte Bösartige Katarrhalfieber	3
1.1.	Vorkommen und Bedeutung.....	3
1.2.	Ätiologie.....	4
1.3.	Pathogenese.....	5
1.4.	Klinische Symptomatik.....	7
2.	Subklinische OvHV-2-Infektionen	10
3.	Epidemiologie von OvHV-2-Infektionen	11
3.1.	OvHV-2-Infektionen bei Rindern.....	11
3.2.	OvHV-2-Infektionen bei Schafen.....	13
4.	Nachweis einer OvHV-2-Infektion	15
4.1.	Indirekte Nachweisverfahren.....	15
4.2.	Direkte Nachweisverfahren.....	16
4.2.1.	Seminested PCR.....	17
4.2.2.	Quantitative real-time PCR.....	17
5.	OvHV-2-positive Zelllinien	19
III.	MATERIAL UND METHODEN	21
1.	Labormaterialien	21
1.1.	Puffer, Lösungen und Reagenzien.....	21
1.2.	Primer und Sonden.....	23
1.3.	Plasmid.....	24
1.4.	Geräte und Laborhilfsmittel.....	24
1.5.	Software.....	26
2.	Beprobungsgebiet	27
3.	In die Untersuchungen einbezogene Betriebe	28

3.1.	Betriebe der Gruppe 1	28
3.2.	Betriebe der Gruppe 2	29
4.	Zeitraum und Umfang der Probennahme.....	30
5.	Stichprobenplanung zur Bestimmung der Prävalenz.....	30
6.	Zusätzliche Proben OvHV-2-infizierter Tiere	31
7.	Durchführung der Probenentnahme	33
7.1.	Blutprobenentnahme	33
7.2.	Entnahme von Nasentupferproben	33
7.3.	Entnahme von Organproben	34
8.	Klinische Untersuchung OvHV-2-infizierter Tiere	34
9.	Erfassung und Auswertung der Daten zu Tieren und Betrieben.....	34
10.	Laboruntersuchungen	36
10.1.	Antikörpernachweis mittels ELISA	36
10.2.	OvHV-2-Genomnachweis	37
10.2.1.	DNA-Isolierung	37
10.2.2.	Seminested PCR.....	38
10.2.3.	Quantifizierung des OvHV-2-Genomgehaltes	40
10.2.3.1.	OvHV-2-spezifische quantitative real-time PCR	41
10.2.3.2.	12s-rRNA-Gen-spezifische quantitative real-time PCR	42
10.3.	Analyse kultivierter OvHV-2-positiver Lymphozyten	44
10.3.1.	Kultivierung OvHV-2-positiver Lymphozyten.....	44
10.3.2.	Untersuchungen zum relativen OvHV-2-Genomgehalt.....	45
10.3.3.	Untersuchung der Stimulierbarkeit kultivierter Lymphozyten durch verschiedene Mitogene	45
IV.	ERGEBNISSE.....	47
1.	Prävalenz von OvHV-2-Infektionen in selektierten bayerischen Betrieben.....	47
1.1.	Prävalenzen von Antikörpern gegen BKF-Erreger bei Rindern und Schafen	47
1.2.	Prävalenzen an OvHV-2-Infektionen bei Rindern und Schafen	54
1.3.	Vergleich der anamnestischen Daten beider Studiengruppen	60

2.	Weiterführende Untersuchungen einzelner OvHV-2-infizierter Rinder und Schafe	63
2.1.	Antikörper- und OvHV-2-Genomnachweis bei einzelnen Rindern und Schafen	63
2.2.	Auswertung der klinischen Untersuchungen einzelner OvHV-2-infizierter Rinder	67
2.3.	Relativer OvHV-2-Genomgehalt in Blut- und Organproben	69
2.3.1.	Vergleich des relativen OvHV-2-Genomgehaltes in Blutproben ausgewählter Rinder und Schafe	69
2.3.2.	Relativer Vergleich des OvHV-2-Genomgehaltes verschiedener Organe eines akut an BKF erkrankten Rindes.....	72
2.4.	Initiale Charakterisierung von <i>in vitro</i> kultivierten Lymphozyten OvHV-2-infizierter Rinder	74
2.4.1.	Entwicklung des relativen OvHV-2-Genomgehaltes der kultivierten Zellen über die Zeit	74
2.4.2.	Stimulierbarkeit kultivierter Lymphozyten durch Mitogene	76
V.	DISKUSSION	79
1.	Bestimmung der Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen	79
1.1.	Vergleich der Seroprävalenzen mit den Ergebnissen des OvHV-2-Genomnachweises.....	79
1.2.	Vergleich der betriebsspezifischen Prävalenzen selektierter bayerischer Mischbetriebe mit internationalen Studien.....	81
1.3.	Prävalenzunterschiede zwischen den zwei Betriebsgruppen	84
2.	Weiterführende Untersuchungen einzelner OvHV-2-infizierter Rinder.....	88
2.1.	Infektionsverlauf bei einem Rind nach überstandener BKF-Erkrankung.....	88
2.2.	Charakterisierung der Infektion einzelner subklinisch OvHV-2-infizierter Rinder	88
2.3.	Vergleich des relativen OvHV-2-Genomgehaltes im Blut und in verschiedenen Organen OvHV-2-infizierter Tiere	92
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	95
VII.	SUMMARY	97

VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	99
IX.	ANHANG	107
1.	Tabellenverzeichnis	107
2.	Abbildungsverzeichnis.....	108
3.	Fragebogen.....	112
4.	Untersuchungskarte	118
X.	DANKSAGUNG	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

12s-rRNA	ribosomale RNA der 12s Untereinheit
A	Adenin
Ak	Antikörper
AIHV-1	Alcelaphines Herpesvirus-1
AIHV-2	Alcelaphines Herpesvirus-2
Aqua demin.	<i>Aqua demineralisata</i> (demineralisiertes Wasser)
bds.	beidseitig
BKF	Bösartiges Katarrhalfieber
BoHV-1	Bovines Herpesvirus-1
BoHV-4	Bovines Herpesvirus-4
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe-Virus
C	Cytosin
Con A	Concanavalin A
CpHV-2	Caprines Herpesvirus-2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Foetales bovines Serum
for	<i>forward primer</i> (Vorwärtsprimer)
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
ggr.	geringgradig
HEX	Hexachloro-6-carboxy-Fluorescein
hgr.	hochgradig
HI-Tier	Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere
HiHV-1	Hippotragines Herpesvirus-1
ICTV	<i>International Commitee on Taxonomy of Viruses</i>
IFAT	Indirekter Fluoreszenz-Antikörper-Test

IgG	Immunglobulin G
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LGLs	<i>large granular lymphocytes</i> (große granuläre Lymphozyten)
li	links
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Lnn.	<i>Lymphonodi</i> (Lymphknoten)
MAK	monoklonaler Antikörper
MCFV	<i>Malignant Catarrhal Fever Virus</i>
MFR	Mittelfranken
mgr.	mittelgradig
MW	Mittelwert
n.n.	nicht nachgewiesen
n.u.	nicht untersucht
NBY	Niederbayern
neg	negativ
NT	Nasentupfermaterial
NTC	<i>no template control</i> (Templat-freie Kontrolle)
o.b.B.	ohne besonderen Befund
OBY	Oberbayern
OFR	Oberfranken
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
OPF	Oberpfalz
OvHV-2	Ovines Herpesvirus 2
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PHA	Phytohämagglutinin
PLZ	Postleitzahl
pos	positiv
PWM	Pokeweed Mitogen
QS	Qualitätssicherung
Rd.	Rind
re	rechts
rev	<i>reverse primer</i> (Rückwärtsprimer)
RuRVs	<i>Ruminant Rhadinoviruses</i> (Rhadinoviren der Wiederkäuer)
SA-BKF	Schaf-assoziiertes Bösartiges Katarrhalfieber
Sf.	Schaf

SH	Schleimhaut
SWB	Schwaben
T	Thymin
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
UFR	Unterfranken
UV	Ultraviolett
vergr.	vergrößert
WTD	<i>White tailed deer</i> (Weißwedelhirsch)
Y	wobble
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Das Bösartige Katarrhalfieber (BKF) ist eine bei Rindern und anderen Ungulaten weltweit verbreitete, lymphoproliferative Erkrankung mit meist tödlichem Verlauf. Man unterscheidet die beiden klassischen Formen, das Gnu-assoziierte BKF, verursacht durch das Alcelaphine Herpesvirus-1 und das Schaf-assoziierte BKF (SA-BKF), hervorgerufen durch das Ovine Herpesvirus-2 (OvHV-2). In den letzten Jahren wurden zudem noch weitere Gammaherpesviren entdeckt, die der BKF-Virusgruppe angehören. In Deutschland sind alle Formen des BKF der Rinder meldepflichtig. In Europa tritt aber vorwiegend das Schaf-assoziierte BKF auf.

Das Ovine Herpesvirus-2 wird natürlicherweise vom Hauptwirt Schaf auf den Fehlwirt Rind übertragen. Daher kommt das SA-BKF insbesondere in Mischbetrieben vor, in denen diese Tierarten gemeinsam gehalten werden. Aus verschiedenen Regionen Europas ist ein sehr hoher Durchseuchungsgrad der Schafherden mit bis zu 100 % infizierten Tieren bekannt. Für Bayern standen zu Beginn der Arbeit noch keine Informationen über Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen bei Schafen oder Rindern zu Verfügung. Es bestand jedoch der Verdacht, dass die Bedeutung der OvHV-2-Infektionen und auch des klinischen BKF der Rinder in Folge mangelnder Daten deutlich unterschätzt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher in 20 bayerischen Mischbetrieben die Prävalenzen der OvHV-2-Infektionen in den jeweiligen Rinder- und Schafbeständen mittels serologischer und molekularbiologischer Methoden bestimmt werden. Eine Einteilung der selektierten Mischbetriebe in zwei Gruppen mit virologisch bestätigten, klinischen BKF-Erkrankungen bei Rindern zwischen Januar 2007 und Dezember 2009 und entsprechend ohne BKF-Fälle in diesem Zeitraum sollte zudem erste Hinweise auf den Einfluss möglicher zusätzlicher betrieblicher Faktoren für das Auftreten von OvHV-2-Infektionen beim Fehlwirt geben.

Ein besonderes Interesse sollte den im Rahmen dieser Untersuchungen diagnostizierten subklinischen Infektionen gelten, da über diese Verlaufsform der OvHV-2-Infektionen des Rindes bisher nur sehr wenig bekannt ist. Durch weiterführende klinische und labordiagnostische Untersuchungen einzelner OvHV-2-infizierter Tiere sollten Informationen über die Mechanismen und den Verlauf der subklinischen Infektionen bei Rindern erarbeitet werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Schaf-assoziierte Bösartige Katarrhalfieber

1.1. Vorkommen und Bedeutung

Das Schaf-assoziierte Bösartige Katarrhalfieber (SA-BKF) ist als eine lymphoproliferative, fieberhafte und meist tödlich verlaufende Infektionskrankheit bei Rindern bereits seit dem 18. Jahrhundert in Europa bekannt (Stöber 2006). Der Erreger dieser Erkrankung ist das Ovine Herpesvirus-2 (OvHV-2), für welches Schafe den Hauptwirt und das Virusreservoir darstellen (Bridgen und Reid 1991; Baxter et al. 1993).

Das SA-BKF ist nicht nur bei europäischen Hausrindern, sondern auch bei Amerikanischen Bisons (Li et al. 2006a) oder exotischen Rinderarten wie dem Gaur (Hänichen et al. 1998) oder dem Wasserbüffel beschrieben (Martucciello et al. 2006). Auch Hirsche (Frölich et al. 1998), Ziegen (Jacobsen et al. 2007) und Schweine (Albini et al. 2003) können an BKF erkranken. Ein OvHV-2-Nachweis, verbunden mit der Erkrankung eines Fohlens, gelang in Brasilien interessanterweise sogar bei Pferden (Costa et al. 2009).

Die Erkrankung tritt weltweit auf. Fallberichte liegen aus Europa, Nord- und Südamerika, Neuseeland, dem Nahen und Mittleren Osten, Indien, Asien und Afrika vor (Wani et al. 2004; Yazici et al. 2006; Kojouri et al. 2009; Russell et al. 2009). Wirtschaftliche Bedeutung erlangt das SA-BKF insbesondere in Ländern mit intensiver Haltung von empfänglichen Tierarten und Schafen, insbesondere in den großen Bisonzuchten in Nordamerika oder bei der Haltung von Gehegewild in Neuseeland (Beatson et al. 1985). Ein zusätzliches Problem vor allem in Tierparks und Zoos stellt die Bedrohung gefährdeter Tierarten wie dem Gaur oder dem in freier Wildbahn bereits ausgestorbenen Davidshirsch durch das SA-BKF dar (Reid et al. 1987; Hänichen et al. 1998).

1.2. Ätiologie

Da bislang keine Anzüchtung des Erregers in Zellkultur gelang, konnte dem infektiösen Agens des SA-BKF vor Einführung der PCR-Diagnostik lediglich eine antigenetische Verwandtschaft zum Alcelaphinen Herpesvirus-1 (AIHV-1) nachgewiesen werden (Rossiter 1983). Die Vermutung, dass es sich dabei ebenfalls um ein Herpesvirus handelt, wurde erst 1990 mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen bekräftigt (Schuller et al. 1990). Zwei Jahre später wurde der Erreger des SA-BKF basierend auf DNA-Homologien mit dem AIHV-1 als Ovine Herpesvirus-2 klassifiziert (Roizmann et al. 1992) und seit 2007 liegt die vollständige Sequenz des Virusgenoms vor (Hart et al. 2007; Taus et al. 2007).

Das Ovine Herpesvirus-2 ist erst seit kurzem dem Genus *Macavirus* in der Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* zugeordnet (Davison et al. 2009). Li et al. (2005) fassten zuvor die mit BKF assoziierten Gammaherpesviren der Wiederkäuer auf Basis ihrer phylogenetischen Beziehungen zu einer Subgruppe mit der Bezeichnung Rhadinoviren der Wiederkäuer Typ 1 zusammen. Diese umfasst die zehn bisher bekannten BKF-Viren (Malignant Catarrhal Fever Viruses, MCFVs, Abb. II.1). Das Kriterium zur Einordnung in die BKF-Virusgruppe stellt die Expression des hoch homologen Antigenepitops 15 A dar. Die von Li et al. vorgeschlagene Eingruppierung entspricht zwar nicht der offiziellen Virustaxonomie, ist aber dennoch hilfreich und übersichtlich für die Kommunikation in Zusammenhang mit diesen Erregern.

Morphologisch handelt es sich bei Gammaherpesviren in ihrer zellfreien Form um 120-200 nm große Virionen mit doppelsträngiger, linearer DNA, ikosaedralem Kapsid und einer Lipidhülle (ICTV 2006). Im Wirt liegt OvHV-2 in zellgebundener Form vor. Virus-DNA wurde vorwiegend in Lymphozyten nachgewiesen, welche somit als Zielzellen des Virus gelten (Baxter et al. 1997; Rosbottom et al. 2002; Thonur et al. 2006).

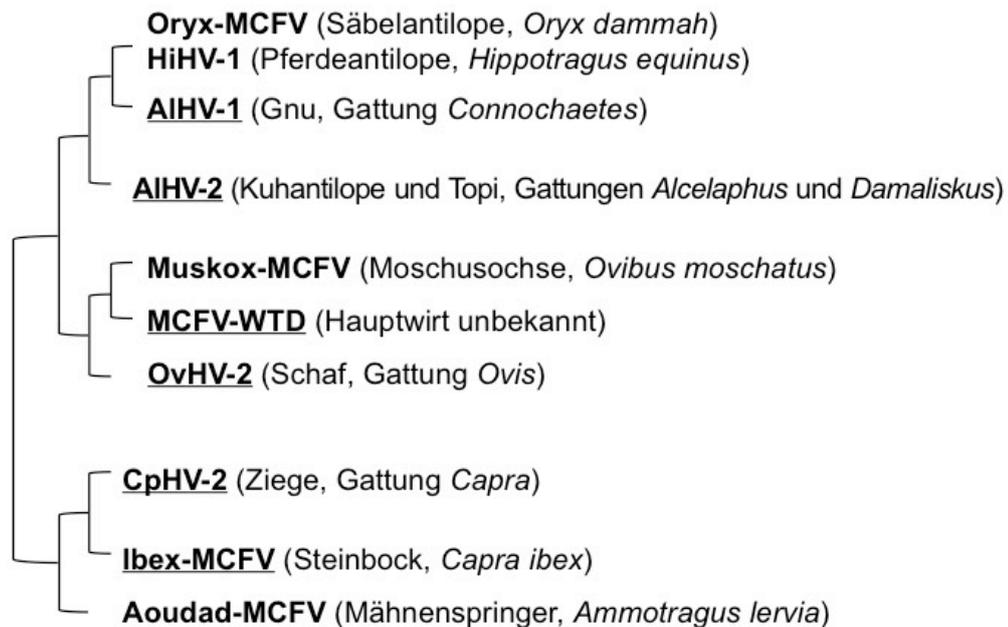


Abb. II.1: Phylogenetische Beziehungen der Viren, die von Li et al. 2005 als Subgruppe Rhadinoviren der Wiederkäuer Typ 1 bezeichnet wurden. Die Verwandtschaftsverhältnisse basieren auf Teilsequenzen der DNA-Polymerase. Hauptwirte bzw. Tierarten, bei denen das Virus nachgewiesen wurde, sind in Klammern angegeben. Die unterstrichenen Viren sind mit klinischen BKF-Erkrankungen assoziiert. Die Darstellung wurde modifiziert nach einem von Li et al. 2005 generierten phylogenetischen Stammbaum.

1.3. Pathogenese

Dass OvHV-2 bisher *in vitro* nicht kultivierbar ist, erschwert die Erforschung der Pathogenese des SA-BKF. Die heutigen Erkenntnisse basieren vorwiegend auf den Ergebnissen molekularbiologischer Analysen, Untersuchungen OvHV-2-positiver, lymphoblastoider Zelllinien und auf Versuchen mit experimentell infizierten Kaninchen und Hamstern (Thonur et al. 2006).

Eine Schlüsselrolle in der OvHV-2-Pathogenese beim Rind scheinen zellvermittelte, immunpathologische Vorgänge zu spielen (Reid et al. 1984; Russell et al. 2009). Gammaherpesviren zeigen im Allgemeinen lymphotrope Eigenschaften und induzieren meist latente und relativ selten produktive Infektionen von Zielzellen (Ackermann 2006). In OvHV-2-infizierten Schafen wird von einer fein abgestimmten Regulierung

zwischen latenter Infektion und Virusvermehrung ausgegangen, was im Fehlwirt jedoch nicht zu funktionieren scheint (Ackermann 2005). Bei Untersuchungen OvHV-2-infizierter PBMCs von Schafen und Fehlwirten wurden Unterschiede in der Genexpression und in der Konformation viraler Genome festgestellt, die darauf hindeuten, dass Phasen lytischer Replikation beim Rind häufiger vorkommen als beim Schaf, was wiederum Einfluss auf die individuelle Pathogenese haben könnte (Thonur et al. 2006).

Die Infektion der Rinder erfolgt über infektiöses Nasensekret der Schafe, wo OvHV-2 in Form zellfreier Virionen ausgeschieden wird (Li et al. 2004). Als Aerosol gelangt das Virus in die oberen Atemwege. Es ist bislang aber unklar, welche Rezeptoren zum Eindringen in die Epithelzellen oder Lymphozyten genutzt werden (Russell et al. 2009).

Die Inkubationszeit wird bei natürlich infizierten Rindern in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. So ist von wenigen Wochen bis hin zu zehn Monaten die Rede (Kaaden 2002; Stöber 2006; OIE 2009).

Da OvHV-2-DNA vorwiegend in T-Lymphozyten nachgewiesen wird, gelten diese als Zielzellen des OvHV-2 (Reid et al. 1984; Meier-Trummer et al. 2009). Phänotypische Charakterisierungen ergaben, dass lymphoide Zellakkumulationen in BKF-Läsionen sowie lymphoblastoide Zelllinien, die aus Material von BKF-kranken Tieren gewonnen wurden, vorwiegend CD8⁺ und weniger häufig CD4⁺ und γ/δ -T-Lymphozyten enthalten (Burrells und Reid 1991; Ellis et al. 1992). Da in den Läsionen meist nur sehr wenig Virus-Antigen nachweisbar war, wurde lange Zeit angenommen, dass nicht infizierte Lymphozyten einer Regulation durch nur wenige virusinfizierte Zellen unterstehen (Schock et al. 1998). Im Sinne einer Autodestruktion würde somit von diesen eine Aktivierung, unkoordinierte Vermehrung und demzufolge eine massive Ansammlung cytotoxischer T-Lymphozyten und LGLs (engl.: large granular lymphocytes) in lymphatischem und nicht-lymphatischem Gewebe induziert (Reid et al. 1984; Hart et al. 2007). Diese Annahme wurde jedoch durch jüngere Daten aus Untersuchungen mittels in-situ-Hybridisierung relativiert, da doch wesentlich mehr CD-8⁺, OvHV-2-infizierte Zellen und Virusgenomsequenzen in Lymphozytenakkumulationen im Gewebe BKF-

erkrankter Tiere nachzuweisen sind, als es zuvor aus anderen Studien bekannt war (Simon et al. 2003). Virusinfizierte Zellen spielen somit möglicherweise eine aktivere Rolle in der Pathogenese des BKF als bisher angenommen (Li et al. 2006b; Russell et al. 2009).

Der multisystemische Charakter des SA-BKF und die massive Vaskulitis in überlebenswichtigen Organen wie dem Gehirn führen meist zum Tod des erkrankten Individuums. Im Falle einer überstandenen Erkrankung entwickeln Rinder jedoch eine latente Infektion, wobei Virus-DNA beständig nachweisbar bleibt (Müller-Doblies et al. 2001b). Ob solche Tiere durch eine spezifische Immunität gegenüber einer Neuinfektion geschützt sind, wie dies beim Gnu-assoziierten BKF der Fall ist (Plowright 1968), ist bislang unklar. Während von Tieren berichtet wird, die nach akuter SA-BKF-Erkrankung eine vollständige Rekonvaleszenz zeigten und zeitlebens klinisch gesund blieben, existieren auch Fallberichte von Rindern, die nach überstandenem SA-BKF erneut erkrankten und verendeten (O'Toole et al. 1995; Müller-Doblies et al. 2001b). Nicht nachvollziehbar war dabei jedoch, ob es sich um eine erneute Infektion oder eine Reaktivierung nach Erstinfektion handelte.

1.4. Klinische Symptomatik

Während eine Infektion mit dem Ovinen Herpesvirus-2 beim Hauptwirt in der Regel völlig asymptomatisch verläuft, können andere empfängliche Tierarten am Bösartigen Katarrhalfieber erkranken (Ackermann 2006). Das Krankheitsbild ist von den Folgen der lymphoproliferativen Vorgänge und der damit einhergehenden Vaskulitis geprägt und erweist sich als sehr komplex. Anhand unterschiedlicher Verlaufsformen und Symptome werden beim Rind zwar vier klinische Formen unterschieden, häufig sind diese aber nicht klar voneinander abzugrenzen, sodass Mischformen auftreten (Götze 1930).

Am häufigsten wird die akute Kopf-Augen Form beschrieben, bei der die Tiere hohes Fieber, eine Schwellung der Lymphknoten und Dyspnoe aufweisen. Zudem treten die für BKF typischen Veränderungen am Auge

und im Maulbereich auf, wie eine Corneatrübung, Injektion und Rötung der Skleralgefäße, Lidödeme, Augen- und Nasenausfluss, nekrotisierende Läsionen in der Maul- und Nasenhöhle und am Flotzmaul sowie massives Speicheln. Mit nur wenigen Ausnahmen sterben Rinder, die an dieser Form leiden, innerhalb von zwei bis sieben Tagen (Stöber 2006). Daneben kommen perakute Fälle vor, bei welchen die Tiere innerhalb von ein bis drei Tagen nach hohem Fieber und einer raschen Verschlechterung des Allgemeinzustandes sterben. In diesen Fällen muss keine typische BKF-Symptomatik auftreten. Die Darmform des BKF verläuft ähnlich der perakuten Form. Infolge schwerer, meist blutiger Durchfälle sterben fast alle betroffenen Tiere innerhalb von vier bis neun Tagen (Götze 1930). Akute und perakute Formen des SA-BKF können auch mit nervösen Symptomen wie Muskelzittern, Gleichgewichtsstörungen, Paralyse, Depression, Aggression oder Zwangsbewegungen einhergehen (Götze 1930; Stöber 2006; Mitchell und Scholes 2009).

Zudem ist auch eine milde Form beschrieben, bei der nach kurzzeitig auftretendem Fieber entweder eine vollständige Genesung der Tiere, ein chronischer Verlauf der Erkrankung oder auch eine Rekrudescenz eintreten können (O'Toole et al. 1997; Blood et al. 2000). Da bei dieser Form oft als einziges Symptom Hautveränderungen mit unterschiedlich starker Ausprägung beobachtet werden, wird sie auch als Hautform des bösartigen Katarrhalfiebers bezeichnet (David et al. 2005; Munday et al. 2008).

Die Letalität des SA-BKF gilt als sehr hoch und wird in der Literatur meist mit 95 % bis annähernd 100 % angegeben (Smith 1996; Stöber 2006). In den letzten Jahren werden diese Werte jedoch erneut diskutiert (O'Toole et al. 1997). Mit Einführung der OvHV-2-spezifischen PCR durch Baxter (1993) war eine einfache und schnelle Diagnostikmethode der Infektion *intra vitam* geschaffen. Seither kann nicht mehr nur bei an BKF verendeten Tieren ein sicherer Nachweis der Infektion durch den Sektionsbefund erbracht werden. Folglich mehren sich auch Fallberichte von Rindern mit vollständiger Genesung nach einer BKF-Erkrankung oder mit milden und chronischen Verlaufsformen (O'Toole et al. 1997; Müller-Doblies et al. 2001b; Otter et al. 2002). Die Letalität mag also auf die

Gesamtheit OvHV-2-infizierter Rinder bezogen durchaus zu hoch angesetzt sein, bei den akut erkrankten Tieren jedoch verläuft BKF nach wie vor fast immer tödlich (Blood et al. 2000).

2. Subklinische OvHV-2-Infektionen

Nicht alle Rinder, die mit dem Ovinen Herpesvirus-2 infiziert sind, erkranken offensichtlich am SA-BKF. Seit der Etablierung moderner OvHV-2-Nachweismethoden wurden bereits mehrfach Rinder mit bestätigter OvHV-2-Infektion beschrieben, die keinerlei BKF-Symptome aufwiesen (Collins et al. 2000; Otter et al. 2002).

Bezüglich subklinischer OvHV-2-Infektionen bei Rindern ist aber noch viel Forschungsbedarf vorhanden. So ist noch ungeklärt, ob subklinisch OvHV-2-infizierte Rinder auch Jahre später noch beispielsweise nach Virusreaktivierung in Stresssituationen oder nach erneuter Virusexposition erkranken können oder ob diese Tiere eine Immunität ausbilden (Løken et al. 2009). Nach überstandener Gnu-assoziiertem BKF nämlich bleibt das einmal mit AIHV-1-infizierte Rind gegenüber einer erneuten Infektion immun (Plowright 1968). Subklinisch OvHV-2-infizierte Rinder zeigen zwar vielfach eine Serokonversion (Powers et al. 2005; Løken et al. 2009), sehr unwahrscheinlich ist aber, dass diese Antikörper Schutz gegen eine Erkrankung oder Neuinfektion bieten können. Li et al. (2006b) erwägen auch die Möglichkeit, dass subklinisch infizierte Tiere generell eine genetische Resistenz besitzen, welche die Erkrankung an SA-BKF verhindern könnte.

Was zudem vielfach diskutiert wird, ist die Frage, ob Rinder mit latenter Infektion eine mögliche Virusquelle für andere Tiere des Bestandes darstellen. In Beständen mit OvHV-2-infizierten Rindern, die in der Herde belassen wurden, fielen in einem Zeitraum von mehreren Jahren keine weiteren Fälle von BKF auf (Müller-Doblies et al. 2001b). Obwohl dies gegen eine horizontale Übertragung des OvHV-2 innerhalb der Rinderpopulation spricht und auch die vertikale Transmission als unwahrscheinlich gilt, kann beides bisher nicht ganz sicher ausgeschlossen werden (Müller-Doblies et al. 2001b; Russell et al. 2009). Vereinzelt liegen Berichte über die Geburt OvHV-2-infizierter Kälber vor (O'Toole et al. 1995) und auch eine experimentelle Übertragung der Infektion mittels Blut von Rind zu Rind ist durchaus möglich (Götze und Liess 1929).

3. Epidemiologie von OvHV-2-Infektionen

3.1. OvHV-2-Infektionen bei Rindern

Das SA-BKF gilt bei Rindern als Einzeltierkrankung mit einer zwar sehr hohen Letalität aber einer geringen Morbidität. Nur sporadisch kommt es zu endemischen Ausbrüchen, mit bis zu 50 % Verlusten im Bestand (Li et al. 1995). In den meisten Erkrankungsfällen kann ein Zusammenhang mit vorausgehendem Kontakt zu Schafen, welche nachweislich infektiöses OvHV-2 ausscheiden, nachvollzogen werden (Götze und Liess 1930; Kim et al. 2003; Taus et al. 2006). Diese Tatsachen stützen die Annahme, dass eine Infektion der Rinder lediglich durch Schafkontakt erfolgt und eine horizontale Virusübertragung von Rind zu Rind nicht stattfindet (Metzler und Burri 1991). Ebenso scheint eine vertikale Übertragung auf den Fetus bei OvHV-2-infizierten Kühen nicht oder nur in sehr seltenen Fällen stattzufinden (O'Toole et al. 1997; Müller-Doblies et al. 2001b; Brenner und David 2005).

Eine Übertragung des Virus kann sowohl durch direkten Kontakt zwischen Rindern und Schafen stattfinden aber auch bereits durch eine indirekte Exposition mit infektiösen Ausscheidungen der Schafe (Stöber 2006). Daher ist auch eine Virusverbreitung durch Vektoren nicht ganz auszuschließen (Li et al. 2008).

Vielfach ist ein saisonal gehäuftes Auftreten von SA-BKF beschrieben und über lange Jahre hinweg hielt sich die Vermutung, dass diese Häufung der Fälle in Zusammenhang mit der Ablammsaison der Schafe steht (Harris et al. 1978; Müller-Doblies et al. 2001b). Jüngere Studien widerlegen jedoch die These, dass Mutterschafe um den Zeitpunkt der Geburt und deren neugeborene Lämmer die Hauptinfektionsquelle für Rinder darstellen. Vielmehr gelten vor allem junge Schafe, die im Alter zwischen sechs und neun Monaten den höchsten Gehalt an OvHV-2-DNA im Nasensekret aufweisen, als Virusüberträger (Li et al. 2004). Zudem konnte im Rahmen einer longitudinalen Studie über 13 Monate ein saisonal bedingter Anstieg des OvHV-2-Genomgehaltes weder im Nasensekret noch im Blut von Schafen nachgewiesen werden. Für die beobachtete jahreszeitliche

Häufung des SA-BKF bei Rindern scheinen demnach andere Faktoren, wie zum Beispiel klimatische Einflüsse, eine Rolle zu spielen (Li et al. 2001a).

Sehr häufig wird ein vermehrtes Auftreten des SA-BKF bei Rindern mit einem Alter von ein bis drei Jahren festgestellt, was eine Altersabhängigkeit der Erkrankung vermuten lässt (Müller-Doblies et al. 2001b). Die Gründe dafür sind jedoch bislang unbekannt. Eine Infektion kann aber durchaus auch bei Kälbern sehr früh erfolgen. Eine experimentelle OvHV-2-Infektion gelang bereits bei vier bis fünf Monate alten Kälbern (Taus et al. 2006). Müller-Doblies et al. (2001b) berichten zudem von klinischen BKF-Fällen bei Kälbern, die jünger als ein halbes Jahr waren, und es liegen sogar Fallberichte von Kälbern vor, die bereits im Alter von drei bis fünf Wochen an SA-BKF erkrankten (Abu Elzein et al. 2003).

Im Allgemeinen gelten Rinder weniger anfällig für eine BKF-Erkrankung als andere empfängliche Tierarten wie Bisons oder Hirsche, was Infektionsversuche belegen (Taus et al. 2006). Unklar ist aber, weshalb sich innerhalb der Rinderbestände bei vergleichbarem Infektionsdruck infolge derselben Exposition gegenüber Schafen nur einzelne Tiere infizieren und von diesem wiederum nur sehr wenige Rinder an SA-BKF erkranken. Eine Studie zu OvHV-2-Infektionen in der Schweiz ergab innerhalb eines Zeitraumes von drei Jahren eine Inzidenz von lediglich 0,6 aus 1000 schafexponierten Rindern bei einer gleichzeitigen Prävalenz von 100 % OvHV-2-Infektionen unter adulten Schafen (Müller-Doblies et al. 2001b).

Weltweit wurden seit Entwicklung der OvHV-2-spezifischen PCR Untersuchungen zu Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen bei Rindern durchgeführt (Li et al. 2001b; Müller-Doblies et al. 2001b; Strohbücker 2005; Wani et al. 2006; Løken et al. 2009). Ein aussagekräftiger Vergleich zwischen den Ergebnissen dieser Untersuchungen ist jedoch aufgrund von Unterschieden in den Bezugspopulationen (ein Rinderbestand; mehrere Betriebe; klinische Verdachtsfälle) und Nachweismethoden (PCR; ELISA; Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test = IFAT) kaum möglich. Die Prävalenzangaben der mittels PCR diagnostizierten OvHV-2-

Infektionen bei Rindern variieren aus diesen Gründen von weniger als 1 % (Wani et al. 2006) bis hin zu 40 % (Powers et al. 2005). In Nord-West-Portugal wurde die Prävalenz der OvHV-2-Infektionen in einer bestimmten Region untersucht und betrug dort in der Rinderpopulation 4,4 % (Cortez et al. 2008). Eine Seroprävalenz für BKF-Erreger-spezifische Antikörper von 15 % wurde bei 200 Rindern einer bestimmten Region der Türkei mittels ELISA festgestellt (Yeşilbağ 2007). In Norwegen lag die Prävalenz der serologisch mittels ELISA und IFAT getesteten 360 Rinder bei 6,4 % beziehungsweise 15 % (Løken et al. 2009). Ein Teil der im Rahmen solcher Studien getesteten Rinder erwies sich als subklinisch OvHV-2-infiziert.

3.2. OvHV-2-Infektionen bei Schafen

Man geht weltweit von einer sehr hohen Prävalenz an OvHV-2-Infektionen bei Schafen aus. Die Angaben in verschiedenen Studien aus den USA, Indien, Israel, Portugal, Norwegen, der Schweiz und Deutschland erreichen Werte zwischen 45 % und nahezu 100 % (Li et al. 1994; Li et al. 1995; Mirangi und Kang'ee 1997; Strohbücker 2005; Wani et al. 2006; Cortez et al. 2008; Løken et al. 2009). Die deutliche Alterstendenz, die dabei festzustellen ist und die Tatsache, dass Lämmer zum Zeitpunkt der Geburt und während der ersten Lebensmonate noch nicht mit OvHV-2 infiziert sind, zeigen, dass der endemische Zyklus der OvHV-2-Infektionen innerhalb der Schafpopulation anders abläuft als der der Gnu-assoziierten AIHV-1-Infektionen (Li et al. 1998).

Die meisten Gnakälber sind bereits als Neugeborene AIHV-1-infiziert und scheiden das Virus kontinuierlich bis zu einem Alter von drei bis vier Monaten aus (Mushi und Wafula 1983). Bei neugeborenen Lämmern wird eine OvHV-2-Infektion dagegen nur sehr selten nachgewiesen. Untersuchungen über OvHV-2-Infektionen von Lämmern ergaben bei 118 präkolostral gewonnenen Serumproben ausschließlich negative Ak-ELISA-Resultate und von 77 mittels PCR untersuchten Blutproben war lediglich in den beiden Proben eines Zwillingspaars OvHV-2-DNA unmittelbar nach der Geburt nachweisbar (Li et al. 1998). Eine vertikale

Übertragung scheint somit, falls überhaupt, bei Schafen nur sehr selten vorzukommen (Li et al. 1995; Müller-Doblies et al. 2001b). Vielmehr findet eine OvHV-2-Infektion der Lämmer ab den ersten zwei bis drei Lebensmonaten durch horizontale Infektion innerhalb der Herde statt (Baxter et al. 1997; Li et al. 1998; Wani et al. 2006). Da sich die Mehrzahl der Schafe unter natürlichen Herdenbedingungen nicht vor einem Alter von zwei Monaten infizieren, gelang es durch frühzeitiges Absetzen und Entfernen aus durchseuchten Herden, auch OvHV-2-freie Schafe aufzuziehen (Li et al. 1999). Eine OvHV-2-Infektion gelingt auch bei naiven adulten Schafen noch, die experimentell durch direkten Kontakt mit OvHV-2-infizierten Schafen sicher infizierbar sind (Li et al. 2000).

Eine entscheidende Rolle für die Übertragung des OvHV-2 kommt neben einer sexuellen Transmission (Hüssy et al. 2002) vor allem der Tröpfcheninfektion über die Atemwege zu (Ackermann 2005). OvHV-2-DNA ist im Nasensekret von Lämmern bereits ab den ersten zwei Lebensmonaten vereinzelt (Baxter et al. 1997) und ab einem Alter von etwa fünf Monaten bei den meisten Schafen nachweisbar (Li et al. 2001a). Ein maximaler Gehalt an OvHV-2-DNA wird in einem Alter von etwa sieben Monaten gemessen (Li et al. 1998; Li et al. 2001a; Li et al. 2004). Zudem ist während einer solch maximalen Ausscheidungsphase zellfreies intaktes Virus im Nasensekret enthalten, was die Vermutung nahelegt, dass vor allem junge Schafe im Alter von sechs bis neun Monaten eine Infektionsquelle für andere Schafe aber auch für empfängliche Tierarten darstellen (Kim et al. 2003; Li et al. 2004).

4. Nachweis einer OvHV-2-Infektion

4.1. Indirekte Nachweisverfahren

Ein Nachweis von BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern ist mit unterschiedlichen Methoden wie dem Neutralisationstest (Plowright et al. 1965), dem IFAT (Rossiter 1981) und dem ELISA (Li et al. 1994) möglich. Diese Tests basieren auf Kreuzreaktionen der Antikörper gegen Antigene des AIHV-1. Obwohl die Kreuzreaktivität hier vorteilig genutzt wird, besteht gleichzeitig der Nachteil, dass eine spezifische ätiologische Aussage über die Infektion nicht gemacht werden kann, da Antikörper gegen alle bislang bekannten BKF-Viren sowie gegen andere Gammaherpesviren bei Wiederkäuern detektiert werden können (Wan et al. 1988).

Ein direkter kompetitiver ELISA ist derzeit der einzige kommerziell erhältliche serologische Test zum Nachweis von Antikörpern gegen das OvHV-2 und andere BKF-Viren (Li et al. 2001b). In diesem Test konkurrieren im Serum befindliche Antikörper mit enzymmarkierten monoklonalen Antikörpern des Testserums (Meerrettich-Peroxidase-konjugierte MAK 15A) um BKF-Virus-spezifische Epitope. Der Substratumsatz durch die Peroxidase wird photometrisch gemessen, was semiquantitative Aussagen über das Vorliegen natürlicher Antikörper im Serum ermöglicht. Nach Modifikation des zuerst 1994 entwickelten indirekten Tests (Li et al. 1994) konnte die Sensitivität deutlich verbessert werden und ist für den Nachweis klinischer BKF-Fälle bei Rindern vom Hersteller mit 98 % angegeben. Bei Untersuchungen klinisch erkrankter Rinder zur Etablierung des Tests wurde allerdings nur ein Wert von 95 % erreicht (Li et al. 2001b). Nachteilig auf die Sensitivität könnte sich auswirken, dass der Test auf nur einem bestimmten Epitop eines Strukturproteins der BKF-Viren basiert und somit Rinder, die keine spezifischen Antikörper gegen das 15A-Epitop bilden als seronegativ diagnostiziert würden (Müller-Doblies et al. 2001a; Fraser et al. 2006). Zudem scheint der kompetitive ELISA eine geringere Verlässlichkeit in der Diagnostik latenter OvHV-2-Infektionen zu haben als die PCR, da bei Rindern nach überstandener BKF-Erkrankung zwar Virus-DNA, aber nicht in allen Fällen auch BKF-Erreger-spezifische Antikörper im Blut

nachweisbar sind (O'Toole et al. 1997). Die Spezifität des kompetitiven ELISA zum Nachweis von BKF-Virusinfektionen ist im Vergleich zu den anderen bisher beschriebenen serologischen Methoden mit 94 % aber sehr hoch (Li et al. 2001b).

Ein weiterer Antikörper-ELISA wurde 2006 experimentell ebenfalls auf der Basis AIHV-1-infizierter Zelllysate als Antigen entwickelt (Fraser et al. 2006). Der Nachweis der im Serum enthaltenen spezifischen Antikörper findet allerdings in diesem System nicht in Konkurrenz um das 15A-Epitop, sondern als indirekter ELISA mittels enzymmarkierter Antispezies-Antikörper (Meerrettichperoxidase-konjugiertes Kaninchen-Anti-Rind IgG) statt. Aufgrund der Detektion vieler möglicher Antigen-Antikörper-Bindungen anstelle ausschließlich der Bindung an ein spezifisches Virusepitop wie im kompetitiven ELISA, kann eine höhere Sensitivität gegenüber diesem erreicht werden, die jedoch zwangsweise mit einem Verlust an Spezifität einhergeht. Unspezifische Reaktionen mit Antikörpern gegen das Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1), das Bovine Herpesvirus-4 (BoHV-4) und die Bovine Virusdiarrhoe-Viren (BVDV) wurden allerdings bereits in ersten Experimenten ausgeschlossen (Fraser et al. 2006). Vergleichsdaten beider Tests aus Feldstudien mit größeren Tierzahlen liegen jedoch noch nicht vor.

Die zur Verfügung stehenden ELISA Formate haben andere Methoden wie den Neutralisationstest und den indirekten Immunfluoreszenz-Antikörper-Test weitgehend verdrängt, da letztere weder in der Sensitivität und Spezifität noch in der Praktikabilität eine Alternative darstellen (Rossiter et al. 1980; Wan et al. 1988; Li et al. 1994; Li et al. 2001b; Fraser et al. 2006).

4.2. Direkte Nachweisverfahren

Da der direkte Nachweis durch Anzüchtung des Ovinen Herpesvirus-2 *in vitro* bisher nicht möglich ist, gilt die PCR als Methode der Wahl zur Diagnostik klinischer Fälle des SA-BKF (Müller-Doblies et al. 1998). Zudem können OvHV-2-Infektionen auch dann bei Rindern, Schafen und

anderen Tierarten diagnostiziert werden, wenn ein asymptomatischer Verlauf vorliegt (Baxter et al. 1997; Hüssy et al. 2001; Løken et al. 2009).

4.2.1. Seminested PCR

Die erste PCR zum spezifischen Nachweis von OvHV-2-Genom wurde 1993 entwickelt (Baxter et al. 1993). Die Methode ist ein seminested Verfahren, welches durch Verwendung dreier unterschiedlicher Primer in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Schritten eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität gegenüber der nonnested PCR aufweist. Ein Problem stellt jedoch die hohe Kontaminationsgefahr bei der Durchführung dieses mehrstufigen Testverfahrens dar (Traul et al. 2007). Durch Änderung einer Primersequenz wurde die Methode 2001 modifiziert (Hüssy et al. 2001). Die seminested PCR findet heute weltweit in der BKF-Diagnostik Verwendung und gilt mit einer Sensitivität von mehr als 95 % und einer Spezifität von 94 bis 100 % als Goldstandard zum Nachweis einer OvHV-2 Infektion (Müller-Doblies et al. 1998; Collins et al. 2000).

Eine Quantifizierung des Virus-DNA-Gehaltes ist bei dieser konventionellen Methode mit einem Verdünnungsverfahren (Li et al. 1995) oder einer kompetitiven PCR nur bedingt möglich (Hua et al. 1999).

4.2.2. Quantitative real-time PCR

Eine moderne und zeitsparende Methode des Genomnachweises stellt die real-time PCR dar, bei der zudem eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Abschnitte mittels Fluoreszenzsonden in Echtzeit möglich ist.

Von Hüssy et al. wurde 2001 eine OvHV-2-spezifische quantitative real-time PCR entwickelt. Im Gegensatz zur seminested PCR wird hier nur ein Primerpaar verwendet und die gesamte Reaktion läuft nach Templatezugabe in einem geschlossenen System ab. Theoretisch bedeutet dies somit eine Verringerung der Kontaminationsgefahr. Die Sensitivität der seminested Methode wird bisher jedoch nicht erreicht (Traul et al. 2007; Russell et al. 2009). Untersuchungen von 152

Blutproben von Schafen, Rindern und anderen empfänglichen Tierarten im Rahmen der Etablierung dieser Methode ergaben dennoch eine Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden von 100 % (Hüssy et al. 2001). Durch Kombination der OvHV-2-spezifischen quantitativen real-time PCR mit einer quantitativen real-time PCR zum Nachweis zellulärer DNA kann eine Aussage über den Virusgehalt relativ zum Zellgehalt in der Probe getroffen werden. Im Gegensatz zu den Quantifizierungsmethoden, die weiter oben in Zusammenhang mit der konventionellen PCR aufgeführt sind, ist dieses Verfahren zum Einen mit einem geringeren Kontaminationsrisiko verbunden und zum Anderen weniger zeitaufwändig (Hüssy et al. 2001).

Mit einer kürzlich entwickelten Multiplex real-time PCR können darüber hinaus gleichzeitig fünf verschiedene BKF-Viren nachgewiesen und differenziert werden (Cunha et al. 2009). Diese zeitsparende, sensitive und hoch spezifische Methode zur Diagnostik von OvHV-2, AIHV-1, Caprinem Herpesvirus-2 (CpHV-2), BKF-Viren der Weißwedelhirsche (MCFV-WTD) und Steinböcke (MCFV-Ibex) kann beispielsweise bei BKF-Fällen in Zoologischen Gärten, Wildparks oder auch in Mischbetrieben mit Ziegen und Schafen sehr praktikabel sein. Für die spezifische Diagnostik des SA-BKF ist diese Methode jedoch weniger relevant.

5. OvHV-2-positive Zelllinien

OvHV-2-positive T-Lymphozyten können aus dem Blut sowie aus unterschiedlichem Gewebe OvHV-2-infizierter Tiere isoliert und kultiviert werden (Thonur et al. 2006; Russell et al. 2009). Durch Etablierung von lymphoblastoiden Zelllinien wird eine Vielzahl an Untersuchungen ermöglicht, die weitere Erkenntnisse über die Pathogenese des SA-BKF liefern und zudem möglicherweise zur Entwicklung eines Zellkultursystems zur Virusanzüchtung des OvHV-2 beitragen könnten (Rosbottom et al. 2002). Zudem gelingt es durch Inokulation von Versuchstieren wie Hamstern oder Kaninchen mit infizierten lymphoblastoiden T-Zellen klinische BKF-Symptome zu induzieren (Buxton et al. 1984; Buxton et al. 1988) und somit experimentelle Tiermodelle zur Erforschung des SA-BKF zu schaffen.

Morphologisch sind die Lymphozyten OvHV-2-infizierter Zelllinien, die aus klinisch an BKF erkrankten Rindern und experimentell infizierten Kaninchen stammen, große granuläre Lymphozyten (LGLs) und besitzen die Eigenschaften Natürlicher Killerzellen mit zytotoxischer Aktivität (Reid et al. 1989; Burrells und Reid 1991; Li et al. 2006b). Nur selten ist es bisher gelungen auch OvHV-2-Viruspartikel im Zytoplasma der LGLs im Elektronenmikroskop darzustellen (Rosbottom et al. 2002), obwohl mehr als 90 % der Zellen dieser lymphoblastoiden Zelllinien virale Genome tragen (Russell et al. 2009). Untersuchungen an Zelllinien, die von Rindern mit klinischem BKF stammten, ergaben, dass die Proliferation der Zelllinien Interleukin-2-abhängig ist, durch Stimulation der LGLs mit Concanavalin A (ConA) aber keine weitere oder nur eine sehr schwache Vermehrung erreicht werden kann (Schock et al. 1998; Swa et al. 2001). Zudem werden Zytokine wie Interferon γ , Tumornekrosefaktor α und Interleukin-4 und -10 exprimiert (Schock et al. 1998).

Interessante Resultate erbrachten Studien, in denen der Vermehrungszyklus des OvHV-2 in PBMCs latent infizierter Schafe und in kultivierten LGLs von BKF-erkrankten Rindern und Kaninchen miteinander verglichen wurden (Rosbottom et al. 2002; Thonur et al. 2006). Eine unterschiedliche Konformation des Virusgenoms und Genexpression in

infizierten Zellen lassen Rückschlüsse auf eine entweder latente Infektion oder einen produktiven, lytischen Zyklus zu. In den Zellen der Schafe herrscht aufgrund des zirkulär vorliegenden Virusgenoms und der Expression bestimmter, mit der Latenz assoziierter Genprodukte eine latente Infektion vor. Im Gegensatz dazu kommen in den LGLs der Rinder und Kaninchen lineare und zirkuläre Genomkonformationen gleichermaßen vor, das Protein-Expressionsmuster aber deutet darauf hin, dass nur wenige Zellen wirklich in der Latenz vorliegen und in diesen LGLs die Induktion des produktiven Zyklus nicht effektiv unterdrückt wird. Aus diesen Daten entstand die Hypothese, dass an BKF erkrankte Fehlwirte einen Defekt in der korrekten Regulation der Genexpression aufweisen könnten. Durch eine Behandlung mit verschiedenen Zytostatika ist eine Beeinflussung dieser LGLs möglich. Mit Doxorubicin kann eine produktive virale Genexpression induziert werden, während 5-Azacytidin die lytische Virusvermehrung hemmt und eine latente Infektion hervorruft (Thonur et al. 2006). Diese experimentellen Möglichkeiten zur Manipulation der viralen Genexpression und DNA-Replikation könnten für die Etablierung eines Zellkultursystems zur Virusvermehrung des OvHV-2 hilfreich sein (Russell et al. 2009).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Labormaterialien

1.1. Puffer, Lösungen und Reagenzien

- β -Mercaptoethanol 98 % (Sigma Aldrich, München), gelöst in Aqua demin., Konz.: 100 mM
- Agarosegel: 2,0 g Peq Gold Universal Agarose (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gelöst in 100 ml 1 X TBE-Puffer (Biorad Laboratories GmbH, München)
- AmpliTaq Polymerase (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau)
- Antibiotika 100 X Anti-Anti® (Invitrogen, Karlsruhe)
- Aqua demineralisata (Mili-Q-Reference Water Purification System, Milipore Co., Billeria, MA, USA)
- Diethylpyrocarbonat-Wasser, DEPC-H₂O (Invitrogen, Karlsruhe)
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Sigma Aldrich, München)
- Ladepuffer 6 X DNA Loading Dye (Fermentas, St-Leon-Rot)
- DNA-Größenmarker pUC Mix Marker 8 (Fermentas, St-Leon-Rot)
- Ethanol absolut (Serva, Amstetten, Österreich)
- Ethidiumbromid 1% (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Foetales Bovines Serum, FBS (Biochrom AG, Berlin)
- Glutamin (Biochrom AG, Berlin)
- Humanes Interleukin-2, IL-2 (Peprotech, Hamburg), gelöst in 100 mM Essigsäure 99,8 % (Riedel de Häen, Seelze), Konz.: 1 mg/ml
- Malignant Catarrhal Fever Virus cELISA Kit (VMRD Inc., Pullman, WA, USA)

- Mitogene (Sigma Aldrich):
 - Concanavalin A, Con A (gelöst in Aqua demin., 1 µg/µl)
 - Phytohämagglutinin, PHA (gelöst in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, 1 µg/µl)
 - Pokeweed Mitogen, PWM (gelöst in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, 1 µg/µl)
- Nukleotidmix Desoxyribonukleosidtriphosphat, dNTP (Roche GmbH, Grenzach-Wyhlen), Konz.: 10 mM, Aliquots à 20 µl bei -20 °C gelagert
- PCR-Puffer GeneAmp, 10 X (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau)
- Phosphate buffered saline (PBS) mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (Gibco, Karlsruhe)
- Phosphate buffered saline (PBS) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ Dulbecco A (MP Biomedicals GmbH, Eschwege)
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- Quantitect Multiplex PCR Mastermix, 2 X (Qiagen, Hilden)
- Separationsmedium Lymphoprep™ (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg)
- steriler Erythrozytenlysispuffer nach Geys, pH 7,0:
7,3 g NH₄Cl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,16 g KH₂PO₄,
0,1 g MgCl₂ x 6 H₂O, 0,1 g CaCl₂ (alle Chemikalien von Serva,
Amstetten, Österreich) gelöst in 1 l Aqua demin.
- Stopplösung Schwefelsäure 0,5 M (Institut Pourquier SAS, Montpellier, Frankreich)
- TRIS-Borat-EDTA-Puffer, TBE-Puffer, 10 X (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- TRIS-EDTA-Puffer, TE-Puffer, 100 X (Sigma Aldrich, München)
- Trypanblau 0,5 % (w/v) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Trypsin 0,5 % (Gibco, Karlsruhe)
- Tween-20 (Sigma Aldrich, München)
- Zellkulturmedium Iscove's Medium (Biochrom AG, Berlin)

1.2. Primer und Sonden

a) Primer für die seminested PCR:

Primer	Sequenz (5' → 3')	Hersteller	Quelle
BKF-1	AAG ATA AGC ACC AGT TAT GCA TCT GAT AAA	Tib Molbiol Synthese- labor GmbH, Berlin	Hüssy et al. (2001)
BKF-2	TTC TGG GGT AGT GGC GAG CGA AGG CTT		
BKF-3	AGT CTG GGG TAT ATG AAT CCA GAT GGC TCT C		

jeweils gelöst in 0,1 X TE-Puffer, Konz.: 10 pmol/µl,

Aliquots à 50 µl bei -20 °C gelagert

b) Primer und Sonde für die OvHV-2-spezifische real-time PCR:

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')	Hersteller	Quelle
OvHV-2 for	TGG TAG GAG CAG GCT ACC GT	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Hüssy et al. (2001)
OvHV-2 rev	ATC ATG CTG ACC CCT TGC AG		
OvHV-2 Sonde (FAM)	FAM - TCC ACG CCG TCC GCA CTG TAA GA - TAMRA		

jeweils gelöst in 0,1 X TE-Puffer

Konz. Primer: 100 pmol/µl, Aliquots à 50 µl bei -20 °C gelagert

Konz. Sonde: 10 pmol/µl, Aliquots à 20 µl bei -20 °C gelagert

c) Primer und Sonde für die 12s-rRNA-Gen-spezifische real-time PCR:

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')	Hersteller	Quelle
12s for	GCG GTG CTT TAT AYC CTT CTA GAG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg	freundlicher- weise zur Verfügung gestellt von Prof. Mathias Ackermann
12s rev	TTA GCA AGR ATT GGT GAG GTT TAT C		
12s Sonde (HEX)	HEX - AGC CTG TTC TAT AAY CGA T - TAMRA		

jeweils gelöst in 0,1 X TE-Puffer

Konz. Primer: 100 pmol/µl, Aliquots à 50 µl bei -20 °C gelagert

Konz. Sonde: 10 pmol/µl, Aliquots à 20 µl bei -20 °C gelagert

1.3. Plasmid

pOvHV-2 (Hüssy et al. 2001):

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Mathias Ackermann.

Das Plasmid enthält ein 422 bp Amplifikat aus dem OvHV-2-Genom, das mittels der Primärreaktion der seminested OvHV-2 spezifischen PCR nach Hüssy et al. (2001) generiert wurde.

1.4. Geräte und Laborhilfsmittel

- 96-well-Reaktionsplatte für die PCR und Klebefolie (Applied Biosystems, Darmstadt,)
- Automatischer Plattenschüttler MTS 4 (IKA, Staufen)
- Automatisches Plattenwaschgerät Atlantis 2 (ASYS Hitech, Eugendorf, Österreich)
- ELISA-Reader Expert 96 (ASYS Hitech, Eugendorf, Österreich)
- Fuchs-Rosenthal Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim)
- Gelelektrophorese-Einheit Power Pack P25T (Biometra, Göttingen)
- Laufkammer für Gele mit entsprechenden Gelschlitten und Kämmen (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Heizblock für 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg)
- Brutschrank (Binder, Tuttlingen)
- Digitalkamera Coolpix 4500 (Nikon GmbH, Düsseldorf)
- Tissue Lyser (Qiagen, Hilden)

- Stainless Steel Beads, 5 mm (Qiagen, Hilden)
- Laborwaage (Kern & Sohn GmbH, Balingen)
- Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar)
- Mikrowellengerät (Bartscher GmbH, Hagendorn, Schweiz)
- PCR-Reaktionsgefäße GeneAmp (Eppendorf AG, Hamburg)
- Photodokumentationssystem mit UV-Leuchtplatte (Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell)
- Pipetten und Pipettenpitzen (Eppendorf AG, Hamburg)
- Pipettierhilfe Easypet (Eppendorf AG, Hamburg)
- Reaktionsgefäße Save Lock Tubes 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
- Serologische Pipetten steril, einzeln verpackt (VWR, Darmstadt)
- Sterilbank Laminar Air-Flow (Gelaire, Sydney, Australien)
- Thermocycler MX 3005P™ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
- Thermocycler T1 und T 3000 (Biometra GmbH, Göttingen)
- unbeschichtete Mikrotiterplatte F96 MicroWell™ Plate (Nunc GmbH und Co. KG, Langenselbold)
- Vortex-Mixer lab dancer S40 (VWR, Darmstadt)
- Zellkulturschalen 25 cm² (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
- Zentrifuge 5415 D (Eppendorf AG, Hamburg)
- Zentrifuge 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg)
- Zentrifuge Quick Spin QS 7000 (VWR International GmbH, Darmstadt)

1.5. Software

- BioCapt (Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell)
- Fathom™ Dynamic Data™ Software Version 2.0 (KCP Technologies Ltd., Tamil Nadu, Indien)
- iPhoto Version 8.1.1 (Apple Inc., Cupertino, CA, USA)
- Microsoft Office 2003 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA)
- Microsoft Office für Mac 2008 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA)
- MikroBas Routine (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath)
- MikroWin 2000 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath)
- MX Pro™ qPCR Software Version 1.2 (Stragene, Amsterdam, Niederlande)
- PASS Version 2004 (Statcon, Witzenhausen)
- Past Version 1.89 (O. Hammer & D. A. T. Harper, Oslo, Norwegen)

2. Beprobungsgebiet

Die Untersuchungen zur Prävalenz von OvHV-2-Infektionen bei Rindern und Schafen wurden auf Mischbetriebe in Bayern beschränkt. Die insgesamt 20 für die Studie ausgewählten Betriebe lagen in 15 unterschiedlichen Landkreisen in fünf verschiedenen Regierungsbezirken (Abb. III.1, Tab. III.1, Tab. III.2).

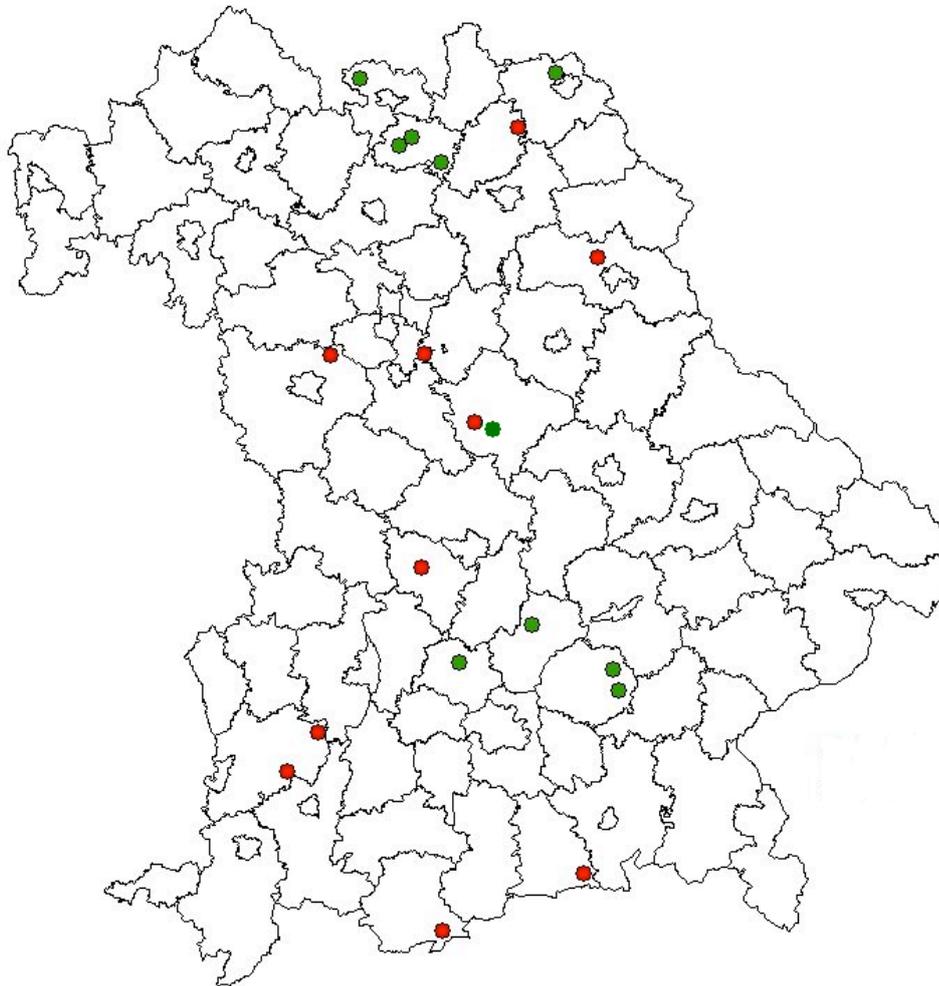


Abb. III.1: Karte des Freistaates Bayern mit Landkreisgrenzen. Rot: Betriebe mit virologisch bestätigten klinischen BKF-Fällen im Rinderbestand zwischen Jan. 2007 und Dez. 2009 (Gruppe 1), grün: Betriebe ohne klinische BKF-Fälle in diesem Zeitraum (Gruppe 2).

3. In die Untersuchungen einbezogene Betriebe

Die Auswahl der 20 Betriebe erfolgte anhand folgender Kriterien: Prinzipiell mussten alle Betriebe Mischbetriebe mit Rindern und Schafen sein. In zehn der Betriebe mussten im Rinderbestand virologisch bestätigte BKF-Fälle zwischen Januar 2007 und Dezember 2009 aufgetreten sein (Gruppe 1), während in weiteren zehn Betrieben keine klinische BKF-Erkrankung bekannt geworden sein sollte (Gruppe 2). Als Mischbetrieb wurden solche Betriebe definiert, die im Zeitraum von Januar 2007 bis Dezember 2009 zeitweise oder langfristig gleichzeitig Rinder und Schafe hielten.

Die Betriebsgröße und die Betriebsform wurden bei der Auswahl nicht berücksichtigt. Der kleinste Rinderbestand zählte zum Zeitpunkt der Probennahme acht, der größte 183 Tiere. Die Anzahl der Schafe reichte von zwei bis zu 95 Tieren im Bestand. Zum größten Teil hielten die Betriebe Milchvieh. Außerdem waren drei Mutterkuh- und ein reiner Mastbetrieb vertreten.

3.1. Betriebe der Gruppe 1

Für die Gruppe 1 wurden zehn Mischbetriebe ausgewählt, in denen im Zeitraum von Januar 2007 bis Dezember 2009 ein oder mehrere Rinder klinisch manifest an BKF erkrankt waren. Die Absicherung der Diagnose erfolgte durch das veterinärvirologische Labor des LGL mittels OvHV-2-Genomnachweis.

Ein Betrieb dieser Gruppe (Betrieb 1.7) hatte bei der Beprobung am 04.05.2009 das für fünf Monate im Rinderstall eingestellte Schaf bereits weggegeben, sodass zwar die Kriterien für einen Mischbetrieb im Sinne dieser Studie erfüllt waren, jedoch vom Schaf keine Proben mehr untersucht werden konnten.

Tab. III.1: Betriebe in Gruppe 1

Betrieb	Regierungs- bezirk	Landkreis	Rinder insg. im Bestand	Schafe insg. im Bestand
1.1	Oberbayern	Miesbach	58	11
1.2	Oberfranken	Kulmbach	14	95
1.3	Mittelfranken	Ansbach	53	80
1.4	Oberbayern	Neuburg-Schrobenhausen	8	4
1.5	Schwaben	Unterallgäu	25	70
1.6	Schwaben	Unterallgäu	141	2
1.7	Oberpfalz	Neustadt an der Waldnaab	162	(1)*
1.8	Mittelfranken	Nürnberg	25	2
1.9	Oberpfalz	Neumarkt	37	26
1.10	Oberbayern	Garmisch-Partenkirchen	8	14

* Schaf zum Zeitpunkt der Probennahme bereits weggegeben

3.2. Betriebe der Gruppe 2

In den zehn Betrieben der Gruppe 2 wurden im Zeitraum von Januar 2007 bis Dezember 2009 keine klinisch manifesten BKF-Erkrankungen festgestellt. In acht Betrieben aus dieser Gruppe waren nach Aussagen der jeweiligen Betriebsleiter auch vor diesem Zeitraum keine an BKF erkrankten Rinder aufgefallen. In einem der Betriebe (Betrieb 2.5) trat etwa vor zehn Jahren ein BKF-Fall auf, in einem weiteren (Betrieb 2.6) wurden in den Jahren 2005 und 2006 zwei BKF-Fälle bei den Rindern nachgewiesen.

Tab. III.2: Betriebe in Gruppe 2

Betrieb	Regierungs- bezirk	Landkreis	Rinder insg. im Bestand	Schafe insg. im Bestand
2.1	Oberbayern	Dachau	126	58
2.2	Oberbayern	Freising	78	23
2.3	Oberbayern	Erding	133	20
2.4	Oberfranken	Lichtenfels	160	12
2.5	Oberfranken	Lichtenfels	105	22
2.6	Oberfranken	Coburg	37	23
2.7	Oberfranken	Lichtenfels	95	24
2.8	Oberfranken	Hof	183	50
2.9	Oberbayern	Erding	89	25
2.10	Oberpfalz	Neumarkt	114	10

4. Zeitraum und Umfang der Probennahme

Zur Feststellung der Prävalenz von OvHV-2-Infektionen in einzelnen bayerischen Mischbetrieben wurden im Zeitraum von Mai 2008 bis Dezember 2009 in den 20 oben aufgeführten Betrieben Probennahmen durchgeführt. Insgesamt wurden für den Nachweis von Antikörpern gegen BKF-Erreger (Kap. III.10.1) sowie für die Untersuchung auf OvHV-2-Genom mittels seminested PCR (Kap. III.10.2) Blutproben von 801 Rindern und 384 Schafen gewonnen. Die notwendige Probenanzahl wurde mittels statistischer Stichprobenplanung ermittelt (Kap. III.5).

Zusätzlich wurden von 13 Rindern und drei Schafen aus den Studienbetrieben, welche OvHV-2-infiziert waren, mehrmals Blut- sowie Nasentupferproben für weiterführende Laboruntersuchungen gewonnen.

5. Stichprobenplanung zur Bestimmung der Prävalenz

Die Anzahl der zu beprobenden Tiere, die für eine Beurteilung der Prävalenz von OvHV-2-Infektionen auf Bestandsebene nötig waren, wurde

mittels statistischer Stichprobenplanung berechnet. Dazu wurde die Software PASS 2004 verwendet. Da bisher keine Daten zu OvHV-2-Prävalenzen in bayerischen Rinder- und Schafpopulationen vorlagen, wurde bei der Planung für beide Tierarten eine Prävalenz von 50 % angenommen. In diesem theoretisch ungünstigsten Fall wird entsprechend einer Gauß'schen Normalverteilung für eine sichere Aussage die größte Probenanzahl benötigt. Für die Stichprobengröße wurden des Weiteren eine Präzision von 10 % und ein Konfidenzintervall von 95 % festgelegt. Die errechneten Tierzahlen wurden gleichermaßen für die Beprobung der Rinder- als auch der Schafherden herangezogen. Die Tiere wurden im Bestand zufällig ausgewählt. Alter, Rasse und Geschlecht der Tiere wurden dabei nicht berücksichtigt.

Für die Berechnung der Prävalenz der OvHV-2-Infektionen innerhalb der einzelnen Rinder- und Schafbestände wurde der Quotient aus der Anzahl an Tieren mit positivem Testergebnis und der Anzahl an beprobten Tieren in dieser Herde gebildet. Für Herden mit mehr als 14 Tieren, bei denen nach oben aufgeführter Stichprobenplanung nicht alle Tiere beprobt wurden, wurde für eine 95 %ige Sicherheit der Prävalenzergebnisse zusätzlich eine Konfidenzintervallberechnung nach Wilson durchgeführt.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz von Prävalenzunterschieden zwischen beiden Studiengruppen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet.

6. Zusätzliche Proben OvHV-2-infizierter Tiere

Blut- und Nasentupferproben von 13 OvHV-2-infizierten Rindern und elf OvHV-2-infizierten Schafen aus den Studienbetrieben dienten als Ausgangsmaterial für weiterführende Untersuchungen (Kap. III.10.2.3 und Kap. III.10.3). Den Tieren wurden bis zu dreimal Blut- und Nasentupferproben entnommen. Aus logistischen Gründen konnte dabei jedoch kein zeitlich einheitliches Schema verfolgt werden (Tab. III.3 und Tab. III.4). Drei Rinder aus Betrieb 1.7 und acht Schafe aus unterschiedlichen Betrieben wurden nicht wiederholt beprobt.

Tab. III.3: Daten zusätzlicher Probennahmen bei ausgewählten Rindern mit einer OvHV-2-Infektion

OvHV-2-infizierte Rinder, die dreimalig beprobt wurden					
Tier	Betrieb	BKF-Status	1. Beprobung	2. Beprobung	3. Beprobung
1/11	1.1	Ende April 2008 akutes BKF	14.05.2008	04.12.2008	02.12.2009
1/12	1.1	klinisch unauffällig	14.05.2008	04.12.2008	02.12.2009
OvHV-2-infizierte Rinder, die zweimalig beprobt wurden					
Tier	Betrieb	BKF-Status	1. Beprobung	2. Beprobung	
1/22	1.1	klinisch unauffällig	14.05.2008	04.12.2008	
1/32	1.1	Ende Mai 2008 akutes BKF	14.05.2008	21.05.2008	
1/37	1.1	klinisch unauffällig	14.05.2008	04.12.2008	
22/5	1.2	klinisch unauffällig	24.07.2008	21.08.2008	
22/7	1.2	klinisch unauffällig	24.07.2008	21.08.2008	
30/5	1.3	klinisch unauffällig	09.09.2008	30.11.2009	
30/19	1.3	klinisch unauffällig	09.09.2008	30.11.2009	
97/21	1.8	klinisch unauffällig	23.06.2009	22.07.2009	

Tab. III.4: Daten zusätzlicher Probennahmen bei ausgewählten Schafen mit einer OvHV-2-Infektion

OvHV-2-infizierte Schafe mit mehrmaliger Beprobung				
Tier	Betrieb	1. Beprobung	2. Beprobung	3. Beprobung
1/S-5	1.1	14.05.2008	04.12.2008	02.12.2009
97/S-1	1.8	23.06.2009	22.07.2009	keine
97/S-2	1.8	23.06.2009	22.07.2009	keine

Zusätzlich standen Blut-, Nasentupfer- und Organproben von einem akut an BKF erkrankten Rind zur Verfügung, welches Patient an der Klinik für Wiederkäuer der LMU München war (Tier 1248) und keinem der Studienbetriebe angehörte. Die Kuh wurde am 27. August 2009 in der Klinik vorgestellt. Den Angaben der Tierbesitzer zufolge hatten die für BKF typischen Krankheitssymptome bereits zwei Tage zuvor eingesetzt. Das Tier verblieb für einen Tag an der Klinik, wurde dort klinisch untersucht und es wurden einmalig Vollblutproben zur Serumgewinnung sowie EDTA-Blutproben gewonnen. Nach Euthanasie am 28. August 2009 wurde das Rind zur Sektion ans LGL verbracht und es wurden noch am selben Tag verschiedene Organ- und Gewebeproben entnommen.

7. Durchführung der Probenentnahme

7.1. Blutprobenentnahme

Die Entnahme der Blutproben erfolgte beim Rind an der Vena coccygea, beim Kalb sowie beim Schaf an der Vena jugularis mittels Vacutainer®-System (Becton Dickinson GmbH, Plymouth, Großbritannien). Für die serologischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen wurden pro Tier einmalig jeweils eine 10 ml Vollblutprobe zur Serumgewinnung und eine EDTA-Blutprobe entnommen. Unmittelbar nach Entnahme wurden die Blutproben in einer Kühlbox ins Labor transportiert und dort bis zur weiteren Aufbereitung innerhalb der folgenden ein bis drei Tage bei 2 bis 8 °C gelagert.

Zur Langzeitkultivierung von Lymphozyten OvHV-2-infizierter Rinder wurden von ausgewählten Tieren jeweils 50 ml gerinnungsgehemmtes Blut gewonnen. Das erste Probenröhrchen wurde dabei verworfen, sodass möglicherweise beim Durchstechen der Haut kontaminiertes Probenmaterial ausgeschlossen werden konnte. Innerhalb von maximal drei Stunden wurde das Blut anschließend gekühlt zur Gewinnung der Zellen ins Labor transportiert.

7.2. Entnahme von Nasentupferproben

Die Tupferproben wurden nach dem Protokoll von Kim et al. (2003) gewonnen. Je Nasenöffnung wurden gleichzeitig zwei trockene Wattetupfer eingeführt. Durch kreisförmige Bewegungen der Tupfer entlang der Nasenschleimhaut sollte gewährleistet werden, dass eine ausreichende Menge an Zellen mit dem Tupfermaterial aufgenommen wurde. Nach 20 bis 30 Sekunden wurden die Tupfer entnommen, in ein Probengefäß mit 1,2 ml gekühltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verbracht, welches in einer Kühlbox gelagert unmittelbar nach der Probennahme ins Labor transportiert wurde. Die Tupferproben wurden am LGL unmittelbar nach Eingang für die Untersuchung aufbereitet oder bis zur Aufbereitung innerhalb der folgenden ein bis drei Tage bei 2 bis 8 °C gelagert.

7.3. Entnahme von Organproben

Die Probenentnahme bei der Sektion eines aufgrund von BKF euthanasierten Rindes aus der Klinik für Wiederkäuer (Tier 1248, Kap. III.6) erfolgte durch eine Fachtierärztin für Veterinärpathologie des LGL. Die Organ- und Gewebeproben wurden anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Aufbereitung eingefroren.

8. Klinische Untersuchung OvHV-2-infizierter Tiere

Die klinische Untersuchung der Rinder wurde in Anlehnung an die Untersuchungskarte für die Erstuntersuchung neuer Patienten der Klinik für Wiederkäuer der LMU München durchgeführt (siehe Anhang). Bei der speziellen Untersuchung wurden die Organe berücksichtigt, welche beim BKF pathologische Veränderungen aufweisen können.

9. Erfassung und Auswertung der Daten zu Tieren und Betrieben

Die Ohrmarkennummern der beprobten Tiere wurden unmittelbar bei Probennahme erfasst. Schafe, die ausschließlich mit einer Betriebsnummer gekennzeichnet waren, wurden mit einem Spray individuell nummeriert, damit die Untersuchungsergebnisse später den Tieren zugeordnet werden konnte. Durch eine Probennahmeliste wurden Proben- und Ohrmarkennummer oder individuelle Kennzeichnung einander eindeutig zugeordnet. Weitere Daten zu den Rindern, wie Geburtsdatum und Geschlecht, konnten bei 16 Betrieben dem Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere (HI-Tier) entnommen werden. Vier Betriebe stellten die Herdbucheinträge oder Tierpässe zum Einblick zur Verfügung. Das Alter der Schafe wurden durch den Landwirt mitgeteilt.

Über einen eigens erstellten Fragebogen (siehe Anhang) wurden gemeinsam mit dem jeweiligen Betriebsleiter Daten zum Betrieb erfasst.

Die Fragen waren in fünf Teilbereiche gegliedert:

- 1) Datum der Probennahme und Allgemeine Betriebsdaten: Regierungsbezirk, Landkreis, Kontaktdaten des Betriebes
- 2) Tiere: am Betrieb gehaltene Tierarten, Anzahl der Rinder und Schafe (eingeteilt in Altersgruppen), Nutzungsart und Rassen der Rinder und Schafe
- 3) Haltung der Rinder und Schafe: Haltungsform, Aufstallungstyp je Tiergruppe, Weidegang, Kontakt der Tiere und Tierarten zueinander (direkt/ indirekt)
- 4) Zukäufe und Kontakt der Rinder und Schafe außerhalb des Betriebes
- 5) Tierverluste und Angaben zu Rindern, bei denen BKF-Symptome beobachtet wurden

Zudem wurde ein Lageplan des Betriebes skizziert mit den Betriebsgebäuden, Stallungen, Ausläufen und Weideflächen.

Die Fragebogen wurden mittels der Datenbanksoftware Microsoft Access ausgewertet. Statistische Berechnungen wurden mit der Software Past durchgeführt. Zur Auswertung der Unterschiede zwischen beiden Betriebsgruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Häufigkeiten wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests verglichen.

10. Laboruntersuchungen

10.1. Antikörpernachweis mittels ELISA

Die Gewinnung der Seren erfolgte durch Zentrifugieren der Vollblutproben für fünf Minuten bei 800 x g und anschließender Überführung des Serums in verschließbare Kunststoff-Reagenzgefäße. Bei Untersuchung der Proben innerhalb von einer Woche erfolgte die Aufbewahrung bei 2 bis 8 °C, zur längerfristigen Lagerung wurden die Seren bei -20 °C aufbewahrt.

Die Untersuchung auf Antikörper gegen BKF-Erreger wurde mit einem kommerziell erhältlichen BKF-ELISA-Testkit (Malignant Catarrhal Fever Virus cELISA, VMRD) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Positive und negative Kontrollproben waren im Testkit enthalten und die Herstellung der Wasch- und Stopplösung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

Der Test basiert auf einer Konkurrenz zwischen im Serum befindlichen Antikörpern und dem mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierten monoklonalen Antikörper (MAK) 15-A um ein hoch konserviertes, spezifisches Epitop der Glykoprotein B Homologen der BKF-Viren. Mittels photometrischer Messung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm wurde die spezifische Konkurrenz der Antikörper quantifiziert und anhand folgender Formel in Prozent ausgedrückt:

$$\text{Hemmung (\%)} = 100 - (\text{OD}_{\text{Probe}} \times 100 / \text{MW OD}_{\text{Neg.-Kontrolle}})$$

Proben mit einer Hemmung größer als 25 % sind laut Herstellerangaben als Antikörper-positiv zu bewerten. Antikörper-positive Rinderseren wurden zur Absicherung der Ergebnisse wiederholt untersucht.

10.2. OvHV-2-Genomnachweis

Die Isolierung von DNA aus den gerinnungsgehemmten Rinder- und Schafblutproben, die Durchführung der PCR, sowie die Dokumentation der Ergebnisse wurden entsprechend der Vorgaben und Protokolle des Veterinärvirologie-Labors am LGL durchgeführt.

Die Proben der Rinder wurden prinzipiell getrennt von denen der Schafe bearbeitet. Damit sollte eine Kontamination der Rinderproben durch die erwartete hohe Anzahl an OvHV-2-positiven Schafproben vermieden werden. Es wurden maximal 20 Proben gleichzeitig aufgearbeitet.

10.2.1. DNA-Isolierung

Die Gewinnung der Leukozyten erfolgte durch Zentrifugation der EDTA-Blutprobe für zehn Minuten bei 800 x g und Überführen des Leukozytensaumes (Buffy coat) in sterile Reagenzgefäße. Anschließend wurden die Zellen mit Erythrozytenlysispuffer gewaschen. Dazu wurden 5 ml Puffer in das Reagenzgefäß gegeben und die Zellen durch Vortexen resuspendiert. Die Suspension wurde zehn Minuten im Kühlschrank inkubiert und danach wie oben angegeben zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Waschen der Leukozyten wurde ein- bis zweimal mit jeweils 3 ml Erythrozytenlysispuffer wiederholt, bis das Zellpellet keine roten Verfärbungen mehr aufwies und der Überstand klar blieb. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 2 ml Lysispuffer gut resuspendiert und in zwei Aliquots à 1 ml in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden wie oben erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Ein Aliquot der Probe wurde für die anschließende DNA-Extraktion verwendet, das zweite diente als Rückstellprobe. Die Lagerung der Leukozyten erfolgte für eine Stunde bei 2 bis 8 °C oder längerfristig bei -80 °C.

Zum Extrahieren der DNA wurde ein kommerziell erhältliches Kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) verwendet und dabei entsprechend des Herstellerprotokolls (DNA Purification from Tissues, Handbuch 11/2007) verfahren. Die isolierten Leukozyten wurden entsprechend zerkleinerter

Gewebeproben behandelt, indem 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K (beides im Kit enthalten) zugegeben wurden. Die weitere Durchführung erfolgte wie im Protokoll angegeben und zuletzt wurde die DNA in zwei Schritten mit je 100 µl AE-Puffer nach fünfminütiger Inkubation eluiert. Die extrahierte DNA wurde kurzfristig bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 2 bis 8 °C gelagert oder längerfristig bei -20 °C eingefroren.

Die Aufbereitung der Nasentupferproben erfolgte durch Ausdrücken des Tupfers in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} . Anschließend wurden 200 µl des Probenmaterials direkt zur DNA-Extraktion eingesetzt oder bis zur weiteren Bearbeitung bei -80° C eingefroren. Die Extraktion der DNA wurde nach Herstellerprotokoll (s.o.) durchgeführt, wobei der erste Inkubationsschritt mit ATL-Puffer entfiel. Die 200 µl Ausgangsmaterial wurden unmittelbar zusammen mit 200 µl AL-Puffer und 25 µl Proteinase K für zehn Minuten bei 70 °C im Thermomixer inkubiert.

Zur Vorbereitung der Organproben für die DNA-Extraktion wurden insgesamt 10 bis 25 g Gewebe in 1 ml PBS mit einer Stahlkugel bei 25 000 Hz im Tissue Lyser homogenisiert. Nach Zentrifugieren der Probe für eine Minute bei 4300 x g wurden 100 µl des Überstandes zur Extraktion der DNA nach Herstellerprotokoll (s.o.) eingesetzt.

10.2.2. Seminested PCR

Die in dieser Arbeit angewandte PCR-Methode zum Nachweis von OvHV-2-Genomen basiert auf den Protokollen von Baxter et al. (1993) und Hüseyin et al. (2001).

Die Herstellung des Mastermix für den ersten Teil der PCR erfolgte entsprechend folgendem Protokoll in einem separaten Raum (Prä-PCR-Bereich):

Mastermix 1 (für 50 µl Ansatz):

DEPC-H ₂ O	37,3 µl
10 X PCR-Puffer Gene Amp	5,0 µl
dNTP	1,0 µl
Primer BKF-1	2,0 µl
Primer BKF-3	2,0 µl
AmpliTaq-Polymerase	0,2 µl

In DNase-freien PCR-Reaktionsgefäßen wurden je 47,5 µl des Mastermix-Ansatzes vorgelegt. Dazu wurden je 2,5 µl der Template-DNA pipettiert. Als Positivkontrolle wurde eine definiert positive DNA verwendet und als Kontaminationskontrollen dienten eine bei der Extraktion mitgeführte Kontrolle sowie der Mastermixansatz ohne DNA-Zusatz.

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden anschließend in den Thermocycler eingesetzt. Der erste Teil der PCR lief nach folgendem Temperaturprofil ab:

Amplifikation (30 Zyklen):

Denaturierung:	30 Sek bei 94 °C
Annealing:	30 Sek bei 58 °C
Elongation:	30 Sek bei 72 °C
Finale Elongation:	5 Min bei 72 °C
Abkühlung auf 4 °C	

Der Mastermix für den zweiten, seminested Teil der PCR wurde entsprechend dem des ersten Teils hergestellt (s.o.), mit dem Unterschied, dass anstelle des BKF-1-Primers 2,0 µl des BKF-2-Primers eingesetzt wurden.

Zu 47,5 µl des zweiten Mastermix-Ansatzes, vorgelegt in PCR-Reaktionsgefäßen, wurden nun 2,5 µl der Produkte aus der ersten PCR pipettiert. Nach Einsetzen der Reaktionsgefäße in den Thermocycler lief der zweite Teil der PCR nach dem bereits aufgeführten Temperaturprofil

ab, jedoch bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C.

Nach Ende des zweiten Teils der PCR wurden die Amplifikationsprodukte bei Analyse innerhalb der nächsten zwei Tage im Kühlschrank bei 2 bis 8 °C aufbewahrt oder längerfristig bei -20 °C eingefroren.

Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 12 µl der Amplifikationsprodukte der Proben und Kontrollen aus der zweiten PCR mit 2 µl Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen eines 2 %igen Agarosegels pipettiert. Die erste und letzte Tasche wurden mit 10 µl des DNA-Größenmarkers beschickt. Die Elektrophorese fand bei 150 V und 1000 mA statt. Die Laufzeit betrug 60 Minuten.

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte nach 20minütigem Anfärben des Gels im Ethidiumbromidfärbebad (35 µl 1 %ige Ethidiumbromid-Stammlösung in 600 ml Aqua demin.) mittels einer Photodokumentationseinheit mit UV-Leuchtschirm und entsprechender Software (BioCapt, Vilber Lourmat).

Die Untersuchung der Proben auf OvHV-2-Genom war auswertbar, sofern bei der Positivkontrolle eine deutliche Bande bei 239 Basenpaaren (bp) zu sehen war und keine Amplifikation in der Extraktionskontrolle und den beiden Mastermixkontrollen stattgefunden hatte. Bei Proben, die eine Bande in Höhe der Positivkontrolle, also bei 239 bp aufwiesen, wurde das Ergebnis als positiv gewertet. Proben mit einer schwachen Bande auf etwa der gleichen Höhe, wurden als fraglich eingestuft. Die PCR-Untersuchung wurde bei positiven und fraglichen Proben wiederholt, damit der OvHV-2-Genomnachweis entweder bestätigt oder ein falsch-positives Ergebnis weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

10.2.3. Quantifizierung des OvHV-2-Genomgehaltes

Zur Quantifizierung des OvHV-2-Genomgehaltes in einer Probe wurden zwei unterschiedliche quantitative real-time PCRs durchgeführt (Hüssy et al. 2001, Prof. Mathias Ackermann persönliche Kommunikation). Die absolute Anzahl an OvHV-2-Genomkopien in der Probe wurde anhand einer mit DNA des Plamides pOvHV-2 generierten Standardkurve in einer

ersten real-time PCR ermittelt. Für die vergleichende Beurteilung des Zellgehaltes zwischen den Proben wurde aus DNA, die aus einer definierten Anzahl an Leukozyten eines Rindes extrahiert worden war, eine weitere Standardkurve generiert und in der 12s-rRNA-Gen-spezifischen real-time PCR eingesetzt. Auf diese Weise konnte der relative Zellgehalt der Proben gut miteinander verglichen werden, eine absolute Bestimmung der Zellzahl dagegen wurde nicht durchgeführt. Der Quotient der Ergebnisse beider Tests wurde als OvHV-2-Genomgehalt relativ zum Zellgehalt in der Probe angegeben.

10.2.3.1. OvHV-2-spezifische quantitative real-time PCR

Die Probenaufbereitung erfolgte nach dem bereits aufgeführten Prinzip (Kap. III.10.2.1). Der Master Mix Ansatz für die real-time PCR wurde nach folgendem Protokoll in einem separaten Raum (Prä-PCR-Bereich) hergestellt:

Mastermix OvHV-2-spezifische real-time PCR:

(für 20 µl Ansatz)

DEPC-H ₂ O	3,16 µl
2 X Quantitect Multiplex Mastermix	10,0 µl
OvHV-2 forward Primer (finale Konz.: 240 nM)	0,48 µl
OvHV-2 reverse Primer (finale Konz.: 600 nM)	1,2 µl
OvHV-2 Sonde (finale Konz.: 80 nM)	0,16 µl

Dieser Ansatz wurde in einer 96-well-Reaktionsplatte vorgelegt und anschließend 5 µl der Template-DNA zugegeben.

Als Kontrollen dienten die Extraktionskontrollen aus der Probenaufbereitung sowie zwei Template-freie Kontrollen (no template control = NTC). Die gleiche definiert OvHV-2-positive DNA wie in der seminested PCR wurde auch hier als Positivkontrolle mitgeführt.

Das Plasmid pOvHV-2 wurde zur Generierung der Standardkurve im

Doppelansatz in log 10-Verdünnungsstufen von 1×10^6 bis 1×10^1 OvHV-2-Genomkopien in der PCR eingesetzt.

Die real-time PCR lief im Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil ab:

Initiale Denaturierung:	10 Min bei 95 °C
Amplifikation (45 Zyklen):	
Denaturierung:	15 Sek bei 95 °C
Primer-Annealing und Elongation:	60 Sek bei 60 °C

Mit entsprechender Software (MxPro™ qPCR, Stratagene) wurden die Ergebnisse anschließend ausgewertet und dokumentiert. Der Test war gültig, sofern die Standardkurve auswertbar war und in den Negativkontrollen keine Reaktivität bemerkt wurde. Proben mit positivem Genomnachweis wurden zur Absicherung der Ergebnisse wiederholt untersucht.

10.2.3.2. 12s-rRNA-Gen-spezifische quantitative real-time PCR

Die Aufbereitung der Proben, sowie die Durchführung der PCR zur Amplifikation von 12s-rRNA-Gen-Sequenzen aus dem Schaf- und Rindergenom erfolgten wie bei der zuvor beschriebenen OvHV-2-spezifischen real-time PCR. Der Master Mix wurde hier jedoch nach folgendem Protokoll hergestellt:

Mastermix 12s-rRNA-Gen-spezifische real-time PCR:

(für 20 µl Ansatz)

DEPC-H ₂ O	4,3 µl
2 X Quantitect Multiplex Mastermix	10,0 µl
12s forward Primer (finale Konz.: 150 nM)	0,15 µl
12s reverse Primer (finale Konz.: 150 nM)	0,15 µl
12s Sonde (finale Konz.: 40 nM)	0,4 µl

Standardkurven wurden aus extrahierter DNA aus Rinder- oder Schafleukozyten generiert, deren Zellgehalt zuvor mittels Zellzählung in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer definiert wurde.

10.3. Analyse kultivierter OvHV-2-positiver Lymphozyten

10.3.1. Kultivierung OvHV-2-positiver Lymphozyten

Vor Isolieren der Lymphozyten OvHV-2-positiver Rinder wurden zunächst die Erythrozyten in der Blutprobe lysiert und anschließend die Leukozyten mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Dazu wurden 20 bis 25 ml der gerinnungsgehemmten Blutprobe mit derselben Menge an sterilem Erythrozytenlysispuffer versetzt und zehn Minuten lang inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 800 x g für zehn Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50 ml Lysispuffer resuspendiert. Nach erneuter Inkubation und anschließendem Pelletieren der Zellen folgte ein zweimaliges Waschen der Leukozyten mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} nach gleicher Vorgehensweise. Zuletzt wurde das Leukozytenpellet in 6 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} resuspendiert.

Die Präparation der Lymphozyten wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Separationsmediums (Lymphoprep™) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für das Waschen der isolierten Zellen wurde anschließend zweimal je 10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verwendet und beim dritten Mal Zellkulturmedium, welches sich wie folgt zusammensetzte:

Iscove's Medium mit	
FBS	10 %
Antibiotika (100 X Anti-Anti)	1 %
Glutamin	1 %
2-Mercaptoethanol (5×10^{-5} M)	0,002 %
IL-2 (1 mg/ml)	0,002 %

Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellen in dieser Suspension gezählt. Es wurde eine Trypanblaufärbung (Lebend-Tot-Färbung) durchgeführt, indem 20 μl der Ausgangszellsuspension mit 1,98 ml Trypanblaulösung eingefärbt wurden. Diese wurde zuvor wie folgt hergestellt: 0,5 ml Trypanblau 0,5 % (w/v) + 9,4 ml PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} . Nach Auszählen der intakten, nicht

angefärbten Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Anzahl lebender Zellen in 1 ml der Ausgangssuspension als Produkt aus gezählten Zellen und der Kammerkonstanten berechnet:

$$\begin{array}{l} \text{Anzahl Zellen} \\ \text{in der Ausgangs-} \\ \text{suspension (1 ml)} \end{array} = \text{gezählte Zellen} \times 500\,000$$

In eine sterile 25 cm² Zellkulturschale wurden 1 x 10⁶ Zellen in 10 ml Medium eingesetzt und anschließend im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ stehend inkubiert. Je nach Bedarf wurde ein- bis zweimal pro Woche ein Medienwechsel durchgeführt und nach Erhöhung der Zelldichte fand eine Passagierung der Lymphozyten durch Aufteilen der Zellsuspension auf zwei Zellkulturschalen und Zugabe von jeweils 5 ml neuen Mediums statt.

10.3.2. Untersuchungen zum relativen OvHV-2-Genomgehalt

Aus einem Aliquot der Suspensionszellen wurden die kultivierten Lymphozyten durch Pelletieren bei 800 x g für 10 Minuten isoliert. Die Extraktion der DNA erfolgte entsprechend der Vorgehensweise bei Blutleukozyten (Kap. III.10.2.1). Der OvHV-2-Genomgehalt wurde relativ zum Zellgehalt mittels OvHV-2-spezifischer und 12s-rRNA-Gen-spezifischer real-time PCR quantifiziert (Kap. III.10.2.3).

10.3.3. Untersuchung der Stimulierbarkeit kultivierter Lymphozyten durch verschiedene Mitogene

Die Lymphozyten des Rindes 97/21 wurden am Tag 125 nach Beginn der Kultivierung auf ihre Stimulierbarkeit durch Mitogene untersucht. Zum Vergleich und als Kontrolle dienten frisch isolierte Lymphozyten eines gesunden Rindes. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 1 x 10⁶/ 100 µl Zellkulturmedium eingestellt. In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden von beiden Proben jeweils 100 µl der

Zellsuspensionen in je vier Vertiefungen pipettiert. Es wurden drei verschiedene Mitogene eingesetzt: Concanavalin A (ConA), Phytohämagglutinin (PHA) und Pokeweed Mitogen (PWM). Die Mitogene wurden mit Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt. Je Ansatz wurden 100 µl der entsprechenden Mitogensuspension zugegeben, wobei jeweils eine Kontrolle ohne Mitogene belassen wurden (Abb. III.2). Anschließend wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt, auf dem automatischen Plattenschüttler kurz geschüttelt und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse wurden mit dem Lichtmikroskop bei 400-facher Primärvergrößerung beurteilt und dokumentiert.

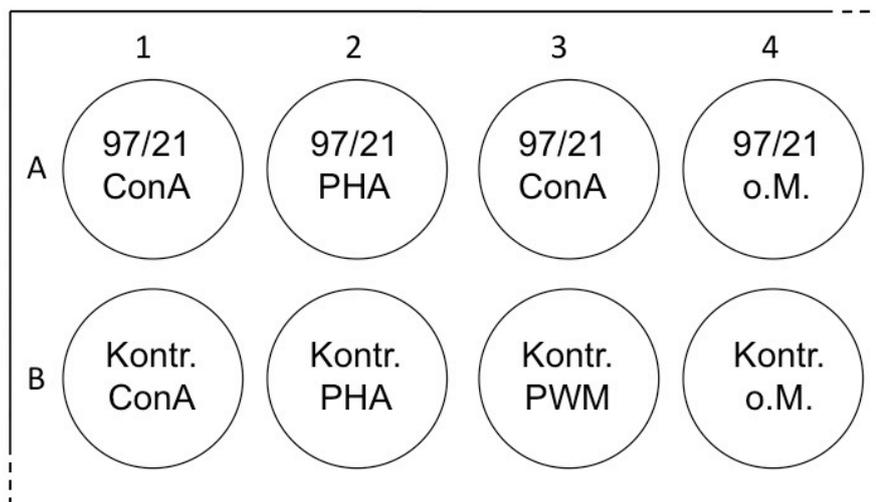


Abb. III.2: Ausschnitt der Mikrotiterplatte für die Untersuchung der Stimulierbarkeit von Zellen mit Mitogenen; A1 bis A4: kultivierte Lymphozyten des Rindes 97/21 mit drei unterschiedlichen Mitogenzugaben (ConA, PHA und PWM) und einer negativen Kontrolle ohne Mitogene (o.M.); B1 bis B4: Lymphozyten eines gesunden Rindes (Kontr.) mit den entsprechenden Mitogenzugaben und ohne Mitogene

IV. ERGEBNISSE

1. Prävalenz von OvHV-2-Infektionen in selektierten bayerischen Betrieben

1.1. Prävalenzen von Antikörpern gegen BKF-Erreger bei Rindern und Schafen

Seren aus fünf Rinder- und sechs Schafbeständen der Studiengruppe 1, sowie neun Rinder- und acht Schafbeständen der Gruppe 2 wurden mittels kompetitivem ELISA (Malignant Catarrhal Fever Virus cELISA, VMRD) untersucht. Da die Produktion des kommerziell erhältlichen Tests im Laufe der Arbeiten eingestellt wurde, konnten nicht alle genommenen Proben und somit nicht Seren aus allen 20 Rinder- und Schafbeständen untersucht werden.

Zur Bestimmung der Antikörper-Prävalenz wurden nur Seren von Rindern und Schafen ab einem Alter von vier Monaten untersucht. Eine Beeinflussung der Daten durch die Detektion maternaler Antikörper sollte auf diese Weise sicher ausgeschlossen werden.

Es wurden insgesamt 505 Rinder und 304 Schafe serologisch untersucht. Bei einigen Proben, insbesondere bei den Rinderseren, lagen die Testergebnisse nahe dem vom Hersteller angegebenen Cut-Off-Wert von 25 % (Kap. III.10.1). Seren, deren Werte sich auch nach mehrmaliger Wiederholung des Tests in einem Bereich von zwei Prozentpunkten um den vorgegebenen Cut-Off-Wert bewegten, waren nicht eindeutig als Antikörper-positiv oder -negativ einzustufen. Abweichend von den Herstellerangaben wurde für solche Proben ein Grenzbereich (23 % bis 27 %) eingeführt.

Die prozentuale Häufigkeit des Nachweises BKF-Erreger-spezifischer Antikörper in den insgesamt 505 getesteten Seren von Rindern ab einem Alter von vier Monaten sind in Abbildung IV.1 dargestellt.

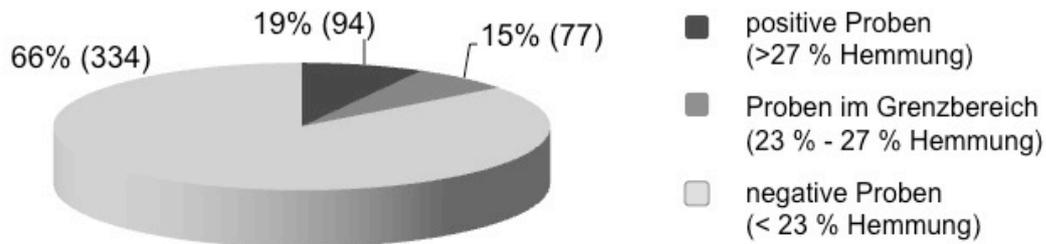


Abb. IV.1: Häufigkeit des Nachweises von Antikörpern gegen BKF-Erreger mittels kompetitivem ELISA (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) in den Seren der untersuchten Rinder ab einem Alter von 4 Monaten (n = 505)

Die Ergebnisse des kompetitiven ELISA für die getesteten Seren von insgesamt 304 Schafen, die bei Probennahme vier Monate oder älter waren, sind in Abbildung IV.2 aufgeführt. Im Gegensatz zu dem hohen Anteil an grenzwertig einzustufenden Rinderseren lag nur 1 % der Proben der Schafe im Grenzbereich um den Cut-Off-Wert.

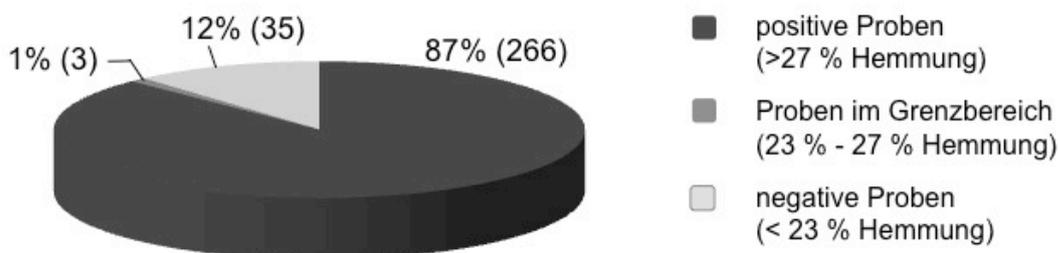


Abb. IV.2: Häufigkeit des Nachweises von Antikörpern gegen BKF-Erreger mittels kompetitivem ELISA (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) in den Seren der untersuchten Schafe ab einem Alter von 4 Monaten (n = 304)

Im Vergleich der Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der beiden Studiengruppen wurden insbesondere in der Häufigkeit des Antikörpernachweises bei Schafen deutliche Unterschiede offensichtlich (Abb. IV.3 C und D). 98 % (n = 139) der Schafe aus Betrieben der Gruppe 1, in denen zwischen Januar 2007 und Dezember 2009 BKF-

Erkrankungen aufgetreten waren, hatten im ELISA nachweisbare Antikörper gegen Erreger des BKF. Im Vergleich zur Anzahl seropositiver Schafe in der zweiten Gruppe machte dies einen Unterschied von 20 Prozentpunkten aus. Der Vergleich der Häufigkeit des Vorkommens von Rindern mit nachweisbaren Antikörpern gegen BKF-Erreger zwischen den beiden Studiengruppen ließ einen weniger deutlichen Unterschied erkennen (Abb. IV.3 A und B). Hier lag die Anzahl seropositiver Rinder in Gruppe 1 aber dennoch um acht Prozentpunkte höher als in Gruppe 2.

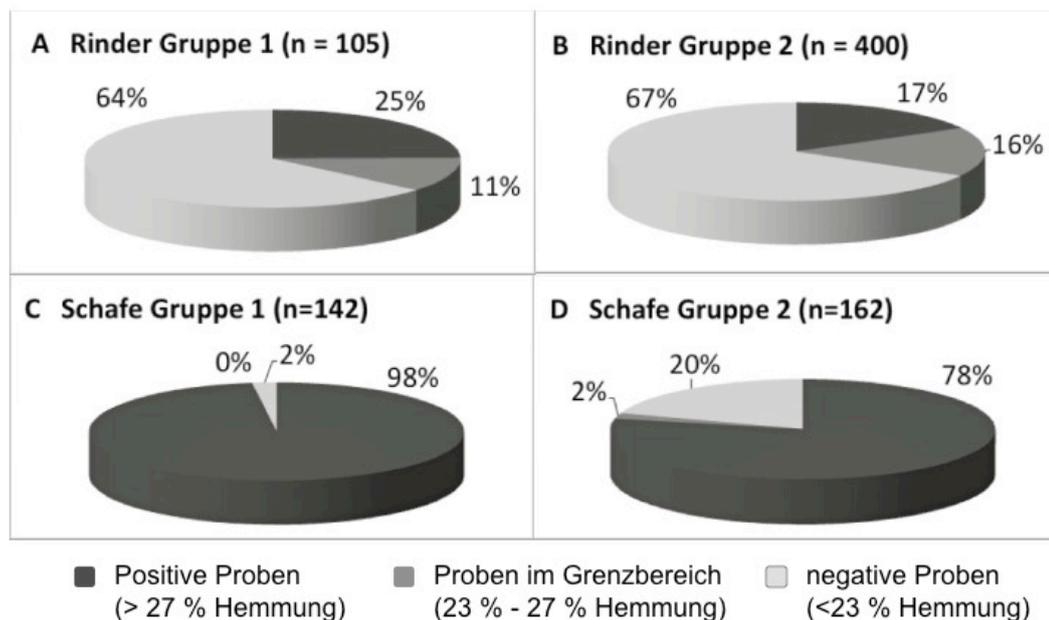


Abb. IV.3: Häufigkeit des Nachweises von Antikörpern gegen BKF-Erreger mittels kompetitivem ELISA (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) in den Seren der untersuchten Rinder und Schafe ab einem Alter von 4 Monaten. Die Daten der beiden Studiengruppen sind getrennt aufgeführt. A und C: Betriebe der Gruppe 1, in denen klinisches BKF diagnostiziert wurde. B und D: Betriebe der Gruppe 2, in denen keine BKF-Symptome beobachtet worden waren.

Aus Abbildung IV.3 wird außerdem noch einmal deutlich, dass im Gegensatz zu den Proben der Schafe die Rinderseren häufig im Grenzbereich um den Cut-Off-Wert des ELISA lagen. Die Anzahl der als grenzwertig eingestufte Proben war in Gruppe 2 sogar fast ebenso hoch wie die der positiv getesteten Seren.

Die Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern innerhalb der einzelnen untersuchten Rinder- und Schafherden wurden basierend auf den vorausgegangenen statistischen Planungen (Kap. III.5) aus den Ergebnissen der serologischen Stichprobenuntersuchungen für den Gesamtbestand ermittelt und sind im Folgenden erläutert.

Innerhalb der 14 Rinderbestände reichten die Seroprävalenzen in den einzelnen Herden von 0,0 % bis 35,7 % (Abb. IV.4). Die Werte wiesen dabei eine hohe Streuung auf. Der Medianwert lag bei Betrieben der Gruppe 1 mit 23,5 % höher als der von solchen der Gruppe 2 mit 16,3 % (Abb. IV.5).

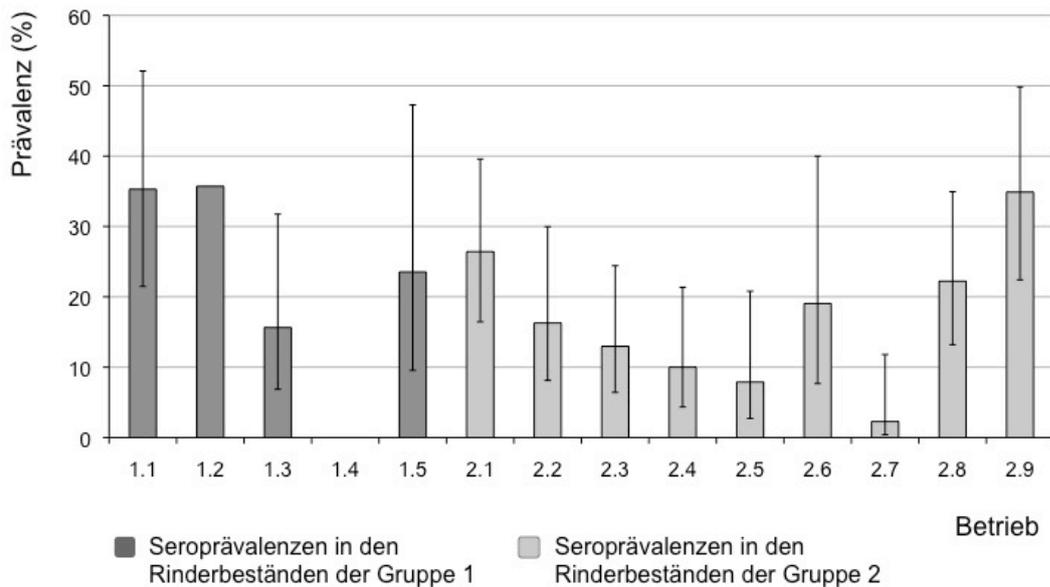


Abb. IV.4: Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den Rinderherden von fünf Betrieben der Gruppe 1 (Betriebe 1.1 bis 1.5) und neun Betrieben der Gruppe 2 (Betriebe 2.1 bis 2.9). Das 95%-Konfidenzintervall ist als dünne Linie angegeben. Wenn kein Konfidenzintervall dargestellt ist, wurden alle Rinder des Bestandes untersucht.

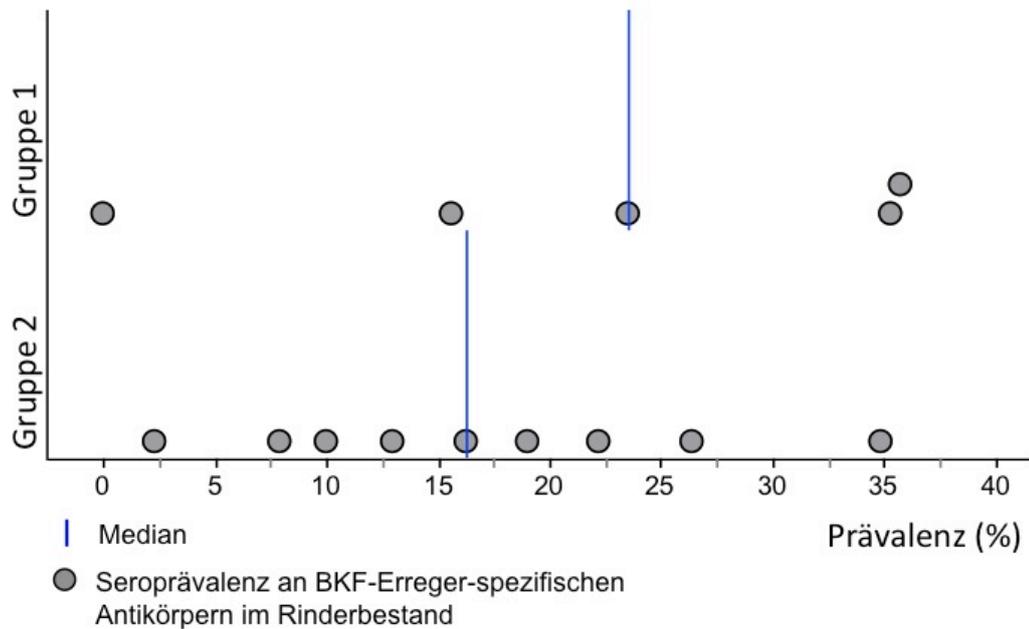


Abb. IV.5: Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den Rinderherden von fünf Betrieben der Gruppe 1 (obere Punktreihe) und neun Betrieben der Gruppe 2 (untere Punktreihe). Der Median ist jeweils als blaue Linie eingezeichnet.

In den 14 untersuchten Schafherden waren die bestandsspezifischen Seroprävalenzen wesentlich höher und erreichten Werte zwischen 55,0 % und 100,0 % (Abb. IV.6). Die Seroprävalenzen in den Schafbeständen der ersten Gruppe waren deutlich höher als die der zweiten Gruppe. In drei Betrieben (Betriebe 1.1, 1.4 und 1.6) wurden in der gesamten Schafherde Antikörper gegen BKF-Erreger nachgewiesen, in einem weiteren (Betrieb 1.3) ist dies aufgrund der statistischen Hochrechnung anzunehmen. Der Median der Seroprävalenzen der sechs Herden in Gruppe 1 betrug 100,0 %. In Betrieben der Gruppe 2 wurde in keiner Schafherde eine Antikörperprävalenz von 100,0 % erreicht. Die Seroprävalenzen in diesen acht Schafbeständen waren mit einer Ausnahme (Betrieb 2.1) alle niedriger als in Gruppe 1 und auch der Medianwert von 73,0 % lag um 27 Prozentpunkte niedriger (Abb. IV.7). Die Differenz zwischen den Mittelwerten der Antikörper-Prävalenzen in Beständen der Gruppe 1 von 98,9 % und denen der Gruppe 2 von 75,9 % betrug 23 Prozentpunkte.

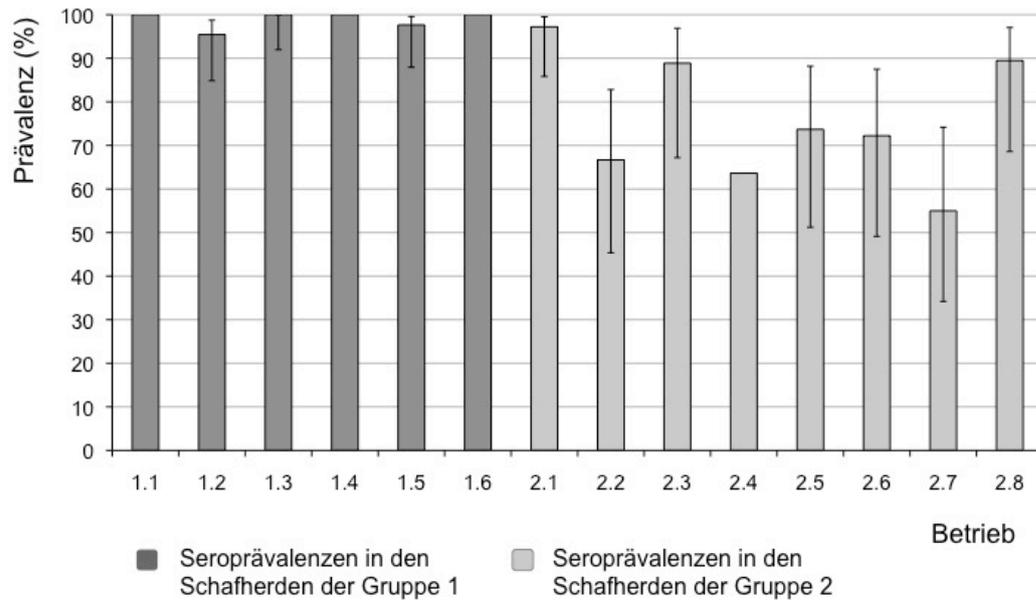


Abb. IV.6: Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den Schafherden von sechs Betrieben der Gruppe 1 (Betriebe 1.1 bis 1.6) und acht Betrieben der Gruppe 2 (Betriebe 2.1 bis 2.8). Das 95%-Konfidenzintervall ist als dünne Linie angegeben. Wenn kein Konfidenzintervall dargestellt ist, wurden alle Schafe des Bestandes untersucht.

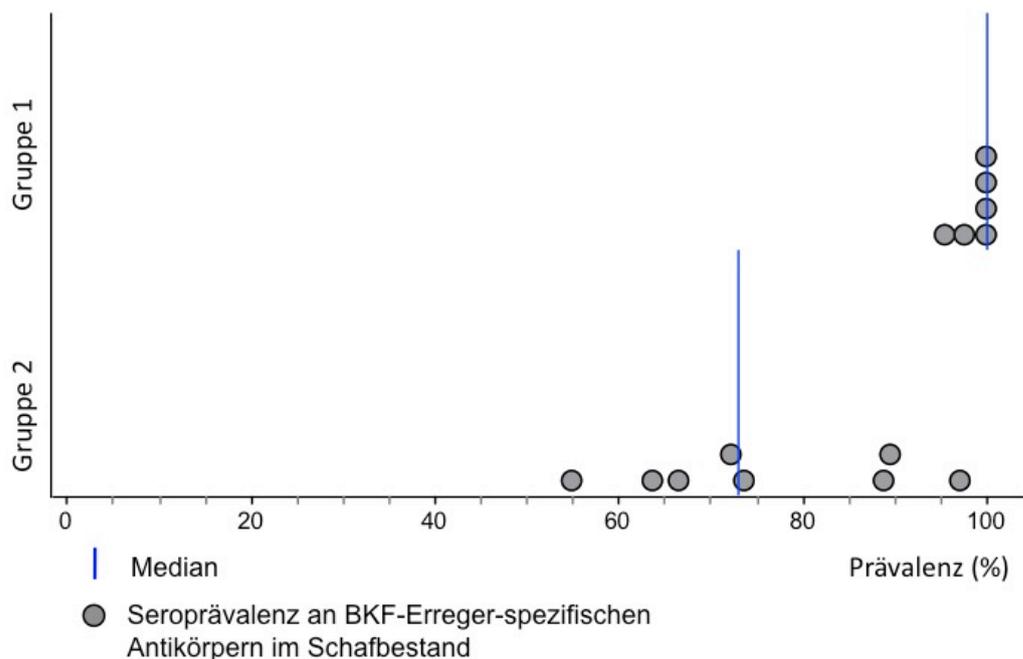


Abb. IV.7: Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den Schafherden von sechs Betrieben der Gruppe 1 (obere Punktreihe) und acht Betrieben der Gruppe 2 (untere Punktreihe). Der Median ist jeweils als blaue Linie eingezeichnet.

Zusammenfassend wurden in den untersuchten Schafherden insgesamt sehr hohe Seroprävalenzen festgestellt und auch eine überraschend hohe Anzahl an Rinderseren reagierte im verwendeten ELISA. Interessanterweise geht sowohl aus den serologischen Untersuchungen der tatsächlich getesteten Proben, als auch aus den statistisch ermittelten Herdenprävalenzen hervor, dass Betriebe der Gruppe 1 deutlich mehr Tiere mit Antikörpern gegen BKF-Erreger im Bestand hatten. Die Seroprävalenzen in den Schafherden beider Studiengruppen unterschieden sich sogar signifikant voneinander ($p = 0,004$).

1.2. Prävalenzen an OvHV-2-Infektionen bei Rindern und Schafen

Insgesamt wurden EDTA-Blutproben von 801 Rindern und 366 Schafen aus 20 beziehungsweise 19 Studienbetrieben mittels OvHV-2-spezifischer seminested PCR auf die Präsenz von OvHV-2-DNA untersucht.

Zur Bestimmung der OvHV-2-Prävalenz wurden nur Proben von Schafen ab einem Alter von vier Monaten untersucht, da aus der Literatur (Li et al. 1998; Li et al. 1999) bekannt ist, dass die Erstinfektion von Lämmern erst ab einem Alter von zwei bis drei Monaten stattfindet. Proben von Rindern wurden aufgrund des Mangels an Daten von Tieren jeden Alters untersucht (Kap. II.3).

OvHV-2-Genom wurde bei 13 (1,6 %) der 801 untersuchten Rinder nachgewiesen, von denen zwei Tiere kurz vor bzw. nach der Probennahme akut an BKF erkrankten. Bei elf Rindern gab es jedoch im gesamten Studienzeitraum von Januar 2008 bis Dezember 2009 keinerlei Hinweise auf klinisches BKF, woraufhin diese Tiere als subklinisch OvHV-2-infiziert definiert wurden (Abb. IV.8).

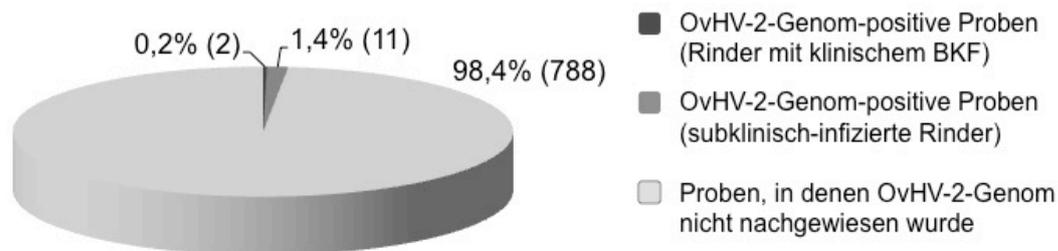


Abb. IV.8: Häufigkeit des Nachweises von OvHV-2-DNA mittels seminested PCR in den Blutproben der untersuchten Rinder (n=801)

Die 13 OvHV-2-infizierten Rinder stammten aus nur fünf der 20 untersuchten Rinderbestände, welche alle der Studiengruppe 1 angehörten. Demnach standen in diesen Beständen im Zeitraum von Januar 2007 bis Dezember 2009 auch klinisch an BKF erkrankte Rinder. Die Prävalenz an OvHV-2-Infektionen beim Rind erreichte dort Werte von

4,6 % bis 14,3 %. In den 15 weiteren Rinderbeständen wurde bei keinem der untersuchten Tiere OvHV-2-DNA nachgewiesen, die OvHV-2-Prävalenz dieser Betriebe lag somit bei 0,0 % (Abb. IV.9).

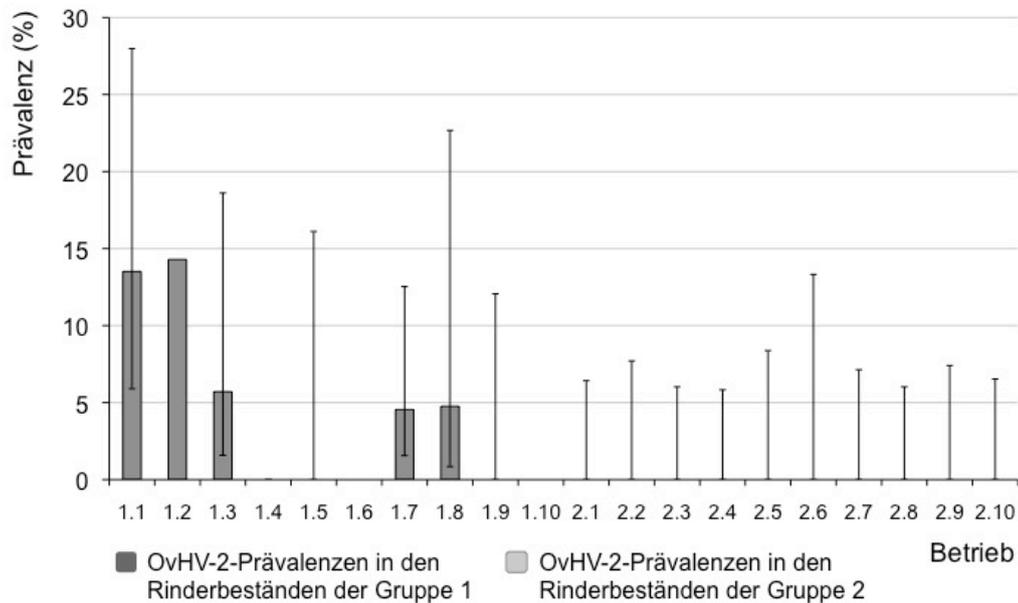


Abb. IV.9: Prävalenzen an OvHV-2-Infektionen der Rinder (OvHV-2-Genomnachweis mittels seminested PCR) in zehn Rinderbeständen der Gruppe 1 (Betriebe 1.1 bis 1.10) und zehn Rinderbeständen der Gruppe 2 (Betriebe 2.1 bis 2.10). Das 95%-Konfidenzintervall ist als dünne Linie angegeben. Wenn kein Konfidenzintervall dargestellt ist, wurden alle Rinder des Bestandes untersucht.

Für alle zehn Betriebe der Gruppe 1 ergab sich für die Prävalenz der OvHV-2-Infektion bei Rindern ein Medianwert von 2,3 %. Der Median in den fünf betroffenen Betrieben 1.1, 1.2, 1.3, 1.7 und 1.8 lag bei 5,7 % (Abb. IV.10), der Mittelwert betrug 8,5 %.

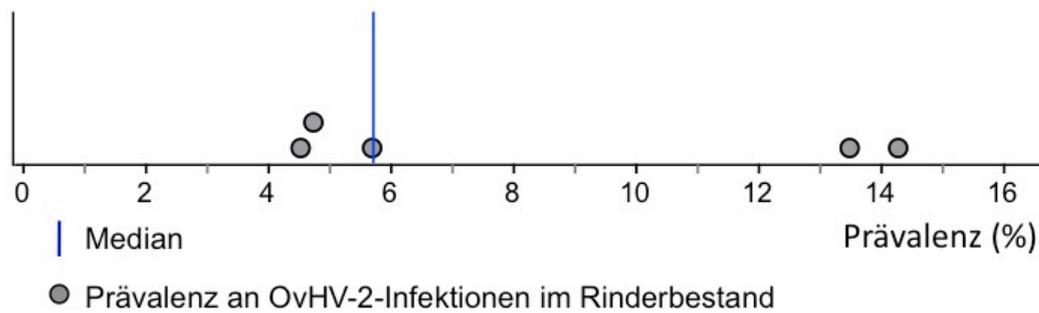


Abb. IV.10: Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen der Rinder in den Betrieben 1.1, 1.2, 1.3, 1.7 und 1.8. Der Median ist als blaue Linie eingezeichnet.

Unter Ausschluss der beiden Rinder, die akut an BKF erkrankt waren, erreichte die Prävalenz der subklinischen OvHV-2-Infektionen in den oben aufgeführten fünf Betrieben im Mittel noch 7,5 %, der Median blieb mit 5,7 % unverändert.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Rinder wurden bei den Schafen wesentlich häufiger OvHV-2-Genome nachgewiesen. Es wurden insgesamt 366 Schafe ab einem Alter von vier Monaten aus 19 Studienbetrieben mittels seminested PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung IV.12 aufgeführt.

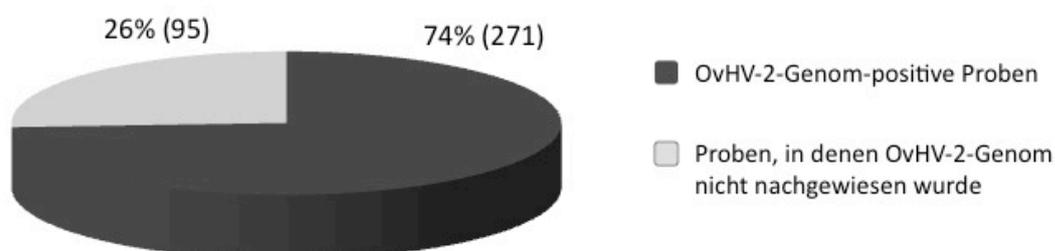


Abb. IV.11: Häufigkeit des Nachweises von OvHV-2-DNA mittels seminested PCR in den Blutproben der untersuchten Schafe ab einem Alter von vier Monaten (n = 366)

Ähnlich der Ergebnisse der serologischen Untersuchungen, wurden auch in den PCR-Untersuchungen deutliche Unterschiede in der Anzahl OvHV-2-positiv getesteter Schafe ab einem Alter von vier Monaten zwischen den beiden Studiengruppen festgestellt (Abb. IV.12).

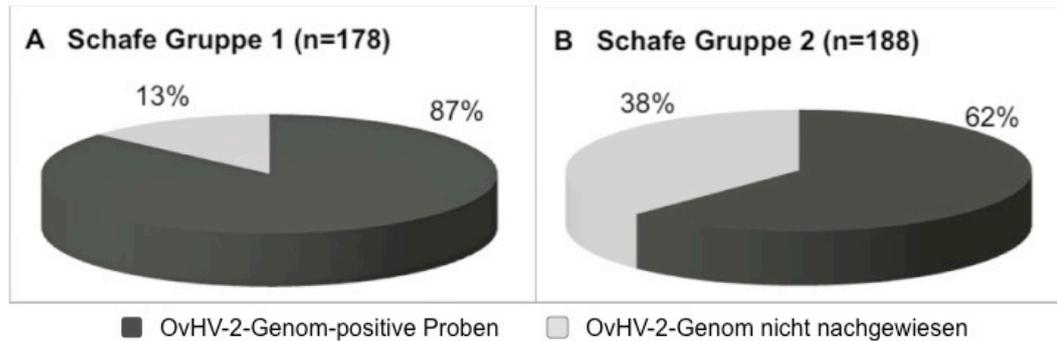


Abb. IV.12: Häufigkeit des Nachweises von OvHV-2-DNA mittels seminested PCR in den Blutproben der untersuchten Schafe ab einem Alter von vier Monaten. Die Daten der beiden Studiengruppen sind getrennt aufgeführt. A: Betriebe der Gruppe 1, in denen klinisches BKF diagnostiziert wurde. B: Betriebe der Gruppe 2, in denen keine BKF-Symptome beobachtet worden waren.

Die Herdenprävalenzen an OvHV-2-Infektionen in den Schafherden der 19 untersuchten Bestände lagen zwischen 20,0 % und 100,0 %. Betrieb 1.7 hatte den Schafbock, der in den Wintermonaten 2008/2009 im Rinderstall eingestellt war, bereits vor der Beprobung des Bestandes abgeschafft, weshalb für diesen Betrieb keine Prävalenzaussagen getroffen werden konnten (Abb. IV.13). Der Median der Prävalenzen an OvHV-2-Infektionen der Schafe lag in den 19 untersuchten Herden bei 71,8 %, der Mittelwert lag mit 68,4 % etwas niedriger.

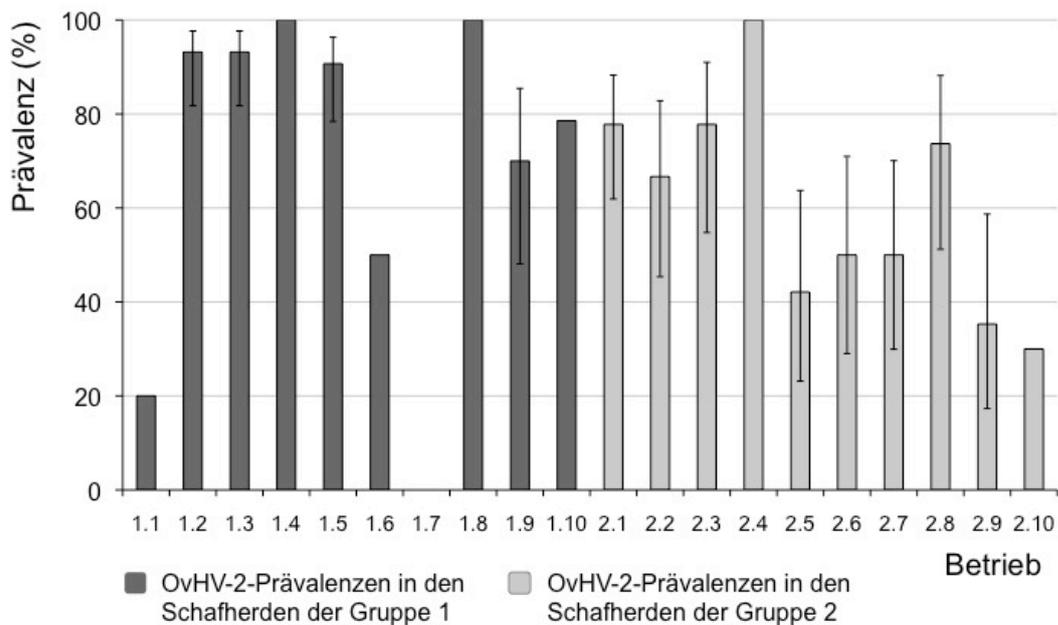


Abb. IV.13: Prävalenzen an OvHV-2-Infektionen der Schafe (Virusgenomnachweis mittels seminested PCR) in neun Betrieben der Gruppe 1 (Betriebe 1.1 bis 1.6 und 1.8 bis 1.10) und zehn Betrieben der Gruppe 2 (Betriebe 2.1 bis 2.10). Betrieb 1.7 hatte seinen Schafbestand zum Zeitpunkt der Probennahme bereits abgeschafft. Das 95%-Konfidenzintervall ist als dünne Linie angegeben. Wenn kein Konfidenzintervall dargestellt ist, wurden alle Schafe des Bestandes untersucht.

Im Vergleich zwischen den beiden Studiengruppen wiesen die Betriebe der Gruppe 1 insgesamt höhere Herdenprävalenzen auf. Es wurden hier ein Medianwert von 91,9 % und ein Mittelwert von 77,3 % erreicht. Die Prävalenzen in Betrieben der Gruppe 2 hingegen lagen mit einem Median von 58,3 % und einem Mittelwert von 60,3 % auch hier wieder deutlich unter dem der Betriebe in Gruppe 1 (Abb. IV.14).

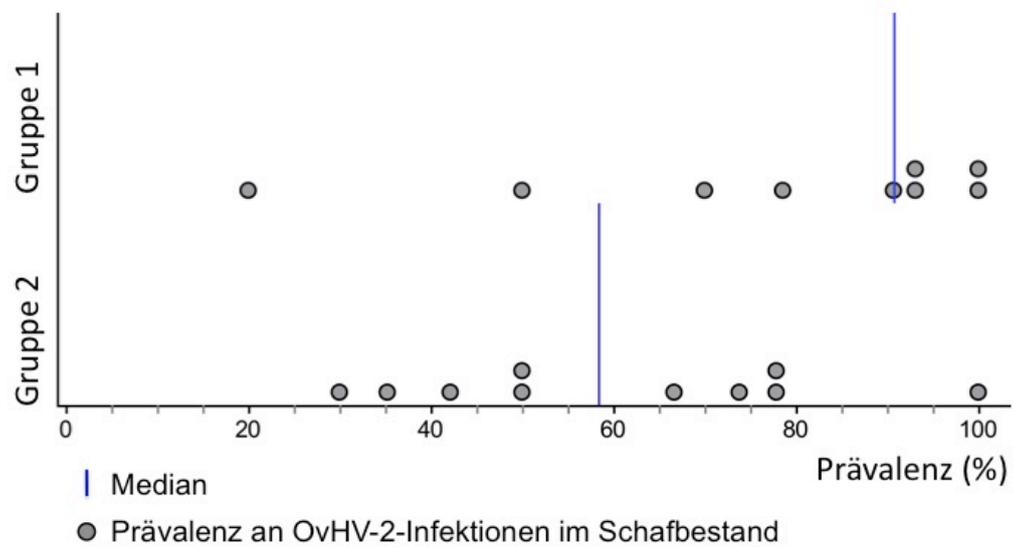


Abb. IV.14: Prävalenzen der OvHV-2-Infektionen bei Schafen in neun Betrieben der Gruppe 1 (obere Punktreihe) und zehn Betrieben der Gruppe 2 (untere Punktreihe). Der Median ist jeweils als blaue Linie eingezeichnet.

1.3. Vergleich der anamnestischen Daten beider Studiengruppen

Die mittels Fragebogen (siehe Anhang) erhobenen anamnestischen Daten zu den 20 Betrieben wurden als Vergleich der beiden Studiengruppen ausgewertet und sind in Tabelle IV.1 zusammengefasst aufgeführt.

Tab. IV.1: Zusammenfassung der anamnestischen Daten von zehn Betrieben mit klinischen BKF-Erkrankungen bei Rindern zwischen Jan. 2007 und Dez. 2009 (Gruppe 1) und zehn Betrieben ohne BKF-Fälle in diesem Zeitraum (Gruppe 2)

		GRUPPE 1	GRUPPE 2
Betriebsform		5 Milchvieh-, 3 Mast-, 2 Mutterkuhbetriebe	10 Milchviehbetriebe
Tierzahlen	Rinder	8 - 162 Tiere (MW 57, Median 35)	37 - 183 Tiere (MW 112, Median 110)
	Schafe	1 - 95 Tiere (MW 31, Median 13)	10 - 58 Tiere (MW 24, Median 22)
weitere Tiere	Ziegen	in 1 Betrieb	in 1 Betrieb
	andere	in 8 Betrieben	in 7 Betrieben
BKF-Fälle ab Jan. 2007		15 Fälle bei Rindern	keine Fälle
BKF-Fälle vor Jan. 2007		3 Fälle bei Rindern	3 Fälle bei Rindern
Kontakt direkt (auch zeitweise)		in 7 Betrieben	in 4 Betrieben
Kontakt indirekt (ja/möglich)		in 10 Betrieben	in 10 Betrieben
Kontakt extern	Pensionstiere	in 2 Betrieben	in keinem Betrieb
	Tierklinik	in 1 Betrieb	in 3 Betrieben
	Markt	in 1 Betrieb	in 2 Betrieben
	Wanderschäfer	in keinem Betrieb	in 2 Betrieben
	Nachbartiere	in 2 Betrieben	in 1 Betrieb
Zukäufe	Rinder	in 5 Betrieben	in 3 Betrieben
	Schafe	in 1 Betrieb	in keinem Betrieb
Bock von Extern		in 4 Betrieben	in 6 Betrieben
Haltung Schafe	Gruppenhaltung	in 9 Betrieben	in 10 Betrieben
	Stroh	in 10 Betrieben	in 10 Betrieben
	Weide-/ Hütelhaltung	in 9 Betrieben	in 10 Betrieben
Haltung Rinder	Kühe	in 5 Betrieben Anbindehaltung, in 4 Laufstallhaltung, in 1 keine Kühe	in 3 Betrieben Anbindehaltung, in 7 Laufstallhaltung
	Jungvieh	in 7 Betrieben Anbindehaltung, in 3 Laufstallhaltung	in 1 Betrieb Anbindehaltung, in 9 Laufstallhaltung
	Kälber	in 6 Betrieben Box, in 3 Iglu, in 1 keine Kälber; 3 davon Gruppenhaltung	in 6 Betrieben Box, in 4 Iglu; 9 davon Gruppenhaltung
	Kühe Stroh	in 6 Betrieben	in 5 Betrieben
	Jungvieh Stroh	in 7 Betrieben	in 5 Betrieben
	Rinder Weide	in 3 Betrieben	in 3 Betrieben

MW Mittelwert

Die Rinderbestände in Betrieben der ersten Gruppe waren durchschnittlich kleiner, die Schafherden größer als solche der zweiten Gruppe und bei vier Betrieben der Gruppe 1 (Betriebe 1.2, 1.3, 1.5 und 1.10) war die Anzahl der gehaltenen Schafen sogar höher als die der Rinder. In Betrieben der Gruppe 1 ergibt sich aus der Anzahl gehaltener Schafe zu der Zahl an Rindern im Bestand im Median ein Verhältnis von 0,6. In Betrieben der Gruppe 2 dagegen kommen im Median auf ein Rind nur 0,3 Schafe.

Fünf Betriebe der Gruppe 1 (Betriebe 1.1, 1.2, 1.3, 1.7 und 1.10) hatten zwischen Januar 2007 und Dezember 2009 jeweils zwei Rinder mit klinisch manifestem BKF, in den anderen fünf Betrieben dieser Gruppe trat nur jeweils ein BKF-Fall bei den Rindern auf. Betrieb 2.6 hatte einen Fall, der zum Zeitpunkt der Probennahme bereits etwa zehn Jahre zurück lag. In Betrieb 2.7 wurde bei zwei Rindern zwei und drei Jahren vor der Beprobung SA-BKF diagnostiziert. In Betrieb 1.10 wurde ein dritter BKF-Fall im Bestand im Januar 2010 nachgewiesen.

Direkter Kontakt zwischen Rindern und Schafen wurde hier definiert als Haltung beider Tierarten - auch zeitweise - in einem gemeinsamen Stall oder gleichzeitig auf derselben oder direkt angrenzenden Weide. Dies traf in Gruppe 1 auf eine größere Anzahl von Betrieben zu als in Gruppe 2. In sieben Betrieben der ersten Gruppe waren vor Eintreten der ersten BKF-Fälle Schafe zusammen mit den Rindern im selben Stall untergebracht. Zwei weitere Betriebe hielten im Winter beide Tierarten zumindest im selben Gebäude. In neun Betrieben der Gruppe 2 hingegen waren die Ställe der Rinder und Schafe strikt voneinander getrennt und lediglich ein Betrieb (Betrieb 2.5) hatte die Schafe im Winter im Rinderstall untergebracht. In einem weiteren (Betrieb 2.4) lag die letzte direkte Kontaktmöglichkeit zwischen Rindern und Schafen bereits mehrere Jahre zurück und zwei Betriebe (Betriebe 2.3 und 2.9) hatten angrenzende Weideflächen der Schafe und Jungrinder.

Indirekter Kontakt zwischen Rindern und Schafen über Personen, Geräte oder Weidewechsel war in allen 20 Betrieben möglich. Kontakt zu Rindern oder Schafen außerhalb des Betriebes sowie Zukäufe kamen ebenso in beiden Gruppen vor.



Abb. IV.15: Direkter Kontakt zwischen den Rindern und Schafen auf einem Betrieb der Gruppe 1 (Betrieb 1.8). Die Zebukälber und Schafe teilten sich hier dauerhaft Stall und Auslauf.

Die Schafe wurden bis auf einen Fall als gesamte Herde auf Stroh gehalten und hatten saisonal oder ganzjährig Weidegang. Betrieb 1.7 hatte lediglich ein Schaf über die Wintermonate im Rinderstall eingestellt. Bezüglich der Haltung der Rinder war eine Laufstallhaltung der Kühe und Jungrinder vermehrt in Gruppe 2 zu finden, wo auch der Bestand an Rindern im Durchschnitt größer war. In der ersten Gruppe war sowohl bei den Kühen als auch bei den Jungrindern noch häufiger Anbindehaltung vorzufinden.

In einem statistischen Vergleich der beiden Betriebsgruppen mittels Mann-Whitney- und Chi-Quadrat-Test ließ sich für zwei der abgefragten Parameter ein signifikanter Unterschied feststellen. Die Tierzahlen der Rinder waren in Betrieben der Gruppe 1 signifikant kleiner als die der Gruppe 2 ($p = 0,02$). Zudem unterschied sich die Haltung der Jungrinder in Betrieben der ersten Studiengruppe, in denen vermehrt Anbindehaltung vorlag, und solchen der zweiten Gruppe mit fast ausschließlich Laufstallhaltung signifikant voneinander ($p = 0,01$). In allen anderen in der Tabelle aufgeführten Daten waren keine statistisch relevanten Differenzen festzustellen.

2. Weiterführende Untersuchungen einzelner OvHV-2-infizierter Rinder und Schafe

2.1. Antikörper- und OvHV-2-Genomnachweis bei einzelnen Rindern und Schafen

Tiere, bei denen OvHV-2-Genom im Blut nachgewiesen wurde, wurden zum Teil mehrfach beprobt. Die wiederholte Untersuchung diente zum einen der Absicherung der Diagnose einer subklinischen OvHV-2-Infektion und zum anderen der Verfolgung des Infektionsverlaufs. Einheitliche zeitliche Abstände zwischen den Probennahmen sowie eine mehrfache Probennahme aller 13 OvHV-2-infizierter Rinder waren aus logistischen Gründen nicht möglich. Die Ergebnisse des Antikörpernachweises mittels ELISA (Kap. III.10.1) sowie des OvHV-2-Genomnachweises im Blut und Nasentupfermaterial der untersuchten Tiere (Kap. III.10.2) sind in Tabelle IV.2 aufgeführt.

Tab. IV.2: Nachweise von Antikörpern gegen BKF-Erreger im Serum (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) und von OvHV-2-DNA im Blut und Nasentupfermaterial (seminested PCR) ausgewählter Rinder zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Rinder mit klinischer BKF-Erkrankung:					
Tier	BKF-Status	Test	14.05.2008	04.12.2008	02.12.2009
1/11	Ende April 2008 akutes BKF, gesundet	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos pos	pos pos pos	n.u. pos pos
			14.05.2008		21.05.2008
1/32	Ende Mai 2008 akutes BKF, Euthanasie	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos n.u.		pos pos pos
subklinisch OvHV-2-infizierte Rinder, Untersuchungsabstand > 1 Monat:					
Tier	BKF-Status	Test	14.05.2008	04.12.2008	02.12.2009
1/12	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos n.u.	pos pos n.u.	n.u. pos n.n.

pos positiv

n.n. nicht nachgewiesen

NT Nasentupfermaterial

n.u. nicht untersucht (teilweise aufgrund der Produktionseinstellung des ELISA)

Fortsetzung Tab. IV.2:

subklinisch OvHV-2-infizierte Rinder, Untersuchungsabstand > 1 Monat:				
Tier	BKF-Status	Test	14.05.2008	14.12.2008
1/22	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos n.u.	n.n. n.n. n.u.
1/37	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos n.u.	pos pos n.u.
			09.09.2008	30.11.2009
30/5	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos n.u.	n.u. pos n.n.
30/19	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos n.u.	n.u. pos n.n.
subklinisch OvHV-2-infizierte Rinder, Untersuchungsabstand ca. 1 Monat:				
Tier	BKF-Status	Test	23.06.2009	22.07.2009
97/21	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	n.u. pos n.u.	n.u. pos pos
			24.07.2008	21.08.2008
22/5	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos n.u.	n.u. pos n.n.
22/7	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	pos pos n.u.	n.u. pos pos
subklinisch OvHV-2-infizierte Rinder ohne wiederholte Untersuchung:				
Tier	BKF-Status	Test	04.05.2009	
92/9	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	n.u. pos n.u.	
92/16	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	n.u. pos n.u.	
92/53	klinisch unauffällig	ELISA PCR (Blut) PCR (NT)	n.u. pos n.u.	

pos positiv

n.n. nicht nachgewiesen

NT Nasentupfermaterial

n.u. nicht untersucht (teilweise aufgrund der Produktionseinstellung des ELISA)

Die Rinder aus den Studienbetrieben, bei denen mittels seminested PCR eine OvHV-2-Infektion diagnostiziert wurde, waren zum Zeitpunkt der ersten Probennahme zwischen zweieinhalb Monaten und neun Jahren alt. Bis auf eine Ausnahme waren alle Tiere weiblichen Geschlechts und Fleckvieh-Rinder. Eines der Tiere war ein Bullenkalb der Rasse

Zwergzebu. Das akut an BKF erkrankte Rind (Tier 1248), das Patient an der Klinik für Wiederkäuer war, war eine Braunvieh-Kuh und hatte zum Zeitpunkt der Erkrankung und Probennahme ein Alter von drei Jahren (Tab. IV.3).

Tab. IV.3: Alter, Geschlecht und Rasse der einzelnen OvHV-2-infizierten Rinder

Rinder mit akuter BKF-Erkrankung:			
Tier	Alter (Jahre)	Geschlecht	Rasse
1248	3,0	weiblich	Braunvieh
1/11	0,8	weiblich	Fleckvieh
1/32	3,4	weiblich	Fleckvieh
Rinder mit subklinischer OvHV-2-Infektion:			
Tier	Alter (Jahre)	Geschlecht	Rasse
1/12	1,0	weiblich	Fleckvieh
1/22	2,0	weiblich	Fleckvieh
1/37	6,0	weiblich	Fleckvieh
30/5	3,2	weiblich	Fleckvieh
30/19	2,4	weiblich	Fleckvieh
97/21	0,2	männlich	Zwergzebu
22/5	2,0	weiblich	Fleckvieh
22/7	2,1	weiblich	Fleckvieh
92/9	1,3	weiblich	Fleckvieh
92/16	1,3	weiblich	Fleckvieh
92/53	9	weiblich	Fleckvieh

Neben den Nachuntersuchungen der OvHV-2-infizierten Rinder wurden auch drei zufällig ausgewählte infizierte Schafe zum Vergleich wiederholt untersucht. In Betrieb 1.1 wurde bei einem Mutterschaf, das bei Erstbeprobung vier Jahre alt war, zu allen Probennahmezeitpunkten eine Virusinfektion mittels OvHV-2-Genomnachweis (Kap. III.10.2) diagnostiziert. Im Nasentupfermaterial war OvHV-2-DNA aber lediglich bei der dritten Untersuchung nachweisbar. Bei zwei ca. einjährigen Schafen in Betrieb 1.8 war dagegen in beiden PCR-Untersuchungen OvHV-2-DNA im Nasentupfermaterial nachweisbar. Die Ergebnisse der PCR- und der ELISA-Untersuchungen der drei Schafe sind in Tabelle IV.4 aufgeführt.

Tab. IV.4: Nachweise von Antikörpern gegen BKF-Erreger im Serum (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) und von OvHV-2-DNA im Blut und Nasentupfermaterial (seminested PCR) bei ausgewählten Schafen zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Tier	Test	14.05.2008	04.12.2008	02.12.2009
1/S-5	ELISA	pos	pos	n.u.
	PCR (Blut)	pos	pos	pos
	PCR (NT)	n.n.	n.n.	pos
		23.06.2009		22.07.2009
97/S-1	ELISA	n.u.		n.u.
	PCR (Blut)	pos		n.u.
	PCR (NT)	pos		pos
97/S-2	ELISA	n.u.		n.u.
	PCR (Blut)	pos		n.u.
	PCR (NT)	pos		pos

pos positiv

n.n. nicht nachgewiesen

NT Nasentupfermaterial

n.u. nicht untersucht (teilweise aufgrund der Produktionseinstellung des ELISA)

2.2. Auswertung der klinischen Untersuchungen einzelner OvHV-2-infizierter Rinder

Im Blut von 13 Rindern wurden OvHV-2-Genome nachgewiesen. Zwölf der Tiere zeigten bei der ersten Probennahme jedoch keinerlei auf BKF hindeutende Symptomatik. Sechs dieser klinisch unauffälligen Rinder wurden bei weiteren Probennahmen erneut gründlich untersucht. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass Symptome einer milden Verlaufsform vorlagen, die nicht sogleich ins Auge fielen.

Die Anamnese ergab, dass nach Aussagen der Landwirte und des Pflegepersonals bei diesen Tieren keine klinisch manifeste BKF-Erkrankung aufgefallen war. Die eigenen klinischen Untersuchungen ergaben ebenfalls keine Hinweise auf mit SA-BKF assoziierbare Symptome. Es wurden lediglich bei einer Kuh eine Mastitis auf einem der Euterviertel und bei einem weiteren Rind ein geringgradig verschärftes Lungengeräusch festgestellt. Alle übrigen Befunde der sechs untersuchten Rinder lagen im Rahmen der physiologischen Befunde eines adulten Rindes (Stöber 1990).

Eines der 13 Rinder mit bekannter BKF-Historie (Tier 1/11), wurde dreimal klinisch untersucht. Ende April 2008 war es im Alter von neun Monaten akut an BKF erkrankt und hat die Krankheit überstanden. Bei der Erstuntersuchung zwei Wochen nach Beginn der Erkrankung waren noch typische BKF-Symptome wie vergrößerte Lymphknoten und Veränderungen an den Augen festzustellen. Das Fieber war bereits abgeklungen und das Tier zeigte wieder Appetit. Das Rind erholte sich in den folgenden Wochen soweit, dass es im Sommer 2008 auf der Alpe gehalten werden konnte. Im Dezember 2008, als das Tier ein zweites Mal klinisch untersucht wurde, lag noch immer eine geringgradige Vergrößerung der Buglymphknoten und eine beidseitige Corneatrübung vor. Bei der dritten Probennahme eineinhalb Jahre nach der BKF-Erkrankung war das Rind trächtig und bis auf eine beidseitige Trübung von etwa 2 cm² in der unteren Hälfte der Cornea fiel die klinische Untersuchung ohne besondere Befunde aus.

Das andere akut an BKF erkrankte Rind (Kap. III.6, Tier 1248) war Patient an der Klinik für Wiederkäuer und wurde dort klinisch untersucht. Die Befunde entsprachen den typischen klinischen Symptomen der Kopf-Augen-Form des SA-BKF (Kap. II.1.4). Bei der am LGL durchgeführten Sektion dieses Tieres wurde die klinische Verdachtsdiagnose aufgrund der charakteristischen pathologischen Veränderungen und des virologischen Nachweises von OvHV-2-DNA bestätigt.

2.3. Relativer OvHV-2-Genomgehalt in Blut- und Organproben

2.3.1. Vergleich des relativen OvHV-2-Genomgehaltes in Blutproben ausgewählter Rinder und Schafe

Der OvHV-2-Genomgehalt in Relation zum Zellgehalt wurde in Blutproben von zwölf Rindern und zehn Schafen mit OvHV-2-Infektion bestimmt. Die zehn Schafe und elf der Rinder stammten aus den Studienbetrieben, ein weiteres Rind mit akutem BKF (Tier 1248) war Patient an der Klinik für Wiederkäuer (Kap. III.6). OvHV-2-Genome waren im Blut der Tiere qualitativ mittels seminested PCR nachgewiesen worden. Die OvHV-2-Genomkopien sind im Folgenden als Anzahl je Zelle beschrieben, auch wenn die Zellzahl nicht absolut sondern nur relativ bestimmt wurde (Kap. III.10.2.3).

Die Proben der Schafe wurden von Tieren unterschiedlichen Alters (0,5 bis 14 Jahre) und aus verschiedenen Betrieben stammend ausgewählt. Es wurden Werte von $1,7 \times 10^{-4}$ bis $1,7 \times 10^{-1}$ OvHV-2-Genomkopien je theoretische Zelle erreicht (Abb. IV.16).

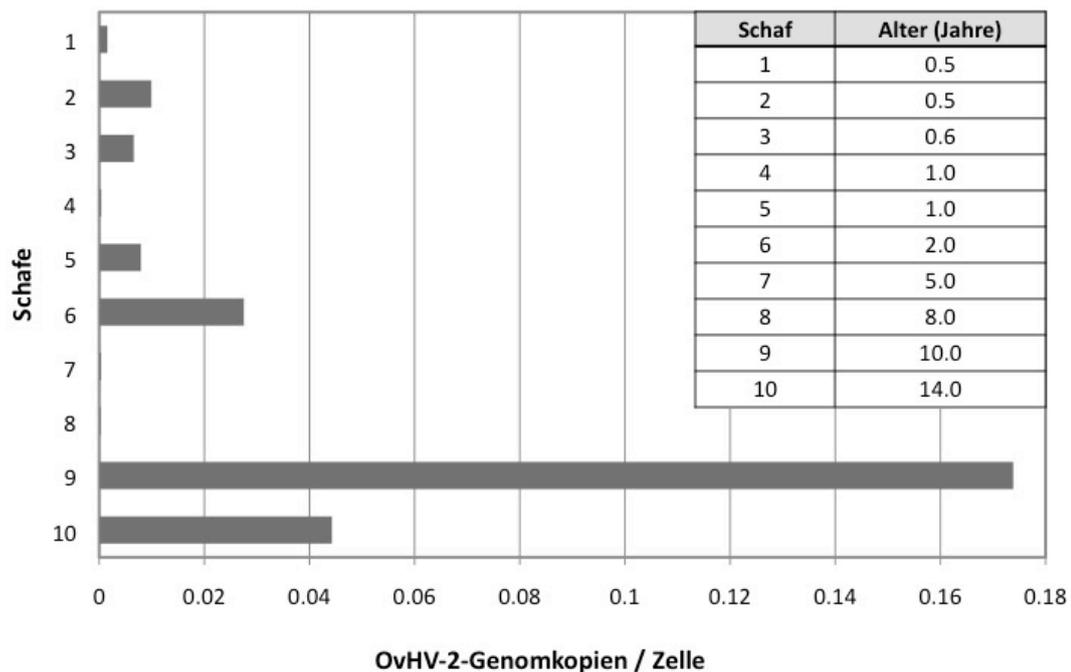


Abb. IV.16: OvHV-2-Genomgehalt relativ zum Zellgehalt im Blut von zehn selektierten Schafen. Die Zellzahl wurde nicht absolut bestimmt und dient dem Vergleich zwischen den analysierten Proben.

Ein Zusammenhang zwischen dem Alter und der relativen Anzahl an OvHV-2-Genomen wurde dabei nicht offensichtlich, wenngleich die beiden ältesten Tiere die höchsten OvHV-2-Genomkopienzahlen relativ zum Zellgehalt aufwiesen.

Interessant war aber auch der Vergleich mit der relativen Quantifizierung der OvHV-2-Genomkopien im Blut der Rinder (Abb. IV.17). Bei den als Hauptwirt asymptomatisch infizierten Schafen lag der durchschnittliche relative Gehalt an OvHV-2-Genomen im Bereich der Werte der subklinisch infizierten Rinder (Tab. IV.2). Der relative OvHV-2-Genomgehalt in den Proben dieser Rinder lag nämlich in einem Bereich von $3,4 \times 10^{-3}$ bis $1,7 \times 10^{-1}$ OvHV-2-Genomkopien je Zelle.

Ein Rind aus Betrieb 1.1 (Tier 1/11) war akut an der Kopf-Augen-Form des BKF erkrankt und bei Probennahme zwei Wochen später in Genesung. Die Symptome waren zu diesem Zeitpunkt bereits größtenteils abgeklungen (Kap. IV.2.2). Der relative Gehalt an OvHV-2-Genom war mit 1,3 Kopien je Zelle im Blut deutlich höher als bei den subklinisch infizierten Rindern. Bei einem weiteren Rind aus diesem Bestand (Tier 1/32) wurde eine Woche nach der Untersuchung akutes BKF diagnostiziert. Es befand sich also bei Probennahme in der Inkubationszeit der klinischen Erkrankung, war aber noch symptomfrei. Der OvHV-2-Genomgehalt im Blut dieses Tieres erreichte mit $1,8 \times 10^{-1}$ Genomkopien pro Zelle einen Wert, der im Bereich der Ergebnisse der subklinisch infizierten Tiere lag (s.o.).

Das Blut des zum Zeitpunkt der Probennahme akut an BKF erkrankten Rindes aus der Klinik für Wiederkäuer (Tier 1248) wies mit 4,1 OvHV-2-Genomkopien je Zelle einen 23- bis 1200-fach höheren relativen OvHV-2-Genomgehalt auf als die untersuchten Tiere ohne Symptomatik.

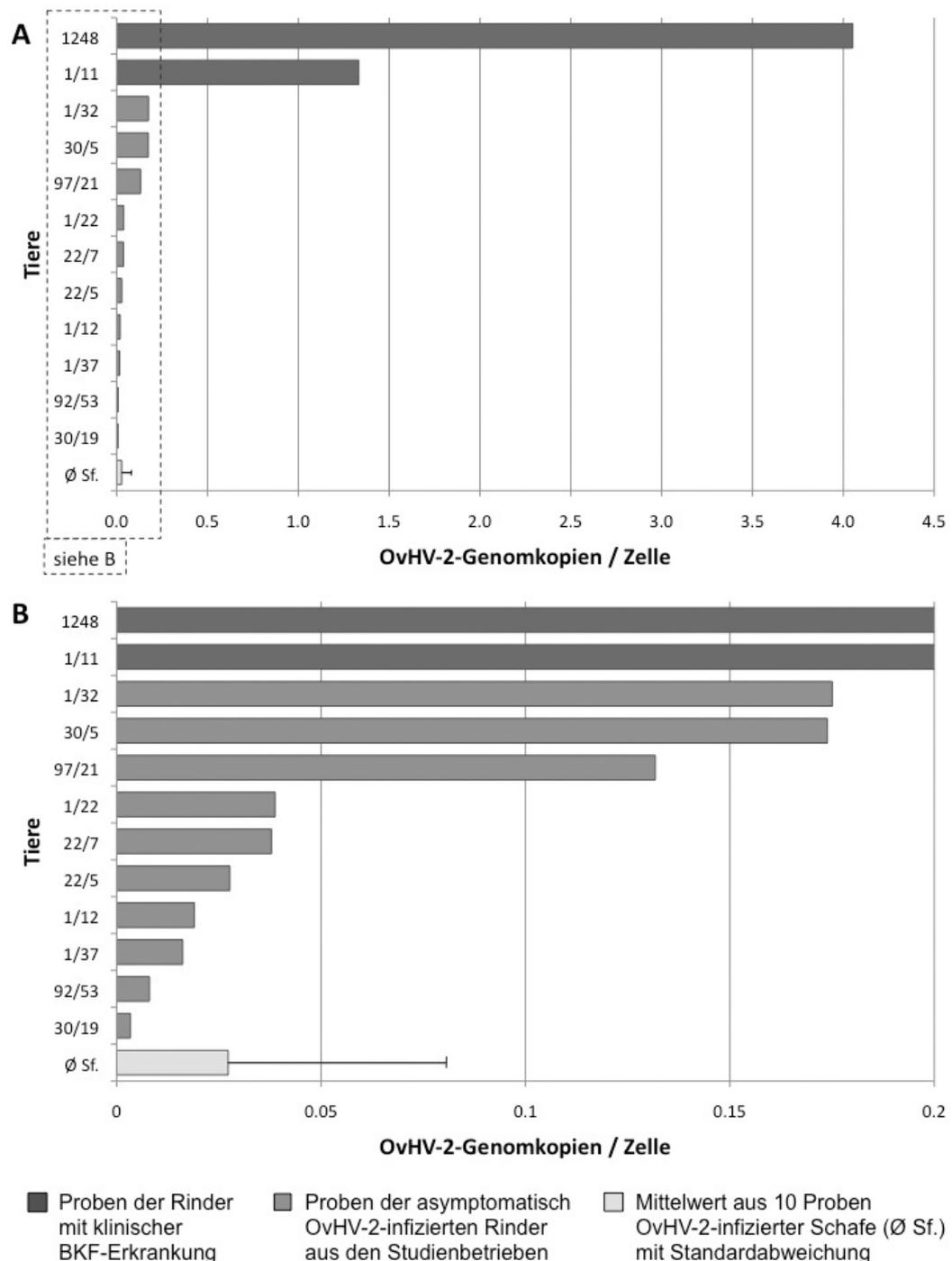


Abb. IV.17: OvHV-2-Genomgehalt relativ zum Zellgehalt im Blut der individuellen untersuchten Rinder und Schafe. Die Zellzahl wurde nicht absolut bestimmt und dient ausschließlich der Normierung der analysierten Proben. Die Werte der zehn untersuchten Schafe sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben (Ø Sf.). Tier 1248 war zum Zeitpunkt der Analyse akut an BKF erkrankt. Bei Rind 1/11 waren die Symptome der akuten Erkrankung am Abklingen. Die übrigen Tiere zeigten keine BKF-Symptomatik. Abb. B stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. A dar.

2.3.2. Relativer Vergleich des OvHV-2-Genomgehaltes verschiedener Organe eines akut an BKF erkrankten Rindes

Nach Euthanasie des für vier Tage akut an BKF erkrankten Rindes 1248 wurden bei der Sektion Gewebeproben verschiedener Organe für die Genomanalyse entnommen. Der OvHV-2-Genomgehalt dieser Proben wurde mittels quantitativer OvHV-2-spezifischer real-time PCR ermittelt und mittels 12s-rRNA-Gen-spezifischer real-time PCR auf die Zellzahl normiert.

Aus Abbildung IV.18 wird ersichtlich, dass bei dem untersuchten Rind im Gewebe lymphatischer Organe mehr Virusgenomkopien detektiert wurden als in den anderen Organen oder Geweben.

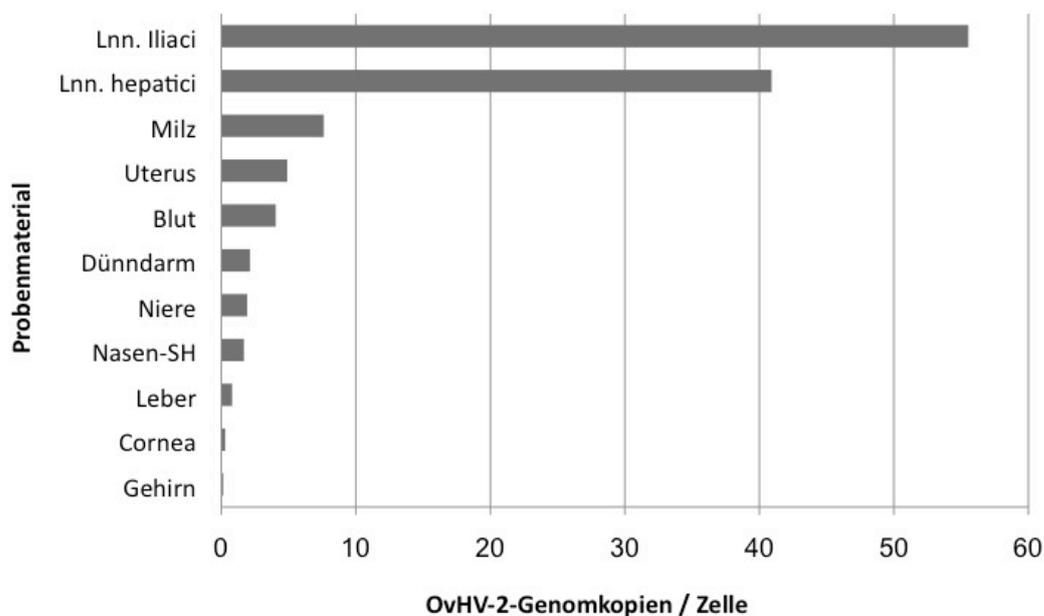


Abb. IV.18: OvHV-2-Genomgehalt relativ zum Zellgehalt in zehn verschiedenen Organen und Geweben sowie im Blut eines akut an BKF erkrankten Rindes (Tier 1248). Die Zellzahl wurde nicht absolut bestimmt und dient ausschließlich der Normierung der analysierten Proben.

Die untersuchten Proben aus den beiden Lymphknoten wiesen mit $4,1 \times 10^1$ und $5,6 \times 10^1$ Genomkopien je Zelle den höchsten relativen Gehalt an OvHV-2-DNA auf. In Gewebeproben aus Cornea und Gehirn

dagegen ist die Zahl an OvHV-2-Genomen relativ zum Zellgehalt am niedrigsten ($1,3 \times 10^{-1}$ und $3,0 \times 10^{-1}$ OvHV-2-Genomkopien je Zelle). Allerdings handelt es sich hierbei auch um gering durchblutetes Gewebe. Da OvHV-2-Genome auch in Blutzellen nachgewiesen wurden, ist nicht prinzipiell zwischen OvHV-2-positiven Zellen aus dem Blut und dem jeweils untersuchten Gewebe zu trennen. Interessanterweise war aber im Uterusgewebe relativ mehr Virus-DNA nachweisbar als in Dünndarm, Niere oder Nasenschleimhaut. Der Wert ist etwa vergleichbar mit dem OvHV-2-Genomgehalt im Blut dieses Tieres.

2.4. Initiale Charakterisierung von *in vitro* kultivierten Lymphozyten OvHV-2-infizierter Rinder

2.4.1. Entwicklung des relativen OvHV-2-Genomgehaltes der kultivierten Zellen über die Zeit

Lymphozyten des subklinisch OvHV-2-infizierten Tieres 97/21 wurden isoliert und *in vitro* kultiviert. Ab der dritten Passage wurde jeweils beim Wechseln des Mediums oder beim Teilen der Zellsuspension ein Aliquot für PCR-Untersuchungen asserviert. Über einen Zeitraum von zehn Wochen, in denen die Zellkulturen acht Passagen durchliefen, wurden insgesamt 15 solcher Proben untersucht und der OvHV-2-Genomgehalt relativ zum Zellgehalt mittels real-time PCR quantifiziert (Abb. IV.19).

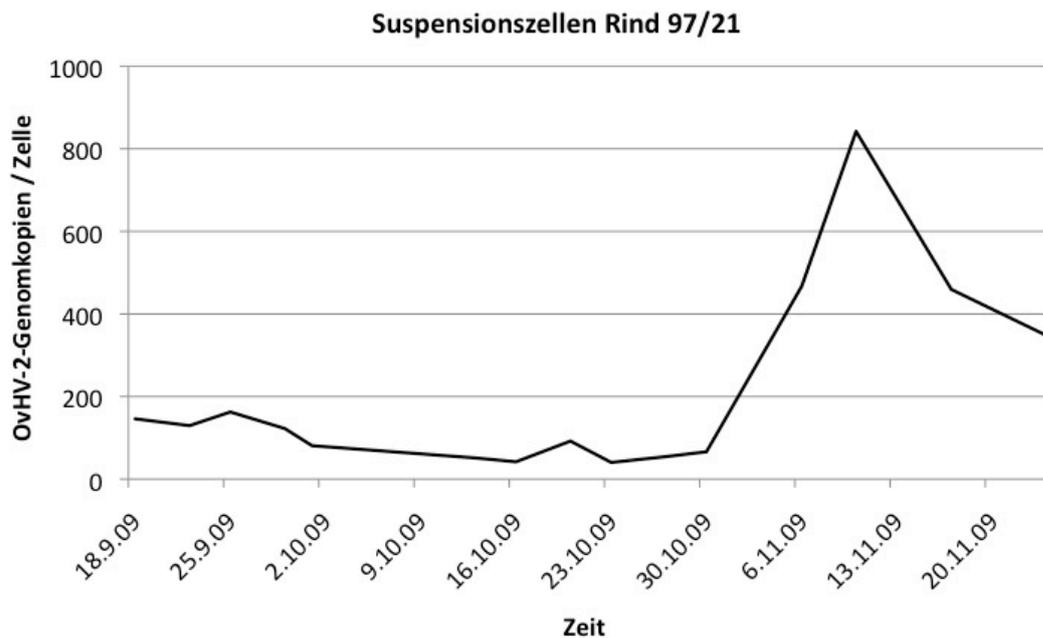


Abb. IV.19: Entwicklung des relativen OvHV-2-Genomgehaltes in *in vitro* kultivierten Lymphozyten des subklinisch infizierten Rindes 97/21

Das Anlegen der Primärkultur aus Lymphozyten von Rind 97/21 erfolgte bereits Ende Juli 2009. In den folgenden acht Wochen wurden die Zellen aufgrund der geringen Teilungsrate insgesamt nur zweimal passagiert. Im

September folgte eine Phase vermehrter Teilungsaktivität der Zellen. Beim dritten Teilen der Zellsuspension am 18.09.2010, 59 Tage nach Anlegen der Primärkultur, wurde erstmals eine Quantifizierung des OvHV-2-Genomgehaltes der Suspensionszellen durchgeführt (Abb. IV.19). Der relative Genomgehalt betrug zu diesem Zeitpunkt $1,5 \times 10^2$ OvHV-2-Genomkopien je Zelle. In den darauffolgenden neun Messungen war eine leichte Reduzierung der Kopienzahlen festzustellen bis hin zu einem minimalen Wert von $4,0 \times 10^1$ OvHV-2-Genomkopien je Zelle. In der siebten und achten Woche des im Diagramm aufgeführten Zeitraumes stieg der relative Virusgenomgehalt deutlich an mit einem Peak bei $8,4 \times 10^2$ OvHV-2-Genomkopien je Zelle, jedoch folgte anschließend fast ebenso schnell wieder ein Abfall.

Über eine entsprechende Zeitspanne wurden Proben aus kultivierten Lymphozyten des akut an BKF erkrankten Rindes (Kap. III.6, Tier 1248) aus der Klinik für Wiederkäuer quantitativ auf ihren OvHV-2-Genomgehalt hin untersucht. Nach Isolieren der Zellen wurden nach der Kultivierung über zehn Wochen hinweg insgesamt 18 Zellaliquots mittels real-time PCR quantifiziert (Abb. IV.20).

Mit den Analysen des OvHV-2-Genomgehaltes der Zellen dieses Tieres wurde am Tag 9 nach der Kultivierung bei einem Wert von $3,5 \times 10^1$ OvHV-2-Genomkopien je Zelle begonnen. In den ersten drei Wochen war ein sehr starker und rascher Abfall des relativen Virusgenomgehaltes zu erkennen, welcher daraufhin über die restlichen sieben Wochen hinweg in einem Bereich zwischen $6,7 \times 10^{-1}$ und 2,3 relativ konstant blieb. Die Zellen verblieben innerhalb der hier dargestellten zehn Wochen sowie auch in den darauffolgenden Wochen ohne Passagierung, da keinerlei Vermehrung zu beobachten war.

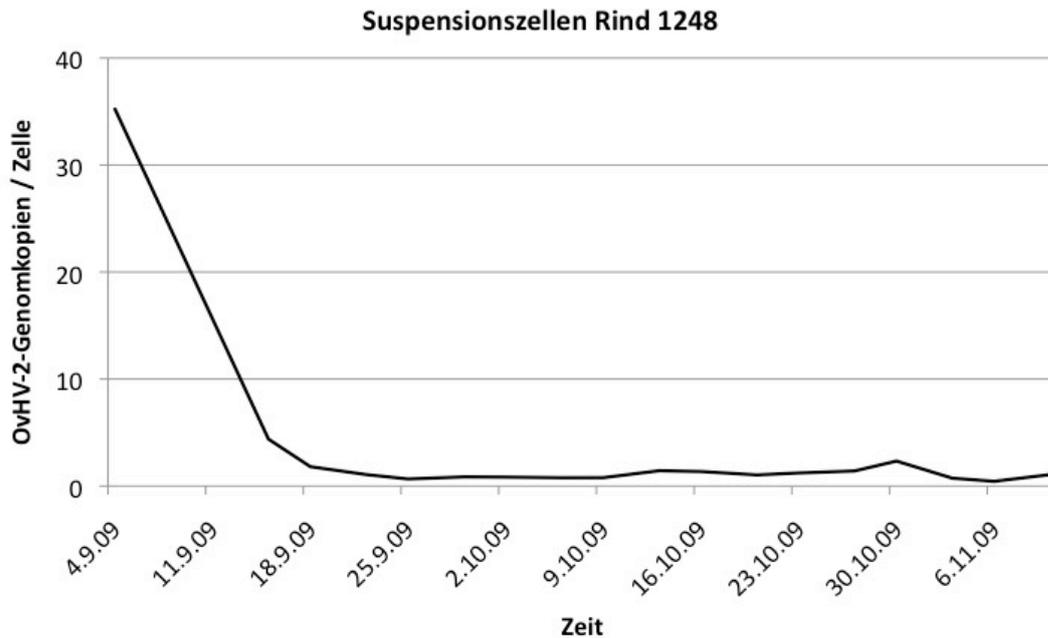


Abb. IV.20: Entwicklung des relativen OvHV-2-Genomgehaltes in *in vitro* kultivierten Lymphozyten des akut an BKF erkrankten Rindes 1248

In den Suspensionszellen des akut an BKF erkrankten Rindes wurde zu keinem Zeitpunkt einen ebenso hoher relativer OvHV-2-Genomgehalt detektiert wie in den kultivierten Lymphozyten des subklinisch OvHV-2-infizierten Rindes 97/21 (Kap. 2.4.1). Da die Zellen des Rindes 1248 aber unmittelbar nach Beginn der Kultivierung analysiert wurden und nie eine Vermehrung auffiel, die Lymphozyten des Rindes 97/21 jedoch quantifiziert wurden, nachdem eine erhöhte Teilungsaktivität festzustellen war und eine klonale Expansion einzelner infizierter Zellen angenommen werden konnte, ist ein Vergleich des relativen Genomgehaltes zwischen den Zellen beider Tiere noch nicht möglich.

2.4.2. Stimulierbarkeit kultivierter Lymphozyten durch Mitogene

Die Suspensionszellen des Rindes 97/21 wurden nach der zehnten Passage mit drei verschiedenen klassischen Mitogene stimuliert. Ebenso wurde parallel mit den frisch isolierten Lymphozyten eines OvHV-2-negativ getesteten Rindes als Kontrolle verfahren.

Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit den Mitogenen war bereits eine deutliche Akkumulation der Zellen des Rindes 97/21 festzustellen (Abb. IV.21). Am deutlichsten wirkte sich die Zugabe von ConA aus. Weniger stark reagierten die Zellen auf die Stimulierung mit PHA. Nur vereinzelte kleine Zellkonglomerate waren dagegen nach PWM-Zugabe entstanden. Ein ähnliches Bild zeigten auch die nicht stimulierten Zellen, sodass im Falle des PWM nicht von einer zusätzlichen Stimulation ausgegangen werden kann. Das gesamte Experiment wurde in der Gegenwart von IL-2 ausgeführt, das dem Zellkulturmedium immer beigefügt war.

Die Lymphozyten des Kontrolltieres reagierten unter den gleichen Bedingungen am deutlichsten nach PHA-Zugabe und eine noch geringe bei Stimulation mit PWM. Keine Konglomerate dagegen bildeten die Zellen, die mit ConA versetzt waren, ebenso blieb in der Probe ohne Mitogene eine Reaktion aus.

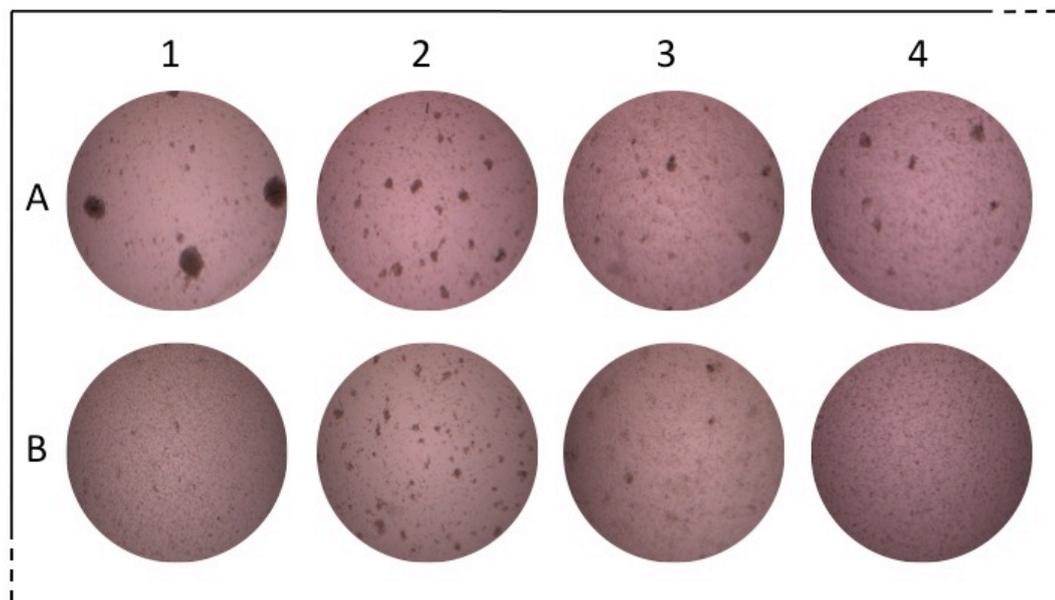


Abb. IV.21: Lichtmikroskopische Darstellung der *in vitro* kultivierten Zellen des Rindes 97/21 (A1 bis A4) im Vergleich zu den frisch isolierten Lymphozyten eines OvHV-2-Genom negativen Rindes (B1 bis B4) in Zellkulturmedium 24 Stunden nach Zugabe der Mitogene ConA (A1 und B1), PHA (A2 und B2) und PWM (A3 und B3) bzw. ohne Mitogenzugabe (A4 und B4) bei 400-facher Primärvergrößerung

V. DISKUSSION

1. Bestimmung der Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen

1.1. Vergleich der Seroprävalenzen mit den Ergebnissen des OvHV-2-Genomnachweises

Die betriebsspezifische Prävalenz an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den mittels kompetitivem ELISA (VMRD) untersuchten Rinderseren lag mit 19 % (n = 94) sehr hoch, wenn man bedenkt, dass klinische BKF-Fälle bei Rindern nur selten diagnostiziert werden. Dies spricht für eine hohe Anzahl subklinischer OvHV-2 Infektionen oder aber für Fälle, die aufgrund eines milden oder untypischen klinischen Verlaufs nicht erkannt werden. Verglichen mit den Ergebnissen der seminested PCR, mit der grundsätzlich nicht nur Genome produktiv replizierender OvHV-2, sondern auch Genome in der Latenz detektiert werden und in der nur 13 Blutproben der untersuchten Rinder reagierten, ist diese hohe Anzahl seropositiver Proben aber durchaus kritisch zu betrachten. Auch bei den untersuchten Schafen lag die Seroprävalenz von 87 % (n = 266) um 13 Prozentpunkte höher als die Prävalenz der mittels seminested PCR nachgewiesenen OvHV-2-Infektionen.

Untersuchungen zur Kongruenz der seminested PCR und des ELISA durch Li et al. (1995; Li et al. 2001b) ergaben mit einer Übereinstimmung von 95 bis 100 % sehr gute Resultate. Bei Prävalenzuntersuchungen in Portugal dagegen wurde aber, wie auch in der vorliegenden Arbeit, eine nur schwache Übereinstimmung beider Tests (Kappa-Koeffizient 0,14) festgestellt (Cortez et al. 2008). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass der OvHV-2-Genomgehalt im Blut der seropositiven Tiere, die in der PCR nicht reagierten, unterhalb der Nachweisgrenze lag, da die viralen Genome während einer subklinischen Infektion vorwiegend in geringer Kopienzahl latent vorlagen. Wie in dieser Arbeit bei der Quantifizierung des Genomgehaltes ersichtlich wurde, war auch tatsächlich im Blut

inapparent infizierter Rinder und Schafe weit weniger Virus-DNA nachweisbar als bei den klinisch erkrankten Tieren (Kap. IV.2.3.1). Gegen diese Begründung spricht jedoch, dass im Vergleich zum kompetitiven ELISA die seminested PCR zur Diagnose einer OvHV-2-Infektion als sensitiver gilt (Li et al. 1995; Müller-Doblies et al. 2001a). Bei Schafen ist belegt, dass der Gehalt an OvHV-2-Genomkopien relativ zur DNA-Menge im Nasensekret zeitweise sehr viel höhere Werte erreichen kann als in der PBL-Fraktion im Blut (Li et al. 2001a). Möglicherweise wäre daher der OvHV-2-Genomnachweis bei seropositiven Schafen, in deren PBLs kein Virusgenom nachweisbar war, bei Untersuchung von Nasentupfermaterial positiv ausgefallen.

Da die Proben von Rindern mit einem Alter unter vier Monaten nicht zur Bestimmung der Seroprävalenzen herangezogen wurden, können maternale Antikörper als Ursache für die hohe Anzahl seropositiver Proben vernachlässigt werden. Bei Lämmern zumindest sind maternale Antikörper gegen BKF-Erreger nämlich nur bis etwa zehn Wochen post partum nachweisbar (Li et al. 1995). Es wäre aber theoretisch denkbar, dass die Rinder, die Antikörper-positiv sind, auch eine umfassende Immunantwort entwickelt haben, sodass OvHV-2-infizierte Zellen reduziert und eine effektive Replikation verhindert würden. Solche Tiere reagierten somit zwar im ELISA, aber ein Nachweis im Blut mittels PCR könnte nicht gelingen, da die Nachweisgrenze unterschritten wäre. Dabei stellt sich jedoch die Frage, wodurch diese effiziente Immunantwort induziert worden wäre. Nach Überstehen einer eventuell unbemerkt aufgetretenen milden Form des SA-BKF ist noch jahrelang auch virale DNA im Blut nachweisbar (Müller-Doblies et al. 2001b). Die Pathogenese der subklinischen Form der OvHV-2-Infektion ist noch weitgehend ungeklärt. Es lassen sich somit keine Aussagen darüber treffen, ob möglicherweise ausreichend spezifische Antikörper im Serum der Fehlwirte in Kombination mit einer entsprechenden effektiven zellulären Immunabwehr diese vor einer erneuten Infektion oder Reaktivierung und infolgedessen auch vor der Erkrankung an klinisch manifestem BKF schützen könnten.

Womöglich könnte die Ursache für die in dieser Arbeit festgestellten relativ hohen Seroprävalenzen auch durch den Test selbst bedingt sein.

Alternativtests, die zur Überprüfung der erarbeiteten Daten eine weitere serologische Abklärung erlaubt hätten, standen nicht zur Verfügung. Die Ergebnisse der im ELISA untersuchten Rinderseren lagen häufig nahe dem Cut-Off-Wert und waren auch bei mehrfacher Wiederholung zum Teil schlecht reproduzierbar. Auch aus anderen Untersuchungen ist bekannt, dass Seren von Rindern im kompetitiven ELISA als grenzwertig einzustufen waren (Müller-Doblies et al. 1998) und dass sich der Test als weniger verlässlich für den Nachweis einer OvHV-2-Infektion, gerade bei persistent infizierten Rindern herausstellte (O'Toole et al. 1997). Zu beachten ist sicherlich die Tatsache, dass im verwendeten ELISA Antikörper gegen verschiedene BKF-Erreger nachgewiesen werden. So könnten auch Rinder mit dem Caprinen Herpesvirus-2 infiziert sein oder mit verwandten Viren, die 15A-Epitop-reaktive Antikörper induzieren, aber nicht mittels der OvHV-2-spezifischen PCR nachweisbar sind. Eine Abklärung wäre beispielsweise mit einer Multiplex real-time PCR für verschiedene BKF-Viren möglich (Cunha et al. 2009). Unbekannte Herpesviren, die im ELISA Reaktionen hervorrufen, aber nicht zu den BKF-Erregern gehören, würden jedoch auch mit diesem Test nicht erfasst.

Nachteilig wirkte sich schließlich vor allem die Produktionseinstellung des hier verwendeten ELISA aus, sodass eine Wiederholung und Überprüfung von bereits getesteten Proben vielfach nicht mehr möglich war und ein Teil der Betriebe nicht untersucht werden konnte.

1.2. Vergleich der betriebsspezifischen Prävalenzen selektierter bayerischer Mischbetriebe mit internationalen Studien

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen bei Rindern und Schafen in 20 Mischbetrieben in Bayern sind in Tabelle V.1 im Vergleich zu den Ergebnissen anderer internationaler Studien dargestellt. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die angegebenen Prävalenzwerte auf unterschiedlichen Bezugspopulationen basieren und zum Teil auch verschiedene serologische Nachweismethoden angewandt wurden. Zudem wurden zur Bestimmung der Prävalenzen in der vorliegenden Arbeit zum Teil Tiere bestimmter Altersgruppen

ausgeschlossen. In anderen Studien wurden dagegen keine oder andere Altergrenzen festgelegt. Ein absoluter Vergleich ist somit in dieser Gegenüberstellung nicht möglich.

In den in dieser Arbeit untersuchten Schafherden aber waren sowohl die Seroprävalenzen als auch die genomisch nachgewiesenen Prävalenzen der OvHV-2-Infektionen ähnlich hoch wie in anderen Ländern. Die Tatsache, dass kein einziger Bestand nicht infiziert war, zeigt, dass auch in Schafherden in Bayern generell ein sehr hoher Durchseuchungsgrad mit dem Ovinen Herpesvirus-2 vorliegt.

Die Seroprävalenzen in den untersuchten Rinderbeständen lagen höher als die serologisch ermittelten Daten in Norwegen und der Türkei. In der norwegischen Studie wurden aber auch drei Rinderherden untersucht, die keinen Schafkontakt hatten und die Daten aus der Türkei basieren auf den Untersuchungen zufällig ausgewählter Rinder aus verschiedenen Betrieben, in denen ebenfalls nicht immer Schafkontakt vorhanden war. Dies könnte ursächlich für die etwas höheren Prävalenzwerte der eigenen Untersuchungen sein. Die OvHV-2-Genom-Prävalenzen in den Rinderbeständen dagegen sind aber verglichen mit den Ergebnissen aus anderen Studien niedriger. Für eine bessere Vergleichsbasis wurde nur die mediane Prävalenz der Rinderbestände mit BKF-Historie (Gruppe 1) aufgeführt. Selbst dann reicht dieser Wert aber nur an die Prävalenzdaten einer anderen Untersuchung heran (Müller-Doblies et al. 2001b). Die deutlichen Unterschiede in der Häufigkeit des OvHV-2-Genomnachweises bei Rindern zwischen den verschiedenen Studien können auf sehr vielen Faktoren beruhen. Wenn man falsch positive Ergebnisse aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr in der seminested PCR zunächst einmal ausschließt, bleiben noch Faktoren wie Rinder- und Schafrassen, Tierzahl, Art der Haltung und des Kontaktes einerseits und möglicherweise auch die Infektiosität des zirkulierenden Virus für Rinder andererseits. Für eine umfangreiche Diskussion der einzelnen Faktoren fehlen jedoch die notwendigen Informationen. Möglicherweise könnte dies geographisch bedingt sein, indem OvHV-2-Infektionen bei Rindern in bestimmten Regionen verbreiteter sind aufgrund des Vorkommens anderer Rassen oder Umweltbedingungen. Da aber wie bereits erwähnt aufgrund der sehr

unterschiedlichen Ausgangsbedingungen, Tierzahlen etc. ein Vergleich der Daten nur sehr vage stattfinden kann, bleibt diese Hypothese rein spekulativ.

Tab. V.1: In verschiedenen Studien ermittelte Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen bei Schafen und Rindern

Region, Land (Quelle)	Sero- prävalenz Schafe	OvHV-2- Prävalenz Schafe	Sero- prävalenz Rinder	OvHV-2- Prävalenz Rinder
USA (Li et al. 1994)	k.A.	44,6 % von 149 Sf. aus 7 Staaten	k.A.	k.A.
USA (Li et al. 1995)	94 % von 144 Sf.	99 % von 144 Sf.	k.A.	k.A.
Colorado, USA (Collins et al. 2000)	k.A.	k.A.	k.A.	23,1 % von 47 Rd., Betrieb mit insg. 850 Rd. u. BKF-Historie
Schweiz (Müller- Doblies et al. 2001b)	k.A.	93,8 % von 32 Sf. ab 1 Jahr 36,1 % von 36 Sf. < 1 Jahr	k.A.	2,3 % von 44 Rd. in 4 Misch- betrieben
Hessen, Deutschland (Strohbücker 2005)	k.A.	53,1 % von 49 Sf. in 6 Misch- betrieben	k.A.	12 % von 542 Rd. in 6 Misch- betrieben mit BKF-Historie
Kashmir, Indien (Wani et al. 2006)	k.A.	84,8 % von 33 Sf. ab 1 Jahr 95,2 % von 21 Sf. < 1 Jahr	k.A.	30,9 % von 55 BKF-Verdachts- fällen (entspricht 0,6 % der Rd.- Population in Kashmir)
NW-Türkei, (Yeşilbağ 2007)	97,5 % von 200 Sf.	k.A.	15 % von 200 Rd..	k.A.
Valenca, Protugal (Cortez et al. 2008)	92 % von 87 Sf.	77,4 % von 124 Sf.	k.A.	4,4 % von 45 Rd., 7,4 % von 27 Rd. in Misch- betrieben
Norwegen (Løken et al. 2009)	90,7 % von 75 Sf.	6,7 % von 75 Sf.	6,4 % von 360 Rd.	4,2 % von 360 Rd.
Bayern, Deutschland (Ergebnisse der vor- liegenden Arbeit)	87 % von 304 Sf. ab 4 Monaten Median der Prävalenzen in 14 Betrieben: 93 %	74 % von 366 Sf. ab 4 Monaten Median der Prävalenzen in 20 Betrieben: 72 %	19 % von 505 Rd. ab 4 Monaten Median der Prävalenzen in 14 Betrieben: 18 %	1,6 % von 801 Rd. Median der Prävalenzen in 10 Betrieben mit klin. BKF-Fällen: 2,3 %

k.A. keine Angabe

Sf. Schaf

Rd. Rind

1.3. Prävalenzunterschiede zwischen den zwei Betriebsgruppen

Die Einteilung der 20 Mischbetriebe für die Prävalenzuntersuchungen in zwei Gruppen erfolgte bezüglich der BKF-Historie der Rinder. Betriebe der Gruppe 1 hatten im Zeitraum von Januar 2007 bis Dezember 2009 mindestens einen klinisch auffälligen und virologisch bestätigten Fall von SA-BKF im Rinderbestand. In Betrieben der Gruppe 2 hingegen wurden bei den Rindern keine klinischen BKF-Fälle in diesem Zeitraum bemerkt.

Interessant ist vor allem der signifikante Unterschied zwischen den Seroprävalenzen in den Schafherden beider Betriebsgruppen. In der ersten Gruppe lagen die Prävalenzen bei 100 % oder nur geringfügig darunter. Die Betriebe der Gruppe 2, in denen keine BKF-Fälle in den letzten drei Jahren bei den Rindern aufgefallen waren, hatten auch in ihren Schafherden deutlich weniger Tiere mit positivem Antikörpernachweis gegen BKF-Erreger. Ein ähnlich deutlicher Gruppenunterschied zeigte sich im OvHV-2-Genomnachweis. Die Altersstrukturen waren in den Herden beider Gruppen aber ähnlich gemischt. Obwohl auch in Herden der Gruppe 2 noch genügend infizierte Schafe vorhanden waren, die den Rest der Tiere hätten anstecken können, erwies sich ein gewisser Teil der Herde in den beiden Tests als negativ. Es könnte natürlich ebenfalls sein, dass bei diesen Schafen durch die latente Infektion ein nur sehr geringer Gehalt an OvHV-2-Genomen und zirkulierenden Antikörpern im Blut zu einem Unterschreiten der Nachweisgrenzen beider Tests geführt hat. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, dass unter den sicher OvHV-2-positiven Schafen möglicherweise weniger Tiere sind, die auch ausreichend infektiöses Virus ausscheiden. Dies könnte eventuell auf weniger Stress in der Herde oder einen besseren allgemeinen Gesundheitsstatus der Tiere zurückzuführen sein. Bei Schafen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis der Infektion im Blut und dem Virus-DNA-Gehalt in dem zur experimentellen Infektion zerstäubten Nasensekret festgestellt werden. Innerhalb der Schafherden könnte also ein höherer Infektionsdruck infolge einer vermehrten Ausscheidung infektiösen Materials durch einzelne Tiere eine Ursache für die beachtliche Anzahl an OvHV-2-infizierten Schafen in Herden der Gruppe 1 darstellen.

Bei den Rindern lag der Median der Seroprävalenzen in Betrieben der Gruppe 1 ebenfalls höher, dennoch ist interessant, dass auch in allen neun untersuchten Rinderbeständen der Gruppe 2, in denen kein BKF-Geschehen beobachtet wurde, Rinder mit Antikörpern gegen BKF-Erreger in der Herde vorhanden waren. Die im ELISA diagnostizierten Infektionen bei Rindern der Gruppe 2 konnten jedoch nicht durch einen OvHV-2-Nachweis mittels PCR bestätigt werden. Mögliche Gründe dafür wurden bereits diskutiert (Kap. V.1.1).

Insgesamt belegen die mit beiden Methoden bei Rindern gewonnenen Ergebnisse, dass die Betriebe der Gruppe 1 neben den klinisch an BKF erkrankten Tieren auch insgesamt mehr OvHV-2-Infektionen im Rinderbestand hatten als die Betriebe der Gruppe 2. Die Auswahl der Betriebe in beiden Gruppen war bis auf das eine Kriterium der in den letzten drei Jahren nachgewiesenen oder entsprechend nicht beobachteten klinischen BKF-Fälle völlig willkürlich, sodass auch die in der Folge festgestellten Unterschiede in den Betriebsstrukturen als mögliche Ursachen für die oben beschriebenen interessanten Prävalenzunterschiede zwischen den Gruppen diskutiert werden können. Die Auswertung der erhobenen Betriebsdaten ließ tatsächlich einige Unterschiede in der Betriebsstruktur, sowie in der Haltung erkennen.

Statistisch signifikante Unterschiede traten zum einen in der Anzahl gehaltener Rinder und zum anderen in der Haltung des Jungviehs auf. Die Betriebe der Gruppe 2 lassen sich größtenteils als moderne Milchviehbetriebe beschreiben mit vorwiegend Laufstallhaltung der Kühe und Jungtiere und Gruppenhaltung der Kälber. Die Mehrzahl der Betriebe der ersten Gruppe dagegen hatte überwiegend kleinere Rinderbestände mit Anbinde- oder Laufstallhaltung der Kühe und häufig Jungrindern in Anbindehaltung. Ob die Größe des Betriebes und die Haltung der Rinder einen Einfluss auf die Prävalenz des SA-BKF haben, bleibt rein spekulativ.

In Zusammenhang mit den Tierzahlen fiel ein weiteres Kriterium auf. Für das Vorkommen von BKF könnte das Verhältnis der Größe des Rinderbestandes zur Größe der Schafherde ursächlich sein. In den Betrieben der Gruppe 2 werden im Median je Rind nur 0,3 Schafe

gehalten. In Gruppe 1 dagegen lag dieses Verhältnis doppelt so hoch, nämlich bei 0,6, und vier Betriebe der Gruppe 1 hatten sogar mehr Schafe im Bestand als Rinder. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Anwesenheit von mehr infizierten Hauptwirten auch insgesamt zu einer vermehrten Ausscheidung und zu einer erhöhten Exposition der Rinder mit virushaltigen Sekreten führt. In Schafherden der Gruppe 1 lagen die Seroprävalenzen im Median bei 100 % und die OvHV-2-Genomprävalenzen bei 92 % und waren damit deutlich höher als die der Schafherden in Gruppe 2 mit 73 % beziehungsweise 58 %. Nach Li et al. (2006b) könnte die Dosis infektiösen Materials ein entscheidender Faktor für die Virusinfektion und folglich die Erkrankung an BKF sein. Der zudem auch noch häufig engere Kontakt zwischen den Schafen und Rindern der ersten Gruppe (Kap. IV.1.3) bietet eine weitere Erklärung für das Auftreten der BKF-Fälle und die höheren OvHV-2-Prävalenzen bei den Rindern. Dieser Zusammenhang zwischen dem Auftreten von SA-BKF und der Intensität des Kontaktes zu den Schafen wird außerdem dadurch bekräftigt, dass in allen Betrieben mit mehr als einem BKF-Fall in den letzten drei Jahren die Schafe direkt mit im Rinderstall oder zumindest in einem angrenzenden Raum des selben Stallgebäudes untergebracht waren. Auch Løken et al. (2009) stellten höhere Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen in Rinderbeständen fest, in denen die Schafe in den Wintermonaten im selben Raum wie die Rinder untergebracht waren.

Ob auch Vektoren bei der Übertragung infektiösen Materials vom Schaf- in den Rinderbestand eine wesentliche Rolle spielen ging aus den vorliegenden Daten nicht hervor. In fast allen zwanzig Betrieben wurden beide Tierarten vom jeweils gleichen Personal versorgt, wodurch das Virus an der Kleidung oder den Stiefeln haftend an die Rinder weitergegeben werden könnte. Ebenso kamen auch andere Tiere wie Katzen, die von Stall zu Stall streichend als Vektor fungieren könnten, in beiden Gruppen etwa gleich häufig vor und sicherlich waren auf jedem der Höfe genügend Nager und Vögel vorhanden, wie sie von Li et al. (2008) als mögliche Überträger in Zusammenhang mit einem massiven BKF-Ausbruch bei Bisons diskutiert werden. Wobei jedoch anzumerken ist, dass bei Bisons von einer weitaus geringeren Infektionsdosis auszugehen

ist als bei Rindern (Taus et al. 2006).

Als nicht relevant für das Auftreten von BKF schien sich zumindest bei den in dieser Arbeit untersuchten Betrieben der sporadische Kontakt zu anderen Rindern oder Schafen außerhalb des Betriebes durch beispielsweise Klinikaufenthalte oder Viehmärkte zu erweisen, genauso wenig die Anwesenheit von Wanderschäfern in der näheren Umgebung.

Neben einem möglichen Einfluss von Betriebsstruktur und -management darf aber letztlich nicht außer Acht gelassen werden, dass die Virulenz des Virus selbst von Bedeutung für die Häufigkeit von OvHV-2-Infektionen sein könnte. Mögliche Umwelteinflüsse auf die Infektiosität des Virus oder eventuell die Existenz verschieden virulenter OvHV-2-Stämme in den einzelnen Betrieben wären ein denkbarer weiterer Faktor für unterschiedlich gehäufte Auftreten von SA-BKF, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter abgeklärt werden konnte. Da die untersuchten Betriebe willkürlich über ganz Bayern verteilt ausgewählt wurden, scheinen Unterschiede in der Virulenz der in Schafherden endemischen Viren aber zunächst weniger wahrscheinlich.

2. Weiterführende Untersuchungen einzelner OvHV-2-infizierter Rinder

2.1. Infektionsverlauf bei einem Rind nach überstandener BKF-Erkrankung

Die auch bereits von O'Toole et al. (1997) beschriebenen klinischen Veränderungen bei Rindern, die eine BKF-Erkrankung mit Symptomen der Kopf-Augen-Form überlebt hatten, konnten auch im Fall des in dieser Arbeit untersuchten Rindes 1/11 festgestellt werden. Eine beidseitige Trübung im unteren Teil der Cornea war auch noch bei der dritten Untersuchung eineinhalb Jahre nach akutem Auftreten des SA-BKF sichtbar. OvHV-2-DNA im Blut war noch langfristig nachweisbar und auch Antikörper im Serum wurden sowohl wenige Tage nach Einsetzen der akuten Symptome als auch noch ein halbes Jahr später klar detektiert. Ähnliches wurde bereits von Müller-Doblies et al. (2001b) berichtet. Ein weiterer Fall von SA-BKF trat zwar wenige Wochen später im selben Bestand auf, dies ist aber sicherlich eher auf eine Infektion durch die Schafe dieses Bestandes zurückzuführen, als auf eine horizontale Übertragung zwischen diesen beiden Rindern. Nach Überstehen der Erkrankung wurde das Rind 1/11 auch weiterhin in der Herde belassen, ohne dass in den folgenden eineinhalb Jahren weitere Rinder klinische BKF-Symptome entwickelten. Ein erster Versuch, neben der Virus-DNA auch intakte Virionen im Nasenschleim dieses Tieres nachzuweisen verlief negativ, wobei diese Ergebnisse in weiteren Experimenten, unter Einbezug entsprechender Kontrollen, abgesichert werden müssen.

2.2. Charakterisierung der Infektion einzelner subklinisch OvHV-2-infizierten Rinder

Gerade für Mischbetriebe, in denen Rinder und Schafe gemeinsam gehalten werden, ist aus mehreren Studien bekannt, dass eine inapparente Form der OvHV-2-Infektion häufiger vorkommt, als zuvor angenommen wurde (Russell et al. 2009). Einen maßgeblichen Einfluss auf die seit einigen Jahren beobachtete Häufung des Nachweis dieser

Infektionsform haben sicherlich die modernen diagnostischen Möglichkeiten wie der BKF-Erreger-spezifische Antikörper-ELISA und die OvHV-2-spezifische PCR. Diese Methoden ermöglichten in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals einen Nachweis der Infektion *in vivo*.

Bei Prävalenzuntersuchungen in Portugal beispielsweise fiel bei einem Rind zweimal im Abstand von einem Jahr der OvHV-2-Genomnachweis positiv aus, obgleich dieses Tier vor und in diesem Zeitraum kein BKF hatte (Cortez et al. 2008). Weitere solcher Fälle gab es auf einem Milchviehbetrieb in den USA, wo insgesamt 19 von 48 Rindern positive Ergebnisse im OvHV-2-Genomnachweis hatten, aber keines davon klinische Symptome in den darauffolgenden 20 Monaten entwickelte (Powers et al. 2005). Auch bei Bestandsuntersuchungen in Norwegen waren 15 OvHV-2-infizierte Rinder unter den insgesamt 360 getesteten Rindern, die auch drei Jahre später noch keinerlei BKF-Symptome aufwiesen (Løken et al. 2009). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigten auch in bayerischen Mischbetrieben das Vorkommen solch subklinischer Infektionen bei Rindern. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in Betrieben mit bekannten klinischen BKF-Fällen häufiger subklinische Infektionen entdeckt wurden, als in Betrieben, in denen die Erkrankung in den letzten Jahren nicht aufgetreten war. Der Anteil an klinisch gesunden Rindern mit nachgewiesener OvHV-2-DNA im Blut betrug bei insgesamt 801 mittels seminested PCR untersuchten Rindern 1,4 %, wenngleich aufgrund der serologischen Ergebnisse noch mehr subklinisch infizierte Rinder anzunehmen waren. Da die BKF-Historie der Tiere erfragt wurde, konnten in dieser Arbeit, mit Ausnahme eines bekannt rekonvaleszenten Tieres, Rinder mit zurückliegender überstandener BKF-Erkrankung weitgehend ausgeschlossen werden. Drei der elf subklinisch-infizierten Rinder konnten nicht wiederholt beprobt werden. In acht Fällen konnte die Infektion aber bei einer zweiten und gegebenenfalls dritten Untersuchung virologisch und serologisch erneut bestätigt werden, (Kap. IV.2.1). Der längste Zeitraum zwischen Erst- und Drittbeprobung belief sich auf eineinhalb Jahre, zwei weitere Rinder wurden im Abstand von über 14 Monaten wiederholt

beprob. Da die in der Literatur angegebene Inkubationszeit damit längst überschritten war (Kaaden 2002) und auch vorher laut Aussagen des Landwirts kein BKF bei diesen Tieren beobachtet wurde, erschien eine subklinische Form der Infektion durchaus wahrscheinlich. Bei einer Kuh gelang bei Zweitbeprobung ein halbes Jahr nach einem akuten BKF-Geschehen im Bestand weder ein Antikörper- noch ein OvHV-2-Genomnachweis. Dies könnte bedeuten, dass sich sowohl der Gehalt an Virus-DNA als auch der Antikörpertiter im Blut dieses Tieres während der latenten Infektion unterhalb der Sensitivitätsgrenzen beider Tests befanden. Ebenso könnte das bei den vielen noch schwach im ELISA reagierenden Rindern der Fall gewesen sein, wo noch ein zum Nachweis ausreichend hoher Antikörpertiter im Blut vorherrschte, aber der OvHV-2-Genomgehalt zu niedrig für einen PCR-Nachweis war.

Gründe für eine Häufung des Infektionsgeschehens wurden im vorherigen Kapitel diskutiert und sind womöglich durch einen höheren Infektionsdruck im Bestand und engeren Schafkontakt zu erklären. Unklar ist jedoch nach wie vor, warum nur ein Teil der Rinder primär OvHV-2 infiziert sind und dann nur ein Teil der infizierten Rinder auch tatsächlich erkrankt. Nach Li et. al (2006b) könnten neben der Dosis an infektiösem Material eventuell auch genetische Unterschiede der Tiere einen Einfluss haben, welche die Resistenz oder Empfänglichkeit gegenüber OvHV-2-Infektion und BKF beeinflussen. In den zwanzig untersuchten Betrieben wurden Rinder verschiedener Rassen und unterschiedlicher Abstammungslinien beprobt, eine Analyse der subklinisch infizierten Rinder auf genetische Parameter hin wurde in Rahmen der Arbeit aber nicht durchgeführt.

Einen weiteren Faktor für die Entwicklung des SA-BKF könnte der Immunstatus infizierter Rinder darstellen. Eine Exposition gegenüber einer sehr geringen Virusdosis, die nicht zur Auslösung der Erkrankung ausgereicht hatte, könnte zur Ausbildung einer zellulären Immunität geführt haben, sodass diese subklinisch infizierten Rinder zukünftig vor erneuter Infektion oder Erkrankung geschützt sind. AIHV-1-infizierte Rinder, die die Gnu-assoziierte Form des BKF überlebt haben, gelten als immun gegen eine erneute Erkrankung (Plowright 1968). Für OvHV-2-Infektionen ist dies aber nicht belegt. Bei nach SA-BKF rekonvaleszenten

Rindern wurden erneute Krankheitsausbrüche beschrieben (O'Toole et al. 1995). Da aber nicht abzuklären ist, ob dies auf eine Reaktivierung latenten Virus oder aber auf eine erneute Infektion zurückzuführen ist, können in diesen Fällen keine Aussagen zur Immunitätsausbildung getroffen werden. Aufschlüsse darüber, ob subklinisch infizierte Rinder vor einer Erkrankung bei Neuinfektion mit OvHV-2 geschützt sind, könnten Challenge-Versuche oder eine experimentelle Infektion solcher Tiere liefern.

Ob die subklinische OvHV-2-Infektion möglicherweise Folgen für das Tier hat, die nicht sogleich mit der Virusinfektion assoziiert werden, ist bisher nicht nachgewiesen. Trotz des zunächst äußerlich asymptomatischen Verlaufs ist aber nicht auszuschließen, dass beispielweise die Milchleistung, die Fruchtbarkeit oder der allgemeine Gesundheitszustand des Tieres beeinträchtigt sein könnten. Bei einem subklinisch OvHV-2-infizierten Rind aus Betrieb 1.3 (Tier 30/5) wurde ein Abort festgestellt, später fiel es zudem durch Mastitis auf. Zwei weitere Fälle von Aborten bei nachweislich OvHV-2-infizierten, aber klinisch inapparenten Rindern, sind aus einem Mischbetrieb, der durch die Klinik für Wiederkäuer betreut wird, bekannt (unveröffentlichte Daten). Natürlich könnten auch zahlreiche andere Ursachen dafür in Frage kommen, trotzdem sollte zukünftig auch in dieser Richtung weitergeforscht werden.

Nicht zu vernachlässigen ist zudem, dass subklinisch OvHV-2-infizierte Rinder letztlich ein Virusreservoir darstellen könnten. Es kann nach bisherigem Stand der Wissenschaft nicht ganz ausgeschlossen werden, dass eine horizontale Übertragung auf andere Rinder doch stattfinden könnte (Müller-Doblies et al. 2001b). Wenngleich dies auf natürlichem Wege als unwahrscheinlich gilt, wäre es möglicherweise fatal, Blut eines subklinisch infizierten Rindes aufgrund des asymptomatischen Verlaufs unwissentlich zur Transfusion zu verwenden. Da eine experimentelle Infektion durch Übertragung von Vollblut BKF-kranker Rinder auf gesunde Tiere möglich ist und dadurch auch eine Erkrankung induziert werden kann (Götze und Liess 1929), könnte dies trotz des sehr niedrigen OvHV-2-Genomgehaltes im Blut (Kap. IV.2.3.1) theoretisch auch für subklinisch-infizierte Rinder gelten.

2.3. Vergleich des relativen OvHV-2-Genomgehaltes im Blut und in verschiedenen Organen OvHV-2-infizierter Tiere

Die Quantifizierung des relativen OvHV-2-Genomgehaltes im Blut verschiedener Tiere mit einer OvHV-2-Infektion ließ einen Zusammenhang zwischen der Stärke der klinischen Symptome und dem Gehalt an zirkulierenden virusinfizierten Zellen vermuten. Die subklinische Form bei Rindern stellte sich nämlich mit nur sehr niedrigen Werten an OvHV-2-Genomen in der PBL-Fraktion des Blutes dar. Der relative Genomgehalt im Blut der Schafe, die als Hauptwirt generell inapparent infiziert sind, liegt interessanterweise in einem vergleichbar niedrigen Bereich. Gerade bei Untersuchungen auf Bestandsebene, wo aufgrund der Zeitersparnis und des geringeren Kontaminationsrisikos eine Anwendung der real-time PCR sicherlich angebracht wäre, muss jedoch bedacht werden, dass die Sensitivität der seminested Methode nicht erreicht wird (Russell et al. 2009) und somit die Diagnose einer subklinischen Infektion durchaus erschwert sein könnte.

Durch den Vergleich des OvHV-2-Genomgehaltes der Organe eines an SA-BKF erkrankten Rindes wurde bestätigt, dass Virus-DNA in hohen Mengen vor allem in den beiden untersuchten Lymphknoten und der Milz nachzuweisen war, wie auch bei Crawford (1999) beschrieben. Der auch verhältnismäßig hohe OvHV-2-Genomgehalt im Uterus dieser Kuh, der etwa vergleichbar war mit dem Wert in der PBL-Fraktion, könnte mit einer vermehrten Durchblutung des Uterusgewebes aufgrund der Trächtigkeit zusammengehangen haben.

Die im Rahmen der Arbeit ermittelten Prävalenzdaten verdeutlichen, dass das Vorkommen von OvHV-2-Infektionen in bayerischen Betrieben häufig unterschätzt wird. Durch das nur sporadische Auftreten des SA-BKF besteht die Gefahr, dass diese Erkrankung bei vielen Landwirten aber auch Tierärzten in Vergessenheit gerät und auch häufig nicht erkannt wird. Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Dunkelziffer der nicht diagnostizierten oder nicht gemeldeten klinischen BKF-Fälle zu bestimmen. Es besteht daher insbesondere in Mischbetrieben nach wie vor ein Aufklärungsbedarf über diese Infektionskrankheit. Auf die einzige zurzeit wirksame Bekämpfungsmaßnahme, nämlich die bereits von Götze 1930 postulierte strikte Trennung von Schafen und Rindern, muss immer wieder hingewiesen werden.

Die noch wenig charakterisierte subklinische Infektionsform bei Rindern bietet auch zukünftig noch ein weites Forschungsfeld. Das Vorkommen subklinisch-infizierter Rinder in einzelnen Mischbetrieben in Bayern wurde mit dieser Arbeit belegt. Zudem wurden deutliche Unterschiede im relativen OvHV-2-Genomgehalt im Blut im Verlauf dieser Infektionsform im Vergleich zur akuten BKF-Erkrankung festgestellt. Ob die subklinische OvHV-2-Infektion auch mögliche Folgen auf die Fruchtbarkeit, Milchleistung oder den allgemeinen Gesundheitszustand des Tieres hat, sollte in künftigen Arbeiten noch fokussiert untersucht werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Prävalenz von Infektionen mit dem Ovinen Herpesvirus-2 (OvHV-2) in 20 Mischbetrieben mit Rindern und Schafen in Bayern

Birgt Sabine Rohleder

Das Ovine Herpesvirus-2 (OvHV-2) ist der Erreger des Schaf-assoziierten Bösartigen Katarrhalfiebers (SA-BKF), einer meist tödlich verlaufenden, lymphoproliferativen Erkrankung, die weltweit bei Rindern und anderen Ungulaten vorkommt. Die meisten der in Bayern beobachteten Fälle von SA-BKF bei Rindern sind auf eine gemeinsame Haltung mit Schafen zurückzuführen, die das Virusreservoir des OvHV-2 darstellen. Wie stark die Virusinfektion in bayerischen Schafherden verbreitet ist, konnte bisher nur vermutet werden. Für Rinder fehlten fundierte Daten über die Häufigkeit und Bedeutung möglicher subklinischer Infektionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in 20 bayerischen Mischbetrieben die jeweiligen Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen im Schaf- und Rinderbestand mittels eines kompetitiven ELISA und einer seminested PCR ermittelt und umfassende anamnestiche Daten zu den Betrieben erhoben. Es wurden zwei Studiengruppen zu je zehn Betrieben mit und entsprechend ohne klinische, virologisch bestätigte BKF-Fälle bei Rindern zwischen Januar 2007 und Dezember 2009 gebildet.

Alle untersuchten Schafherden waren zu einem großen Anteil OvHV-2-infiziert. In Betrieben der Gruppe 1, in denen klinische Fälle von BKF bei Rindern auftraten, lag die mediane Seroprävalenz BKF-Virus-spezifischer Antikörper der einzelnen Schafherden bei 100 % und die Prävalenz der mittels Genomnachweis festgestellten OvHV-2-Infektionen betrug 92 %. In den Schafherden der Gruppe 2 wurden dagegen nur eine Seroprävalenz von 73 % und eine OvHV-2-Genom-Prävalenz von 58 % festgestellt. Ebenso ergaben die Untersuchungen der Rinder einen klaren Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen. In Betrieben der Gruppe 1 lagen die Seroprävalenzen bei 24 % und ausschließlich in Betrieben dieser

Gruppe war bei 13 Rindern OvHV-2-DNA im Blut nachweisbar. Die Rinderbestände der Gruppe 2 waren nur zu 16 % seropositiv für BKF-Erreger-spezifische Antikörper und das Blut keines der Tiere reagierte in der PCR. Dass vor allem in den untersuchten Mischbetrieben, in denen ein besonders enger und auch direkter Kontakt zwischen Schafen und Rindern bestand, sowohl die Seroprävalenzen bei den Rindern, als auch die Anzahl der Rinder mit nachweisbarer OvHV-2-DNA im Blut relativ hoch waren, lässt auf einen ursächlichen Zusammenhang schließen.

Außerdem traten in diesen Mischbetrieben, die zudem sehr hohe OvHV-2-Prävalenzen in den Schafherden hatten, auch subklinische OvHV-2-Infektionen bei elf Rindern auf. Diese Tiere zeigten bei wiederholter Untersuchung auch bis zu eineinhalb Jahren nach initialer Diagnose keine mit BKF assoziierbaren klinischen Symptome.

Der auf die Zellzahl normierte Gehalt an OvHV-2-Genomkopien in den Blutproben dieser Rinder, wie interessanterweise auch der Schafe, lag in einem Bereich von $1,7 \times 10^{-4}$ bis $1,7 \times 10^{-1}$ OvHV-2-Genomkopien. In Blutproben von Rindern mit klinischem BKF dagegen lag der relative OvHV-2-Genomgehalt deutlich höher. In den Organproben eines akut an BKF erkrankten Rindes schließlich wurde der höchste relative OvHV-2-Genomgehalt in den Lymphknoten und der Milz nachgewiesen. Der relative OvHV-2-Genomgehalt von *in vitro* kultivierten, mit Con A stimulierbaren Lymphozyten eines subklinisch infizierten Rindes stieg im Laufe von zehn Wochen deutlich an, fiel jedoch nach einem Peak bei $8,4 \times 10^2$ wieder ab.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen liegen erstmals Prävalenzdaten zu OvHV-2-Infektionen in selektierten bayerischen Rinder- und Schafherden vor. Die Ergebnisse zeigen, dass die meisten untersuchten Schafe tatsächlich mit OvHV-2 infiziert sind und dass subklinische OvHV-2-Infektionen des Rindes in Bayern durchaus vorkommen. Da über diese Form der Infektion bei Rindern noch wenig bekannt ist und generell das Vorkommen der OvHV-2-Infektionen in Bayern unterschätzt wird, besteht ein weiterer Forschungs- und Aufklärungsbedarf.

VII. SUMMARY

A survey of prevalences of Ovine-Herpesvirus-2 (OvHV-2) infections in 20 Bavarian farms keeping cattle and sheep

Birgit Sabine Rohleder

Ovine Herpesvirus-2 (OvHV-2) is the causative agent of sheep associated Malignant Catarrhal Fever (SA-MCF). The lymphoproliferative disease occurs worldwide and is mostly fatal in bovines and several other ungulates. Most cases of SA-MCF in cattle can be attributed to the fact that cattle and sheep, the reservoir hosts of OvHV-2, are kept together. Before this study the prevalences of OvHV-2 infections in sheep flocks as well as the relevance of subclinical infections in cattle were completely unknown for Bavaria.

Therefore the aim of this study was to determine the prevalences of OvHV-2 infections in sheep and cattle in selected farms in Bavaria, keeping a special focus on subclinical infections in bovines. Two groups of ten farms each were defined based on the presence or absence of confirmed cases of clinical sheep-associated malignant catarrhal fever (SA-MCF) in cattle between January 2007 and December 2009. Samples collected from all 20 farms were analyzed for the presence of specific antibodies by competitive ELISA and of OvHV-2 genomes by seminested PCR. Further anamnestic information regarding the farms was collected by questionnaire.

As expected, most sheep tested were infected with OvHV-2. In farms of group 1, where clinical cases of SA-MCF had been observed, the median prevalence of antibodies against MCF-Viruses in sheep sera reached 100 % and the prevalence of OvHV-2 infections as judged by PCR was 92 %. In contrast, for sheep of group 2 a seroprevalence of 73 % and OvHV-2-genome-prevalence of 58 % only was noted. The cattle data confirmed these interesting differences. 13 animals of group 1 were OvHV-2-DNA positive and median seroprevalences within herds were 24 %, whereas in cattle herds belonging to group 2 seroprevalences were 16 % and in none of these samples OvHV-2 genomes were detected.

Especially in farms where cattle had close and direct contact to sheep, seroprevalences as well as the rate of OvHV-2-DNA positive cattle were particularly high. Hence, a connection could be confirmed.

In these farms eleven cattle were identified in addition to be subclinically infected with OvHV-2 and further analyses could be conducted. These bovines did not show any MCF-like clinical symptoms, not even in repeated clinical investigation up to 1.5 years after the initial diagnosis. Blood samples of these animals, similar to those of several sheep assayed, contained 1.7×10^{-4} to 1.7×10^{-1} OvHV-2 genome copies per cell. In clinically affected cattle a markedly higher relative amount of OvHV-2 copies was quantified. Finally, samples collected from organs of a cow euthanized due to acute SA-MCF, showed the highest relative amount of OvHV-2 genome copies in the lymph nodes and spleen.

The numbers of OvHV-2 genome copies in *in vitro* cultured lymphocytes of a subclinically infected calf were measured over time and a peak of 8.4×10^2 OvHV-2 copies per cell detected. These cultured lymphocytes were successfully stimulated with ConA.

For the first time reliable prevalence data of OvHV-2-infections in selected Bavarian farms keeping cattle and sheep were obtained. The results showed that the vast majority of all sheep examined were infected. Furthermore, it was shown that subclinical infections also occur in cattle in Bavaria. Very little is known about this particular type of OvHV-2infection to date. Moreover the overall impact of OvHV-2 infections in Bavaria is still underestimated. Hence, further research is needed to understand and clarify these issues.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abu Elzein E.M., Housawi F.M., Gameel A.A., Al-Afaleq A.I., El-Bashir A.M., Sheep-associated malignant catarrhal fever involving 3-5-week-old calves in Saudi Arabia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50, 53-59.

Ackermann M., Virus im Schafspelz. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2005; 147, 155-164.

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

Albini S., Zimmermann W., Neff F., Ehlers B., Hani H., Li H., Hüssy D., Casura C., Engels M., Ackermann M., Porcines Bösartiges Katarrhalfieber: Diagnostische Befunde und erstmaliger Nachweis des Erregers bei erkrankten Schweinen in der Schweiz. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2003; 145, 61-68.

Baxter S.I., Pow I., Bridgen A., Reid H.W., PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch Virol* 1993; 132, 145-159.

Baxter S.I., Wiyono A., Pow I., Reid H.W., Identification of ovine herpesvirus-2 infection in sheep. *Arch Virol* 1997; 142, 823-831.

Beatson N.S., Fennessy P.F., Drew K.R., Field observations of malignant catarrhal fever in red deer in New Zealand. *New Zealand Agricultural Bulletin* 1985; 22, 13-18.

Blood D.C., Henderson J.A., Radostits O.M., Malignant Catarrhal Fever. In: Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. (Hrsg.), *Veterinary medicine*, 9. Auflage. London: WB Saunders Company Ltd., 2000; pp. 1081-1085.

Brenner J., David D., Sheep-associated Malignant Catarrhal Fever in cattle (SA-MCF): Recent clinical and epidemiological aspects in Israel. *Isr J Vet Med* 2005; 60, 19-22.

Bridgen A., Reid H.W., Derivation of a DNA clone corresponding to the viral agent of sheep-associated malignant catarrhal fever. *Res Vet Sci* 1991; 50, 38-44.

Burrells C., Reid H.W., Phenotypic analysis of lymphoblastoid cell lines derived from cattle and deer affected with "sheep-associated" malignant catarrhal fever. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 29, 151-161.

Buxton D., Reid H.W., Finlayson J., Pow I., Pathogenesis of 'sheep-associated' malignant catarrhal fever in rabbits. *Res Vet Sci* 1984; 36, 205-211.

Buxton D., Jacoby R.O., Reid H.W., Goodall P.A., The pathology of "sheep-associated" malignant catarrhal fever in the hamster. *J Comp Pathol* 1988; 98, 155-166.

Collins J.K., Bruns C., Vermedahl T.L., Schiebel A.L., Jessen M.T., Schultheiss P.C., Anderson G.M., Dinsmore R.P., Callan R.J., DeMartini J.C., Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction survey for ovine herpesvirus 2 and other persistent herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12, 406-411.

Cortez P.P., Carvalheira J., Pauperio S., Thompson G., Prevalence of ovine herpesvirus type 2 in north-west Portugal. *Vet Rec* 2008; 162, 282-284.

Costa E.A., Bomfim M.R., da Fonseca F.G., Drumond B.P., Coelho F.M., Vasconcelos A.C., Furtini R., Paixao T.A., Tsolis R.M., Santos R.L. et al., Ovine herpesvirus 2 infection in Foal, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009; 15, 844-845.

Crawford T.B., Li H., O'Toole D., Diagnosis of malignant catarrhal fever by PCR using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11, 111-116.

Cunha C.W., Otto L., Taus N.S., Knowles D.P., Li H., Development of a multiplex real-time PCR for detection and differentiation of malignant catarrhal fever viruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2009; 47, 2586-2589.

David D., Dagoni I., Garazi S., Perl S., Brenner J., Two cases of the cutaneous form of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle. *Vet Rec* 2005; 156, 118-120.

Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Minson A.C., Pellett P.E., Roizman B., Studdert M.J., Thiry E., The order Herpesvirales. *Arch Virol* 2009; 154, 171-177.

Ellis J.A., O'Toole D.T., Haven T.R., Davis W.C., Predominance of BoCD8-positive T lymphocytes in vascular lesions in a 1-year-old cow with concurrent malignant catarrhal fever and bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet Pathol* 1992; 29, 545-547.

Fraser S.J., Nettleton P.F., Dutia B.M., Haig D.M., Russell G.C., Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against malignant catarrhal fever viruses in cattle serum. *Vet Microbiol* 2006; 116, 21-28.

Frölich K., Li H., Müller-Doblies U., Serosurvey for antibodies to malignant catarrhal fever-associated viruses in free-living and captive cervids in Germany. *J Wildl Dis* 1998; 34, 777-782.

Götze R., Liess J., Erfolgreiche Übertragungsversuche des bösartigen Katarrhalfiebers von Rind zu Rind. Identität mit der Südafrikanischen Snotsiekte. Dtsch Tierärztl Wschr 1929; 37, 433-437.

Götze R., Untersuchungen über das bösartige Katarrhalfieber des Rindes. Dtsch Tierärztl Wschr 1930; 38, 478-491.

Götze R., Liess J., Untersuchungen über das bösartige Katarrhalfieber des Rindes. Schafe als Überträger. Dtsch Tierärztl Wschr 1930; 38, 194-200.

Hänichen T., Reid H.W., Wiesner H., Hermanns W., Bösartiges Katarrhalfieber bei Zoowiederkäuern. Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere 1998; 26, 294-300.

Harris R.E., Christiansen K.H., Blunt M.H., Observations on the epidemiology of malignant catarrhal fever. N Z Vet J 1978; 26, 86-87.

Hart J., Ackermann M., Jayawardane G., Russell G., Haig D.M., Reid H., Stewart J.P., Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genome. J Gen Virol 2007; 88, 28-39.

Hua Y., Li H., Crawford T.B., Quantitation of sheep-associated malignant catarrhal fever viral DNA by competitive polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest 1999; 11, 117-121.

Hüssy D., Stäuber N., Leutenegger C.M., Rieder S., Ackermann M., Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8, 123-128.

Hüssy D., Janett F., Albini S., Stäuber N., Thun R., Ackermann M., Analysis of the pathogenetic basis for shedding and transmission of ovine gamma herpesvirus 2. J Clin Microbiol 2002; 40, 4700-4704.

ICTV, ICTVdB - The Universal Virus Database. 00.031.3. Gammaherpesvirinae. Adresse: <http://phene.cpmc.columbia.edu/ICTVdB/00.031.3.02.htm>. Letzter Zugriff: 15. März 2010.

Jacobsen B., Thies K., von Altröck A., Förster C., König M., Baumgärtner W., Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in three goats. Vet Microbiol 2007; 124, 353-357.

Kaaden O.-R., Bösartiges Katarrhalfieber (BKF). In: Rolle M., Mayr A. (Hrsg.), Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag, 2002; pp. 188-190.

Kim O., Li H., Crawford T.B., Demonstration of sheep-associated malignant catarrhal fever virions in sheep nasal secretions. Virus Res 2003; 98, 117-122.

Kojouri G.A., Mahmoodi P., Momtaz H., Identification of SA-MCFV DNA in blood, lymph node, and spleen of adult sheep, healthy cattle, and MCF cattle by PCR. Comp clin pathol 2009; 18, 113-118.

Li H., Shen D.T., Knowles D.P., Gorham J.R., Crawford T.B., Competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for antibody in sheep and other ruminants to a conserved epitope of malignant catarrhal fever virus. *J Clin Microbiol* 1994; 32, 1674-1679.

Li H., Shen D.T., O'Toole D., Knowles D.P., Gorham J.R., Crawford T.B., Investigation of sheep-associated malignant catarrhal fever virus infection in ruminants by PCR and competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33, 2048-2053.

Li H., Snowden G., O'Toole D., Crawford T.B., Transmission of ovine herpesvirus 2 in lambs. *J Clin Microbiol* 1998; 36, 223-226.

Li H., Snowden G., Crawford T.B., Production of malignant catarrhal fever virus-free sheep. *Vet Microbiol* 1999; 65, 167-172.

Li H., Snowden G., O'Toole D., Crawford T.B., Transmission of ovine herpesvirus 2 among adult sheep. *Vet Microbiol* 2000; 71, 27-35.

Li H., Hua Y., Snowden G., Crawford T.B., Levels of ovine herpesvirus 2 DNA in nasal secretions and blood of sheep: implications for transmission. *Vet Microbiol* 2001a; 79, 301-310.

Li H., McGuire T.C., Müller-Doblies U.U., Crawford T.B., A simpler, more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to malignant catarrhal fever viruses. *J Vet Diagn Invest* 2001b; 13, 361-364.

Li H., Taus N.S., Lewis G.S., Kim O., Traul D.L., Crawford T.B., Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode for transmission. *J Clin Microbiol* 2004; 42, 5558-5564.

Li H., Gailbreath K., Flach E.J., Taus N.S., Cooley J., Keller J., Russell G.C., Knowles D.P., Haig D.M., Oaks J.L. et al., A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. *J Gen Virol* 2005; 86, 3021-3026.

Li H., Taus N.S., Jones C., Murphy B., Evermann J.F., Crawford T.B., A devastating outbreak of malignant catarrhal fever in a bison feedlot. *J Vet Diagn Invest* 2006a; 18, 119-123.

Li H., Taus N.S., Oaks J.L., Sheep-associated malignant catarrhal fever virus: prospects for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2006b; 5, 133-141.

Li H., Karney G., O'Toole D., Crawford T.B., Long distance spread of malignant catarrhal fever virus from feedlot lambs to ranch bison. *Can Vet J* 2008; 49, 183-185.

Løken T., Bosman A.M., van Vuuren M., Infection with Ovine herpesvirus 2 in Norwegian herds with a history of previous outbreaks of malignant catarrhal fever. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21, 257-261.

Martucciello A., Marianelli C., Capuano M., Astarita S., Alfano D., Galiero G., An outbreak of malignant catarrhal fever in Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). Large Animal Review 2006; 12, 21-24.

Meier-Trummer C.S., Rehrauer H., Franchini M., Patrignani A., Wagner U., Ackermann M., Malignant catarrhal fever of cattle is associated with low abundance of IL-2 transcript and a predominantly latent profile of ovine herpesvirus 2 gene expression. PLoS One 2009; 4, e6265.

Metzler A.E., Burri H.R., Zur Ätiologie des schaforiginären "böartigen Katarrhalfiebers": serologische Befunde bei Rindern und Schafen mit Wiederkäufer-Gammaherpesviren. Tierärztl Prax 1991; 19, 135-140.

Mirangi P.K., Kang'ee F.M., Detection of ovine herpesvirus 2 in Kenyan sheep by polymerase chain reaction. Vet Rec 1997; 141, 176-177.

Mitchell E.S., Scholes S.F., Unusual presentation of malignant catarrhal fever involving neurological disease in young calves. Vet Rec 2009; 164, 240-242.

Müller-Doblies U.U., Li H., Hauser B., Adler H., Ackermann M., Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. J Clin Microbiol 1998; 36, 2970-2972.

Müller-Doblies U.U., Egli J., Hauser B., Li H., Strasser M., Ehrensperger F., Braun U., Ackermann M., Bösertiges Katarrhalfieber in der Schweiz: 2. Teil: Evaluation der Diagnostik. Schweiz Arch Tierheilkd 2001a; 143, 581-591.

Müller-Doblies U.U., Egli J., Li H., Braun U., Ackermann M., Bösertiges Katarrhalfieber in der Schweiz. 1. Teil: Epidemiologie. Schweiz Arch Tierheilkd 2001b; 143, 173-183.

Munday J.S., French A.F., Smith A., Wang J., Squires R.A., Probable malignant catarrhal fever presented as transient generalised crusting dermatitis in a cow. N Z Vet J 2008; 56, 89-93.

Mushi E.Z., Wafula J.S., Infectivity of cell-free malignant catarrhal fever virus in rabbits and cattle. Vet Res Commun 1983; 6, 153-155.

O'Toole D., Li H., Roberts S., Rovnak J., DeMartini J., Cavender J., Williams B., Crawford T., Chronic generalized obliterative arteriopathy in cattle: a sequel to sheep-associated malignant catarrhal fever. J Vet Diagn Invest 1995; 7, 108-121.

O'Toole D., Li H., Miller D., Williams W.R., Crawford T.B., Chronic and recovered cases of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle. Vet Rec 1997; 140, 519-524.

OIE, Technical disease card. Malignant Catarrhal Fever. Adresse: http://www.oie.int/eng/maladies/Technical%20disease%20cards/MALIGNANT%20CATHARRAL%20FEVER_FINAL.pdf. Letzter Zugriff: 20. Feb. 2010.

Otter A., Pow I., Reid H.W., Outbreak of malignant catarrhal fever in Welsh Black cattle in Carmarthenshire. *Vet Rec* 2002; 151, 321-324.

Plowright W., Macadam R.F., Armstrong J.A., Growth and Characterization of the Virus of Bovine Malignant Catarrhal Fever in East Africa. *J Gen Microbiol* 1965; 39, 253-266.

Plowright W., Malignant Catarrhal fever. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 152, 795-804.

Powers J.G., VanMetre D.C., Collins J.K., Dinsmore R.P., Carman J., Patterson G., Brahmhatt D., Callan R.J., Evaluation of ovine herpesvirus type 2 infections, as detected by competitive inhibition ELISA and polymerase chain reaction assay, in dairy cattle without clinical signs of malignant catarrhal fever. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227, 606-611.

Reid H.W., Buxton D., Berrie E., Pow I., Finlayson J., Malignant catarrhal fever. *Vet Rec* 1984; 114, 581-583.

Reid H.W., Buxton D., McKelvey W.A., Milne J.A., Appleyard W.T., Malignant catarrhal fever in Père David's deer. *Vet Rec* 1987; 121, 276-277.

Reid H.W., Buxton D., Pow I., Finlayson J., Isolation and characterisation of lymphoblastoid cells from cattle and deer affected with 'sheep-associated' malignant catarrhal fever. *Res Vet Sci* 1989; 47, 90-96.

Roizmann B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C., Studdert M.J., The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 1992; 123, 425-449.

Rosbottom J., Dalziel R.G., Reid H.W., Stewart J.P., Ovine herpesvirus 2 lytic cycle replication and capsid production. *J Gen Virol* 2002; 83, 2999-3002.

Rossiter P.B., Jessett D.M., Mushi E.Z., Karstad L., Antibodies to malignant catarrhal fever virus antigens in the sera of normal and naturally infected cattle in Kenya. *Res Vet Sci* 1980; 29, 235-239.

Rossiter P.B., Antibodies to malignant catarrhal fever virus in sheep sera. *J Comp Pathol* 1981; 91, 303-311.

Rossiter P.B., Antibodies to malignant catarrhal fever virus in cattle with non-wildebeest-associated malignant catarrhal fever. *J Comp Pathol* 1983; 93, 93-97.

Russell G.C., Stewart J.P., Haig D.M., Malignant catarrhal fever: a review. *Vet J* 2009; 179, 324-335.

Schock A., Collins R.A., Reid H.W., Phenotype, growth regulation and cytokine transcription in Ovine Herpesvirus-2 (OHV-2)-infected bovine T-cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66, 67-81.

Schuller W., Cerny-Reiterer S., Silber R., Evidence that the sheep associated form of malignant catarrhal fever is caused by a herpes virus. Zentralbl Veterinarmed B 1990; 37, 442-447.

Simon S., Li H., O'Toole D., Crawford T.B., Oaks J.L., The vascular lesions of a cow and bison with sheep-associated malignant catarrhal fever contain ovine herpesvirus 2-infected CD8(+) T lymphocytes. J Gen Virol 2003; 84, 2009-2013.

Smith B.P., Malignant Catarrhal Fever. In: Smith B.P. (Hg.), Large Animal Internal Medicine: Diseases of Horses, Cattle, Sheep, and Goats, 2. Auflage. St. Louis: Elsevier Health Sciences, 1996; pp. 814.

Stöber M., Allgemeine Untersuchung. In: Rosenberger G. (Hg.), Die klinische Untersuchung des Rindes, 3. Auflage. Berlin und Hamburg: Paul Parey Verlag, 1990.

Stöber M., Bösartiges Katarrhalfieber. In: Dirksen G., Gründer H.-D., Stöber M. (Hrsg.), Innere Medizin und Chirurgie des Rindes, 5. Auflage. Stuttgart: Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH und Co. KG, 2006; pp. 1217.

Strohbücker S., Vorkommen und klinische Bedeutung von Infektionen mit dem Ovinen Herpesvirus 2 (OHV-2) bei Rindern und Schafen. Vet med Diss, JLU Gießen 2005.

Swa S., Wright H., Thomson J., Reid H., Haig D., Constitutive activation of Lck and Fyn tyrosine kinases in large granular lymphocytes infected with the gamma-herpesvirus agents of malignant catarrhal fever. Immunology 2001; 102, 44-52.

Taus N.S., Oaks J.L., Gailbreath K., Traul D.L., O'Toole D., Li H., Experimental aerosol infection of cattle (*Bos taurus*) with ovine herpesvirus 2 using nasal secretions from infected sheep. Vet Microbiol 2006; 116, 29-36.

Taus N.S., Herndon D.R., Traul D.L., Stewart J.P., Ackermann M., Li H., Knowles D.P., Lewis G.S., Brayton K.A., Comparison of ovine herpesvirus 2 genomes isolated from domestic sheep (*Ovis aries*) and a clinically affected cow (*Bos bovis*). J Gen Virol 2007; 88, 40-45.

Thonur L., Russell G.C., Stewart J.P., Haig D.M., Differential transcription of ovine herpesvirus 2 genes in lymphocytes from reservoir and susceptible species. Virus Genes 2006; 32, 27-35.

Traul D.L., Taus N.S., Lindsay Oaks J., O'Toole D., Rurangirwa F.R., Baszler T.V., Li H., Validation of nonnested and real-time PCR for diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever in clinical samples. J Vet Diagn Invest 2007; 19, 405-408.

Wan S.K., Castro A.E., Heuschele W.P., Ramsay E.C., Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to the alcelaphine herpesvirus of malignant catarrhal fever in exotic ruminants. *Am J Vet Res* 1988; 49, 164-168.

Wani S.A., Bhat M.A., Samanta I., Buchoo B.A., Ishaq S.M., Pandit F., Shah G.U., Buchh A.S., Clinical, serological and molecular evidence of sheep-associated malignant catarrhal fever in India. *Vet Rec* 2004; 155, 242-244.

Wani S.A., Samanta I., Pandit F., Buchoo B.A., Peer F., Bhat M.A., Molecular epidemiology of ovine herpesvirus type 2 infection in Kashmir, India. *Vet Rec* 2006; 159, 587-590.

Yazici Z., Arslan H.H., Gumusova S.O., Meral Y., Albayrak H., Occurrence of ovine herpesvirus type-2 infection in sheep and cattle in Samsun Province, Turkey. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2006; 113, 348-350.

Yeşilbağ K., Seroprevalence of malignant catarrhal fever-related gammaherpesviruses in domestic ruminants in Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2007; 39, 363-368.

IX. ANHANG

1. Tabellenverzeichnis

Tab. III.1: Betriebe in Gruppe 1.....	29
Tab. III.2: Betriebe in Gruppe 2.....	30
Tab. III.3: Daten zusätzlicher Probennahmen bei ausgewählten Rindern mit einer OvHV-2-Infektion.....	32
Tab. III.4: Daten zusätzlicher Probennahmen bei ausgewählten Schafen mit einer OvHV-2-Infektion.....	32
Tab. IV.1: Zusammenfassung der anamnestischen Daten von zehn Betrieben mit klinischen BKF-Erkrankungen bei Rindern zwischen Jan. 2007 und Dez. 2009 (Gruppe 1) und zehn Betrieben ohne BKF-Fälle in diesem Zeitraum (Gruppe 2).....	60
Tab. IV.2: Nachweise von Antikörpern gegen BKF-Erreger im Serum (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) und von OvHV-2-DNA im Blut und Nasentupfermaterial (seminested PCR) ausgewählter Rinder zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.....	63
Tab. IV.3: Alter, Geschlecht und Rasse der einzelnen OvHV-2-infizierten Rinder.....	65
Tab. IV.4: Nachweise von Antikörpern gegen BKF-Erreger im Serum (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) und von OvHV-2-DNA im Blut und Nasentupfermaterial (seminested PCR) bei ausgewählten Schafen zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.....	66
Tab. V.1: In verschiedenen Studien ermittelte Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen bei Schafen und Rindern.....	83

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. II.1: Phylogenetische Beziehungen der Viren, die von Li et al. 2005 als Subgruppe Rhadinoviren der Wiederkäuer Typ 1 bezeichnet wurden. Die Verwandtschaftsverhältnisse basieren auf Teilsequenzen der DNA-Polymerase. Hauptwirte bzw. Tierarten, bei denen das Virus nachgewiesen wurde, sind in Klammern angegeben. Die unterstrichenen Viren sind mit klinischen BKF-Erkrankungen assoziiert. Die Darstellung wurde modifiziert nach einem von Li et al. 2005 generierten phylogenetischen Stammbaum. 5

Abb. III.1: Karte des Freistaates Bayern mit Landkreisgrenzen. Rot: Betriebe mit virologisch bestätigten klinischen BKF-Fällen im Rinderbestand zwischen Jan. 2007 und Dez. 2009 (Gruppe 1), grün: Betriebe ohne klinische BKF-Fälle in diesem Zeitraum (Gruppe 2). 27

Abb. III.2: Ausschnitt der Mikrotiterplatte für die Untersuchung der Stimulierbarkeit von Zellen mit Mitogenen; A1 bis A4: kultivierte Lymphozyten des Rindes 97/21 mit drei unterschiedlichen Mitogenzugaben (ConA, PHA und PWM) und einer negativen Kontrolle ohne Mitogene (o.M.); B1 bis B4: Lymphozyten eines gesunden Rindes (Kontr.) mit den entsprechenden Mitogenzugaben und ohne Mitogene... 46

Abb. IV.1: Häufigkeit des Nachweises von Antikörpern gegen BKF-Erreger mittels kompetitivem ELISA (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) in den Seren der untersuchten Rinder ab einem Alter von 4 Monaten (n = 505) 48

Abb. IV.2: Häufigkeit des Nachweises von Antikörpern gegen BKF-Erreger mittels kompetitivem ELISA (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) in den Seren der untersuchten Schafe ab einem Alter von 4 Monaten (n = 304) 48

- Abb. IV.3:** Häufigkeit des Nachweises von Antikörpern gegen BKF-Erreger mittels kompetitivem ELISA (Malignant Catarrhal Fever cELISA, VMRD) in den Seren der untersuchten Rinder und Schafe ab einem Alter von 4 Monaten. Die Daten der beiden Studiengruppen sind getrennt aufgeführt. A und C: Betriebe der Gruppe 1, in denen klinisches BKF diagnostiziert wurde. B und D: Betriebe der Gruppe 2, in denen keine BKF-Symptome beobachtet worden waren..... 49
- Abb. IV.4:** Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den Rinderherden von fünf Betrieben der Gruppe 1 (Betriebe 1.1 bis 1.5) und neun Betrieben der Gruppe 2 (Betriebe 2.1 bis 2.9). Das 95%-Konfidenzintervall ist als dünne Linie angegeben. Wenn kein Konfidenzintervall dargestellt ist, wurden alle Rinder des Bestandes untersucht..... 50
- Abb. IV.5:** Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den Rinderherden von fünf Betrieben der Gruppe 1 (obere Punktreihe) und neun Betrieben der Gruppe 2 (untere Punktreihe). Der Median ist jeweils als blaue Linie eingezeichnet. 51
- Abb. IV.6:** Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den Schafherden von sechs Betrieben der Gruppe 1 (Betriebe 1.1 bis 1.6) und acht Betrieben der Gruppe 2 (Betriebe 2.1 bis 2.8). Das 95%-Konfidenzintervall ist als dünne Linie angegeben. Wenn kein Konfidenzintervall dargestellt ist, wurden alle Schafe des Bestandes untersucht..... 52
- Abb. IV.7:** Seroprävalenzen an BKF-Erreger-spezifischen Antikörpern in den Schafherden von sechs Betrieben der Gruppe 1 (obere Punktreihe) und acht Betrieben der Gruppe 2 (untere Punktreihe). Der Median ist jeweils als blaue Linie eingezeichnet. 52
- Abb. IV.8:** Häufigkeit des Nachweises von OvHV-2-DNA mittels seminested PCR in den Blutproben der untersuchten Rinder (n=801) 54
- Abb. IV.9:** Prävalenzen an OvHV-2-Infektionen der Rinder (OvHV-2-Genomnachweis mittels seminested PCR) in zehn Rinderbeständen der Gruppe 1 (Betriebe 1.1 bis 1.10) und zehn Rinderbeständen der Gruppe 2 (Betriebe 2.1 bis 2.10). Das 95%-Konfidenzintervall ist als dünne Linie angegeben. Wenn kein Konfidenzintervall dargestellt ist, wurden alle Rinder des Bestandes untersucht. 55

- Abb. IV.10:** Prävalenzen von OvHV-2-Infektionen der Rinder in den Betrieben 1.1, 1.2, 1.3, 1.7 und 1.8. Der Median ist als blaue Linie eingezeichnet..... 56
- Abb. IV.11:** Häufigkeit des Nachweises von OvHV-2-DNA mittels seminested PCR in den Blutproben der untersuchten Schafe ab einem Alter von vier Monaten (n = 366) 56
- Abb. IV.12:** Häufigkeit des Nachweises von OvHV-2-DNA mittels seminested PCR in den Blutproben der untersuchten Schafe ab einem Alter von vier Monaten. Die Daten der beiden Studiengruppen sind getrennt aufgeführt. A: Betriebe der Gruppe 1, in denen klinisches BKF diagnostiziert wurde. B: Betriebe der Gruppe 2, in denen keine BKF-Symptome beobachtet worden waren. 57
- Abb. IV.13:** Prävalenzen an OvHV-2-Infektionen der Schafe (Virusgenomnachweis mittels seminested PCR) in neun Betrieben der Gruppe 1 (Betriebe 1.1 bis 1.6 und 1.8 bis 1.10) und zehn Betrieben der Gruppe 2 (Betriebe 2.1 bis 2.10). Betrieb 1.7 hatte seinen Schafbestand zum Zeitpunkt der Probennahme bereits abgeschafft. Das 95%-Konfidenzintervall ist als dünne Linie angegeben. Wenn kein Konfidenzintervall dargestellt ist, wurden alle Schafe des Bestandes untersucht. 58
- Abb. IV.14:** Prävalenzen der OvHV-2-Infektionen bei Schafen in neun Betrieben der Gruppe 1 (obere Punktreihe) und zehn Betrieben der Gruppe 2 (untere Punktreihe). Der Median ist jeweils als blaue Linie eingezeichnet..... 59
- Abb. IV.15:** Direkter Kontakt zwischen den Rindern und Schafen auf einem Betrieb der Gruppe 1 (Betrieb 1.8). Die Zebukälber und Schafe teilen sich hier dauerhaft Stall und Auslauf. Foto: Eigene Aufnahme..... 62
- Abb. IV.16:** OvHV-2-Genomgehalt relativ zum Zellgehalt im Blut von zehn selektierten Schafen. Die Zellzahl wurde nicht absolut bestimmt und dient dem Vergleich zwischen den analysierten Proben. 69
- Abb. IV.17:** OvHV-2-Genomgehalt relativ zum Zellgehalt im Blut der individuellen untersuchten Rinder und Schafe. Die Zellzahl wurde nicht absolut bestimmt und dient ausschließlich der Normierung der analysierten Proben. Die Werte der zehn untersuchten Schafe sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben (\emptyset Sf.). Tier 1248 war zum

Zeitpunkt der Analyse akut an BKF erkrankt. Bei Rind 1/11 waren die Symptome der akuten Erkrankung am Abklingen. Die übrigen Tiere zeigten keine BKF-Symptomatik. Abb. B stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. A dar. 71

Abb. IV.18: OvHV-2-Genomgehalt relativ zum Zellgehalt in zehn verschiedenen Organen und Geweben sowie im Blut eines akut an BKF erkrankten Rindes (Tier 1248). Die Zellzahl wurde nicht absolut bestimmt und dient ausschließlich der Normierung der analysierten Proben. 72

Abb. IV.19: Entwicklung des relativen OvHV-2-Genomgehaltes in *in vitro* kultivierten Lymphozyten des subklinisch infizierten Rindes 97/21 74

Abb. IV.20: Entwicklung des relativen OvHV-2-Genomgehaltes in *in vitro* kultivierten Lymphozyten des akut an BKF erkrankten Rindes 1248 76

Abb. IV.21: Lichtmikroskopische Darstellung der *in vitro* kultivierten Zellen des Rindes 97/21 (A1 bis A4) im Vergleich zu den frisch isolierten Lymphozyten eines OvHV-2-Genom negativen Rindes (B1 bis B4) in Zellkulturmedium 24 Stunden nach Zugabe der Mitogene ConA (A1 und B1), PHA (A2 und B2) und PWM (A3 und B3) bzw. ohne Mitogenzugabe (A4 und B4) bei 400-facher Primärvergrößerung 77

3. Fragebogen



Fragebogen

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

Allgemeine Betriebsdaten

Datum der
Probennahme: _____

Betriebs-ID:

Regierungsbezirk: UFR OFR MFR OPF
 NBY OBY SWB

Landkreis:

Name: _____

Straße/ Hausnr.: _____

PLZ / Ort: _____

Telefonnr.: _____ / _____

Betriebsnr. (HI-Tier): _____

Tiere

Rinder Schafe andere

Welche anderen Tiere?

Zahl der **Rinder** insgesamt:

davon _____ Kälber (bis 6 Monate)

_____ Jungtiere (über 6 bis 24 Monate bzw. weibliche bis zur 1. Kalbung)

_____ Kühe

_____ Bullen

Nutzungsart: Milchvieh Mutterkuhhaltung
 Mastvieh Aufzuchtbetrieb

Welche Art hauptsächlich? _____

Rasse(n): hauptsächlich gehalten: _____

andere Rassen gehalten: _____

Zahl der **Schafe** insgesamt:

davon _____ Lämmer (bis 9 Monate)

_____ Jungschafe (über 9 bis 18 Monate bzw. weibliche bis zum 1. Ablammen)

_____ Mutterschafe (ab 19 Monate)

_____ Böcke

Haupterwerb Hobbyhaltung

Nutzungsart: Zucht Milch Mast

Welche Art hauptsächlich: _____

Rasse(n): hauptsächlich gehalten: _____

andere Rassen gehalten: _____

Haltung

Rinder:

- ausschließlich Weidehaltung ausschließlich Stallhaltung
- Stall- und Weidehaltung

Haltungsform: Laufstall Anbindestall

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

Welche Tiergruppen wo? _____

Bei Stall und Weide kombiniert: saisonal ganzjährig

Welche Tiergruppen haben Weidegang? _____

Schafe:

- ausschließlich Weidehaltung ausschließlich Stallhaltung
- Stall- und Weidehaltung

Haltungsform: _____

Bei Stall und Weide kombiniert: saisonal ganzjährig

Welche Tiergruppen haben Weidegang?

Kontakt der Rinder und Schafe im Betrieb:

direkt: direkt auf der Weide direkt im Stall

Welche Tierarten/ Altersgruppen haben wie direkten Kontakt zueinander?

		ja	möglich	nein
<input type="checkbox"/> indirekt:	über Geräte (z.B. Schubkarren, Gabel, etc.):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	über Personen:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	durch den Weidewechsel:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Welche Tierarten/Altersgruppen haben indirekten Kontakt zueinander?

Zukäufe und Kontakt außerhalb

Zukäufe: ja nein

Welche Tierart (Rd./Sf.)? _____

Woher? _____

Wie viele/ welche (Ohrmarkennr.)? _____

Kontakt zu anderen Tieren/ Herden:

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

Tierverluste und Symptome

Tierverluste: ja nein

Welche Tierart (Rd./ Sf.)? _____

Wie viele? _____

Wodurch? _____

Seit Jan. 2007 vermehrt? _____

BKF-Fälle: ja nein/ unbekannt

Falls „ja“: Wann? _____

Wie viele seit Jan. 2007? _____

Welche Altersgruppe(n)? _____

Sind seit Jan. 2007 folgende **Symptome** im Bestand aufgetreten?

Rd. Sf.

Läsionen an Flotzmaul/ Lippen/ Nasenöffnungen _____

Läsionen in der Maulhöhle _____

Nasenausfluss (klar/ getrübt) _____

Augenveränderungen (Ausfluss/ Konjunktiven/ Hornhaut/
Skleren)

Rd. Sf.

Ödeme am Kopf/ um die Augen _____

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

Fieber _____

Durchfall _____

Haut-/ Fellveränderungen (rund/ flächig, schuppig/ nässend,
Krusten) _____

Reproduktionsstörungen (Umrindern/ -bocken? Aborte/
Früh-/ Totgeburten? Missbildungen? Lebensschwache
Kälber/ Lämmer?) _____

4. Untersuchungskarte

Klinik-Nr.: / Einstellung: Entlassung:	Tierart Rasse Geschlecht Alter OM re OM li	Besitzer HTA: PIP:	Bestand: Zahl: Zucht / Mast / beides IBR-frei / Impfbetrieb / unbekannt mit / ohne Zukauf Tier: Nachzucht / Zukauf	Entlassungsstatus: offen / geheilt / gebessert / unverändert / zur Beobachtung / Weiterbehandlung / Verwertung / euth. / verendet / verwendet eingeleitet Diagnose(n):	nach: Hause / LGL / Patho / TBA / andere Klinik / Verwertung	
trchtig seit: letzte Kalbung: steht trocken / wird gemolken Milchleistung vorher: jetzt: Fütterung: TMR / Grünfutter Sonstiges Aufstllung: letzte Klauenpflege:			Untersucher: Körpergewicht: Weide			
Verhalten: Abdomenform Pansen: Mot. Fllg. Schichtig. FK-Proben: R. Griff Schm. Perk. Stab P. PA SA Bauchdecke Darmmotorik Leberperk.			Rektal: Darmbein-Lnn. Unterdruck Bauchfell Pansen Niere Geschl. App. Sonstiges Sonstige Befunde:	Ernährungszustand: Pflegezustand: Appetit: Bewegungsapp.: Klauen: ZNS: unauffr./nicht näher unters./s.U.		
Herzfreq. /min Intens. Rhythmus Abges. Gerausche Skleralgefe Venen Lymphknoten Atemfrequenz /min Typ Auskult.	NAH / / / Lungenperkussion	Kathester-/Spontan- /prov. Ham Farbe pH Transpar. Spez. Gew. Sonstig.	Eiw. Gluk. K.K. Hb/Ery			
			VR(A) HR(B) VL(C) HL(D)			

X. DANKSAGUNG

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen beiden Projekt-Kolleginnen Alexandra Hund und Gundula Egger, ohne die meine Promotionszeit nicht halb so lustig und nett verlaufen wäre. Danke für die vielen unvergesslichen Erlebnisse und für die Motivation, Kollegialität und Freundschaft.

Bei den Betriebsleitern und ihren Familien möchte ich mich ganz herzlich für die Teilnahme an der Studie bedanken, für ihre Unterstützung bei der Probennahme, die Beantwortung der vielen Fragen und vor allem für die netten Gespräche und die sehr gute Bewirtung im Anschluss.

Für die sehr gute und motivierende Betreuung des Projektes und die Hilfestellung beim Erstellen dieser Arbeit danke ich PD Dr. Antonie Neubauer-Juric und Dr. Nicole Gollnick.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Klee danke ich für die Funktion als Doktorvater und die Vertretung dieser Arbeit vor dem Promotionsausschuss.

Bei Dr. Carola Sauter-Louis und Prof. Dr. Rolf Biehler möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe und Unterstützung bei allen statistischen Fragestellungen bedanken.

Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Veterinärvirologischen Labors am LGL Anita, Birgit, Franziska, Isa, Janice, Kirsten, Manu, Nicki, Patrizia, Petra, Sandra, Sonja, Steffi und Verena, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und auch immer wieder durch nette Gespräche, sehr leckere Kuchen und Kekse und lustige, gemeinsame Unternehmungen den Laboralltag versüßt haben. Danke auch an Axel Groß, den weltbesten Schaffänger, und auch sämtliche weitere Helfer, die uns bei den Beprobungen unterstützt haben.

Dem Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz danke ich für die Finanzierung des Projektes.

Bei Jonas, meinen Eltern und Geschwistern und bei meinen Freunden möchte ich mich von ganzem Herzen dafür bedanken, dass sie mich unermüdlich motiviert, mir unterstützend zur Seite gestanden und immer wieder auch für den nötigen Freizeitausgleich gesorgt haben.