

NOVA ACTA LEOPOLDINA

NEUE FOLGE, BAND 95, NUMMER 350

BVD – eine (un)heimliche Rinderseuche

Gemeinsames Symposium der Deutschen Akademie
der Naturforscher Leopoldina und der Österreichischen
Akademie der Wissenschaften

am 22. und 23. Juni 2006 in Wien

Gottfried Brem (Hrsg.)



Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle (Saale) 2008
In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

BVD – eine (un)heimliche Rinderseuche

Für die finanzielle Unterstützung des Symposiums danken die Veranstalter dem österreichischen Bundesministerium für Gesundheit und Frauen sowie den Firmen IDEXX, Andiatec und Xenogenetik.

NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Im Auftrage des Präsidiums herausgegeben von

HARALD ZUR HAUSEN

Vizepräsident der Akademie

NEUE FOLGE

NUMMER 350

BAND 95

BVD – eine (un)heimliche Rinderseuche

**Gemeinsames Symposium
der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina
und der Österreichischen Akademie der Wissenschaften**

am 22. und 23. Juni 2006 in Wien

Wissenschaftliche Vorbereitung und Organisation:

Gottfried BREM (Wien)
Senator der Leopoldina

Mit 41 Abbildungen und 22 Tabellen



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle (Saale) 2008
In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart**

Redaktion: Dr. Michael KAASCH und Dr. Joachim KAASCH

**Die Schriftenreihe Nova Acta Leopoldina erscheint bei der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Birkenwaldstraße 44, 70191 Stuttgart, Bundesrepublik Deutschland.
Jedes Heft ist einzeln käuflich!**

Die Schriftenreihe wird gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie das Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt.

Einbandbild:

Die Bovine Virus-Diarrhoe (BVD) ist eine von einem Virus verursachte Tierseuche. Im Gegensatz zur Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) kann sie nicht auf den Menschen übertragen werden; sie verursacht aber in Rinderbeständen erhebliche wirtschaftliche Schäden. Das BVD-Virus nutzt für seine Weiterverbreitung den noch vom Immunsystem ungeschützten fetalen Organismus als Eintrittspforte und manifestiert sich dort völlig ungestört. Es verlässt den infizierten Organismus nicht wieder. Der Erfolg von Maßnahmen im Bereich der Tierseuchenbekämpfung ist davon abhängig, dass die erhobenen Daten und Tieridentitäten fehlerfrei vorliegen. Für BVD kann durch Untersuchung von Ohrstanzgewebe ein Virusnachweis geführt werden. Die für die Diagnose relevante Probenahme kann bereits bei der für alle Rinder vorgeschriebenen Kennzeichnung der Tiere erfolgen und der Befund in den Tierpass eingetragen werden. Gezeigt ist die Beprobung eines neugeborenen Kalbes für die BVD-Diagnose mittels Gewebeentnahme-Ohrmarke. Siehe Beitrag BREM auf S. 85–96.

Bibliografische Information Der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Die Abkürzung ML hinter dem Namen der Autoren steht für Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdruckes, der fotomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen und dgl. in diesem Heft berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Namen ohne weiteres von jedermann benutzt werden dürfen. Vielmehr handelt es sich häufig um gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen, auch wenn sie nicht eigens als solche gekennzeichnet sind.

© 2008 Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e. V.
06019 Halle (Saale), Postfach 11 05 43, Tel. + 49 345 4723934
Hausadresse: 06108 Halle (Saale), Emil-Abderhalden-Straße 37
Herausgeber: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Harald ZUR HAUSEN, Vizepräsident der Akademie
Printed in Germany 2008
Gesamtherstellung: druck-zuck GmbH Halle (Saale)
ISBN: 978-3-8047-2467-9
ISSN: 0369-5034
Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier.

Inhalt

FIRCKS, Wolf-Dietrich von: Grußwort des Rektors der Veterinärmedizinischen Universität Wien	9
TUPPY, Hans: Grußwort der Akademie	11
Herzog, Ulrich: Grußwort des Bundesministeriums für Gesundheit und Frauen	13
BREM, Gottfried: Einleitung: BVD – eine (un)heimliche Rinderseuche	15

I. BVD-Virus und Infektion

TAUTZ, Norbert, und THIEL, Heinz-Jürgen: Molekulare Pathogenese der Mucosal Disease	23
RÜMENAPF, Till, und KREY, Thomas: Frühe Schritte der BVDV-Invasion in die Wirtszelle	37
PETERHANS, Ernst, MÄTZENER, Philippe, MAGKOURAS, Ioannis, STALDER, Hanspeter, JUNGI, Thomas, und SCHWEIZER, Matthias: BVD-Virus: Umgehung der angeborenen Immunabwehr als Voraussetzung für Immuntoleranz und Viruspersistenz	49

II. Erkrankung, Immunität und Immunisierung

MÖSTL, Karin, KRAMETTER-FRÖTSCHER, Reinhild, LOITSCH, Angelika, KOHLER, Hannes, SCHLEINER, Alexandra, SCHIEFER, Peter, und BAUMGARTNER, Walter: Zum Wirtsspektrum von Pestiviren bei Wiederkäuern	63
WOLF, Georg: Klinische und wirtschaftliche Folgen einer BVDV-Herdeninfektion	69

HAAS, Ludwig, und MOENNIG, Volker: Impfmaßnahmen im Rahmen der BVD/MD-
Bekämpfung 73

WOLF, Georg: BVDV-Antigen und -Antikörper in Blut und Gewebe 79

III. BVDV-Diagnostik

BREM, Gottfried: Identitätssicherung in der Tierseuchenbekämpfung 85

HILBE, Monika, ZLINSZKY, Kati, und EHRENSPERGER, Felix: Der immunhistochemische
Nachweis von BVD-Virusinfektionen an Hautbiopsien 97

HOFFMANN, Bernd, GALL, Astrid, SCHIRRMIEIER, Horst, und BEER, Martin: Nuklein-
säure-basierte diagnostische Untersuchungen zum Nachweis von Pestiviren 103

IV. Programmatische Eradikation

DAMOSER, Johann: Rechtlicher Rahmen für das BVD-Programm in Österreich 127

ROSSMANITH, Wigbert, JANACEK, Roman, TRAMPLER, Regina, und WILHELM, Elfriede:
Bekämpfung der BVDV-Infektion in Niederösterreich: Das Ziel ist in Sicht 131

OBRITZHAUSER, Walter, und FUCHS, Klemens: BVD-Bekämpfung – Epidemiologische
Aspekte 143

TAVELLA, Alexander, ZAMBOTTO, Paolo, STIFTER, Ernst, FUGATTI, Alessandro,
LOMBARDO, Dorotea, RABINI, Michela, ROBATSCHER, Eva, und BREM, Gottfried:
Rückblick über die Umsetzung eines flächendeckenden BVD-Bekämpfungs-
programms mittels Ohrgewebeprobe in der Autonomen Provinz Bozen-Südtirol 153

OETTL, Josef, SCHÖPF, Karl, MATT, Monika, DÜNSER, Michael, WOLF, Georg,
und BREM, Gottfried: Landesweite BVD-Sanierung durch populationsweite
Beprobung in Tirol 179

V. Anhang

MOSSBRUGGER, Ilona, BEER, Martin, und WOLF, Georg: Zelluläre Immunität: Zytotoxizität gegen BVDV-infizierte Zellen	185
VALLE, Paul S.: Control of Bovine Virus Diarrhea Virus (BVDV) – the Norwegian Experience	187
FUX, Robert, MOSSBRUGGER, Ilona, und WOLF, Georg: Einflussfaktoren auf die Analyse diagnostischer Ohrstanzen	189
KRAMETTER-FRÖTSCHER, Reinhild, LOITSCH, Angelika, KOHLER, Hannes, SCHLEINER, Alexandra, SCHIEFER, Peter, GOLJA, Ferdinand, MÖSTL, Karin, und BAUMGARTNER, Walter: Seroepidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von Pestiviren bei Schafen und Ziegen in Österreich	191

Grußwort des Rektors der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Wolf-Dietrich VON FIRCKS (Wien)

Ich freue mich sehr, meine Damen und Herren, Sie heute hier im Namen der Universität aber auch im eigenen Namen begrüßen zu können. Es ist für uns wirklich eine große Freude, die wir ganz wesentlich dem Motor und *spritus rector* dieser Veranstaltung, Herrn Professor Gottfried BREM, zu verdanken haben, der hiermit das dritte Mal in meiner Amtszeit die Initiative ergriffen hat, ein wichtiges und aktuelles Thema aus der Leopoldina heraus und jetzt das zweite Mal auch mit der Österreichischen Akademie der Wissenschaften auf der Schnittlinie der wissenschaftlichen Ergebnisse einerseits und der Konsequenzen für die Praxis andererseits zu diskutieren.

Deshalb freue ich mich auch, dass ich als Vertreter sowohl der Leopoldina wie auch der Akademie der Wissenschaften, Herrn Professor TUPPY, hier begrüßen kann. Ich glaube, er ist für uns alle in Wien die Leitfigur im Bereich *Life Science*, Biomedizin und Biowissenschaften.

In seiner langjährigen Tätigkeit hat er schon so viele herausragende Schüler hervorgebracht; auch unser Vizerektor für Forschung, Herr Professor SWETLY, den ich heute leider entschuldigen muss, kommt aus seinem „Stall“. Herr TUPPY ist immer noch einer der Motoren und geistigen Stichwortgeber – ganz herzlich willkommen!

Ich freue mich auch, dass für das Ministerium Herr Mag. HERZOG hier ist, der dort eine – wie ich glaube – für uns alle wichtige korrespondierende Rolle wahrnimmt. Er kommt ja aus diesem Hause, und ich glaube, dass alle gemerkt haben, dass seit er im Ministerium ist, vieles in der Zusammenarbeit noch besser klappt als schon zuvor.

Die Frau Ministerin, die heute auch kommen wollte, und die auch schon bei den anderen Tagungen war, lässt sich heute entschuldigen: das Parlament fordert seinen Tribut, was zu respektieren ist.

Ich möchte noch – neben vielen die hier sind, die man begrüßen könnte – die Gebrüder Dres. KAASCH erwähnen, die von der Leopoldina aus ganz wesentliche Träger dieser Veranstaltung sind. Ich freue mich, dass auch Sie heute wieder dabei sind.

Ich denke, mit der Thematik „BVD – eine (un)heimliche Rinderseuche“ ist ein Thema aufgegriffen worden, das ja als solches lange schon bekannt ist, aber immer wieder erhebliche Probleme verursacht. Es ist bis heute nicht gelungen, eine BVD-Freiheit im Lande zu erreichen, weil eben durch die komplizierte und quasi „verdeckte“ Verbreitung, der Sie sich ja auch widmen, immer wieder Probleme auftauchen.

Österreich hat nun versucht, durch eine neue Verordnung Transport und Verkehr, und damit die Kontaktmöglichkeiten, neu zu regeln und auf diese Weise in den Griff zu bekommen. Es ist dies auch ein Thema, dass uns hier an der Universität erheblich beschäftigt hat, weil wir überlegt haben, wie wir damit umgehen sollen: „Was soll mit eingelieferten Tieren gesche-

hen, bei welchen wir den BVD-Status nicht kennen und dadurch eine erhebliche Kontaminationsgefahr bestehen kann?“ „Müssen wir für jedes einzelne Tier eine Quarantäne-Aufstallung gewährleisten?“ „Können wir das überhaupt?“ „Wollen die Tierbesitzer das überhaupt finanzieren?“ und Ähnliches.

Die BVD-Verordnung geht eindeutig davon aus, dass *vor* dem Transport die Abklärung des BVD-Status geschehen muss, und das muss einfach vor Ort beim Tierbesitzer und von dem jeweils örtlichen Tierarzt sichergestellt sein, denn alles andere – schon allein der Transport – wäre danach mit den Risiken einer weiteren Verbreitung nicht mehr zu verantworten.

Ich denke, dass Sie hier für alle Tierhalter, Tierärzte und Amtstierärzte Ergebnisse erbringen werden, die uns dort weiterhelfen und deshalb nicht nur für Österreich, sondern europaweit von Interesse sind. Und ich hoffe, es gelingt sehr bald, wesentliche Punkte dann auch in die Umsetzung zu bringen. Die beste Gewähr dafür ist, dass auch Leute aus der Praxis hier sind. Mit Dr. OBRITZHAUSER und anderen sind auch diejenigen anwesend, die in den Bundesländern maßgeblich am Umsetzungsgeschehen beteiligt sind.

Deshalb bin ich sehr optimistisch, dass auch diese Tagung wieder zum Fortschritt sowohl der Wissenschaft als auch der veterinärmedizinischen Praxis beiträgt. Ich wünsche Ihnen ein gutes „Glück auf“!

Wolf-Dietrich VON FIRCKS
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
A-1210 Wien
Österreich

Grußwort der Akademie

Hans TUPPY ML (Wien)

Magnifizenz, sehr geehrter Herr Rektor,
sehr geehrter Herr Magister HERZOG in Vertretung der Frau Bundesministerin RAUCH-
KALLAT,
meine sehr geehrten Damen und Herren!

Es ist mir die sehr angenehme und schöne Aufgabe übertragen worden, Ihnen namens der Österreichischen Akademie der Wissenschaften Grüße zu überbringen bei einem Symposium, welches gemeinsam von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und der Österreichischen Akademie der Wissenschaften veranstaltet wird.

Es ist bereits das dritte gemeinsam veranstaltete Symposium. Vor einem Jahr fand ein solches zum Thema BSE statt und vor einem halben Jahr – am Beginn dieses Jahres – ein Symposium über Autoimmunität.

Da ich beiden Akademien angehöre – und das gleiche gilt für Herrn Professor BREM – freue ich mich, dass eine so schöne Kooperation der Akademien zu so wichtigen Themen zustande gekommen ist.

Hier darf ich Herrn Professor BREM gleich ganz besonders Dank sagen für seine sachkundige und tatkräftige Vernetzungsarbeit nebst der rein wissenschaftlichen Arbeit, die zu diesen Symposien führt und sie wesentlich möglich macht.

Die Bovine Virale Diarrhoe ist eine Erkrankung, die den Menschen nicht direkt gefährdet – ich selbst komme von der humanmedizinischen Fakultät und bin wohl auch mit Viren vertraut, jedoch nicht so sehr mit dem veterinärmedizinischen Aspekt –, aber das heißt nicht, dass wir solche Seuchen, wie die hier behandelte, gering schätzen dürfen: Sie bedeuten eine schwere Einbuße für die Gesundheit der Lebewesen, die uns anvertraut sind, und das bedeutet schwere wirtschaftliche Einbußen, die uns durch solche Seuchen auferlegt werden. Ich habe gelesen, dass man mit zwei Milliarden Euro pro Jahr an (volks)wirtschaftlichen Verlusten rechnet, und so betrifft uns das Thema nicht nur wissenschaftlich, sondern auch wirtschaftlich.

Es wurde schon vom Herrn Rektor gesagt, dass auch in unserem Lande Versuche zur Eradikation dieser Seuche unternommen werden. Aber freilich nicht nur bei uns, sondern auch in den Nachbarländern, deren Teilnahme an diesem Symposium ich besonders begrüßen möchte. Ich freue mich, dass hier ein Gedankenaustausch stattfinden wird, der von der Frage der Pathogenität über den Wirkmechanismus dieser Viren bis zu den Fragen der Gesundheitsverwaltung führt und damit nicht nur interdisziplinär ist, sondern sozusagen die verschiedenen Ebenen zusammenschließt.

Hans Tuppy

So darf ich Ihnen noch einmal im Auftrag und namens der Akademie und auch in meinem eigenen Namen einen sehr „ertragreichen“ Verlauf dieses Symposions wünschen!

Prof. Dr. Hans TUPPY
Universität Wien
Institut für Biochemie
Dr. Bohr-Gasse 9/3
A-1030 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 427761670
Fax: +43 1 42779616

Grußwort des Bundesministeriums für Gesundheit und Frauen

Ulrich Herzog (Wien)

Sehr geehrter Herr Rektor,
sehr geehrter Herr Professor TUPPY,
sehr geehrter Herr Professor BREM!

Im Namen der Frau Bundesminister darf ich mich bei Ihnen vorerst sehr herzlich dafür bedanken, dass es hier wieder die Möglichkeit gibt, dieses auch für die Veterinärverwaltung sehr interessante Thema in einem Rahmen, den wir schon vor einem Jahr für unsere BSE-Veranstaltung nutzen konnten, zu diskutieren.

Es ist dies ein Thema, das uns schon sehr lange Zeit bewegt und begleitet. Ich habe versucht, im Vorfeld herauszufinden, ob es einen Nachweis gibt, seit wann in den Veterinärverwaltungen in Österreich das Thema „BVD“ behandelt wird. Dabei bin ich auf den steirischen Veterinärjahresbericht aus dem Jahre 1995 gestoßen, in dem es heißt, dass zwei Dissertationen zu diesem Thema vergeben worden sind, und – ich zitiere nun – „das vielfältige Krankheitsbild der BVD wird besonders in Beständen zum Problem, deren Rinder sich erstmals mit diesem Erreger infizieren. Der Krankheitsverlauf in heimischen Klein- und Mittelbetrieben scheint jedoch ein milderer und diskontinuierlicher zu sein als in Betrieben mit größeren Tierzahlen. Dennoch muss BVD bei Fruchtbarkeitsstörungen, Verwerfensfällen, Missgeburten, unstillbaren Durchfällen und möglichen Krankheitsursachen unbedingt berücksichtigt werden.“

Man sieht also, dass man sich seit mindestens elf Jahren in der österreichischen Veterinärverwaltung mit BVD beschäftigt. Neben der Steiermark war Niederösterreich eines jener Bundesländer, die dieses Thema bereits sehr früh aufgegriffen hatten.

Die Geschichte – und das ist in einem föderalen Staat leider so – zeigt viele Ausprägungen der Bekämpfungsstrategien. Ich persönlich bin mit der Bekämpfungsstrategie der BVD in meiner Zeit als Mitarbeiter der Österreichischen Landwirtschaftskammer im Jahr 2001 das erste Mal in Berührung gekommen. Umfassende Rechnungen wurden angestellt, um zu erkennen, wie hoch der wirtschaftliche BVD-Schaden im landwirtschaftlichen Betrieb sich beziffern lässt und welche hohen Kosten dem Bauern zuzumuten seien. Andererseits waren die Einkünfte der Tierärzteschaft ein zentrales Thema. Die Diskussion über BVD wurde in Österreich meiner Wahrnehmung nach mehr als eine Glaubensfrage und nicht als Sachfrage angesehen, so haben sich unterschiedliche Bewegungen/Glaubensrichtungen im Osten und Westen entwickelt. Als ich dann die Möglichkeit hatte, unter Ministerin RAUCH-KALLAT auch ein wenig steuernd eingreifen zu können, war es mein zentrales Anliegen, einen Kompromiss für ein österreichweites Bekämpfungsprogramm auf den Tisch zu legen. Grund dafür war, dass wir erkannt haben, dass föderale Einzelgänge einzelner Bundesländer nicht unbedingt den Erfolg garantieren.

Wie sich auch herausstellte, und was auch in den beiden Dissertationen aus dem Jahr 1995 erhoben worden war, ist die Seuche weiter verbreitet, als so mancher ursprünglich gedacht hatte.

Das Bundesministerium hat im Juli 2004 die neue BVD-Verordnung präsentiert, die auch gleich zu Diskussionen geführt hat. Ich habe mich manchmal gefragt, ob es gescheit war, sich in eine so föderale Glaubensfrage einzumischen. Oder hätte man doch lieber alles so weiter wie bisher laufen lassen und abwarten sollen, wie die einzelnen Veterinärverwaltungen mit diesem Thema umgehen?

Retrospektiv – nach gut zwei Jahren im Amt und vielen weiteren Diskussionen – betrachtet, hat mich dieses Thema auch in den letzten zwei Jahren weiterverfolgt; und so war es eine sehr gute Idee, das Thema auf den Tisch zu legen und im ganzen deutschsprachigen Raum zu diskutieren, welche Strategien und Möglichkeiten und welche Auswirkungen Bekämpfungsprogramme in diesem Bereich auf die heimischen Tierbestände haben.

Interessanterweise ist vor einem Jahr auch die internationale Welt aufmerksam geworden, und unter der Federführung von Schweden, Finnland und Norwegen gab es einen Vorstoß in der OIE – dem internationalen „Tierseuchenamt“ –, eine Regelung zu erarbeiten.

Ich denke, dass dieses Symposium auch einiges dazu beitragen kann, wenn es hier zu einer Verankerung der BVD in den internationalen Tierseuchenvorschriften kommt. So kann ein weiteres Voranschreiten in den nationalen Bekämpfungsstrategien ermöglicht werden und auch für diese Krankheit, die zwar sicher nicht in den Schwerpunkt der Humanmedizin als Zoonose lebensmittelbedingten Ursprungs fällt, aber unter dem wirtschaftlichen Aspekt das entsprechende Gehör findet, um internationale Regelungen für Bekämpfungsstrategien ergänzt werden. Kommt es nicht soweit, kann es passieren, dass es zu einer Verschlechterung des Tiergesundheitsstatus der heimischen Bestände kommt und dass letztendlich im innergemeinschaftlichen Handel Schwierigkeiten auftreten könnten.

Ich bin sehr froh und bedanke mich noch einmal herzlich, dass wir hier die Möglichkeit haben, uns auszutauschen, und möchte damit schließen, dass diese Plattform auch dazu dienen soll, dass wir die Diskussion zur Tierseuchenbekämpfung auf Grundlage von Fakten und nicht Glaubenssätzen führen.

Mit fachlichen Argumenten kann man international die europäische Gemeinschaft leichter davon überzeugen, dass wir auf dem richtigen Weg sind und dass wir in Österreich mit diesem gemeinsamen, bereits bestehenden Programm einen Wettbewerbsvorteil der heimischen Produzenten von Lebendtieren haben, die dann im Handel – und derzeit sind unsere Tiere ja sehr gefragt – einen Mehrwert wiederfinden.

In diesem Sinne wünsche ich uns allen eine angeregte Diskussion und nochmals ein herzlicher Dank an die Organisation für das zur Verfügung stellen der Räumlichkeiten. Ich wünsche uns im Namen der Bundesministerin Maria RAUCH-KALLAT viel Spaß in den nächsten eineinhalb Tagen.

Mag. Ulrich HERZOG
Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend
Sektion IV – Verbrauchergesundheit und Gesundheitsprävention
Radetzkystraße 2
A-1030 Wien
Österreich

Einleitung: BVD – eine (un)heimliche Rinderseuche

Gottfried BREM ML (Wien)

Sehr verehrte Damen!
Magnifizenz!
Sehr geehrte Herren!

Ihnen allen ein herzliches Grüß Gott! Es freut mich sehr, dass unser Symposium auf so großes Interesse gestoßen ist, und einer Erkenntnis des österreichischen Aphoristikers ERNST FERSTL zufolge dürfen wir auch auf Ihre Aufmerksamkeit hoffen, denn „Interesse und Aufmerksamkeit sind nahe Verwandte“.

Die Virusdiarrhoe wurde 1946, also vor genau 60 Jahren, erstmals beschrieben (CHILDS 1946, OLAFSON et al. 1946), und die *Mucosal Disease* fand 1953 (RAMSEY und CHIVERS 1953), also vor 53 Jahren, übrigens im selben Jahr wie ich, erstmals Erwähnung. Die Stellen zur Virusdiarrhoe und *Mucosal Disease* finden sich im *Canadian Veterinary Journal*, der Eintrag mich betreffend findet sich im örtlichen Geburtsregister.

Jeder, der sich intensiv mit dem BVD-Virus befasst, und insbesondere diejenigen, die es seit Jahren bekämpfen, wissen um die Unheimlichkeit dieses Virus, das manchmal unerklärlicherweise irgendwo auftaucht oder erscheint, wo es niemand mehr vermutet oder erwartet hat. Oft gelingt dann nach vieler detektivischer Nachsuche und kriminalistischen Analysen die Aufklärung bzw. Erklärung, aber genau so oft ist alles Analysieren und Detektieren nicht vom Erfolg gekrönt. „Lieber heimlich schlau, als unheimlich dumm“, denkt sich das Virus, und wir, die wir uns so schlau vorkommen, stehen am Schluss dumm da. Es ist eine Frage der Perspektive, ob unheimlich besser ist als heimlich.

BVD, die Bovine Virus-Diarrhoe und in ihrer letalen Form die *Mucosal Disease*, ist, im Gegensatz zur BSE, der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie, keine Seuche, die dem Menschen als Konsumenten Angst macht. BVD ist keine Zoonose, sie ist für den Menschen an sich ungefährlich. Die einzigen, die vor ihr Angst haben müssten und diese wohl auch hätten, wenn sie es verstehen würden, sind unsere Rinder. Der durchschnittliche Konsument kennt BVD nicht und hat, soweit er regelmäßig dem Genusse von Rindfleisch frönt, wohl auch schon damit BVD-Viren völlig ungefährdet mitverzehrt. Er würde sich wohl höchstens dann vor dieser Krankheit ängstigen, wenn er auf Grund der lautmalerischen Ähnlichkeit BVD mit BSE verwechselte. Die Gefahr dafür ist allerdings nicht sehr groß, weil BVD in aller Regel nicht in den *Headlines* der Boulevardmedien auftaucht. Die Sorgen unserer Rinderhalter, und BVD gehört zweifelsohne dazu, sind für die Medien kein attraktives Thema, solange keine direkte und vermeintliche Gefahr für den Menschen besteht.

Dabei ist das BVD-Virus an sich ein höchst perfider Organismus, bzw. es bedient sich höchst perfider Strategien. Was die Unheimlichkeit seiner Strategie betrifft, kann es sich mit

einem wirklichen Schreckgespenst des Menschen, dem HI-Virus, durchaus messen. Beide Viren sichern sich ihr Überleben, indem sie das Immunsystem des Wirtes überlisten: HIV überwindet bei der Infektion die Immunabwehr und zerstört anschließend konsequent die zelluläre Abwehr. BVD nutzt für seine Weiterverbreitung den noch vom Immunsystem ungeschützten fetalen Organismus als Eintrittspforte und manifestiert sich völlig ungestört. Einmal im noch empfänglichen Fötus angekommen, verlässt es diesen nie mehr wieder. Es gehört ab diesem Zeitpunkt sozusagen zum „Selbst“ des Kalbes, es wird nicht als Feind erkannt und lebt auf Kosten des Wirtes, ohne diesem irgendeine Chance zu lassen, sich und seine Nachkommen von ihm zu befreien. Die einzige Befreiung ist die endgültige, wenn das Virus zur letalen Variante mutiert oder der Wirt mit einer solchen Letalvariante superinfiziert wird. Dann endet das Leben des Wirts, und gleichzeitig mit ihm endet die Existenz des Virus in diesem Organismus. Salopp gesagt, handelt es sich in diesen Fällen um ein fatales Ereignis: naheliegenderweise für das sterbende Rind, aber letztendlich auch für das Virus, denn in diesem Fall vergeht es mit. Ein toter Wirt ist auch für ein Virus der absolut schlechteste Wirt.

Die Seuche lebt in den persistent infizierten Tieren weiter. Das Wort Seuche ist gotischen Ursprungs (*siukei*), daraus wurde dann das mittelhochdeutsche *siuche*. Hier erkennen wir schon unschwer die Nähe zum hochdeutschen Wort *Siech*(tum). Und insofern ist BVD mehr als aggressivere Seuchen, die den Tod des Infizierten in Tagen oder gar Stunden herbeiführen, eine Seuche *par excellence*, weil das **Siechtum** ein regelrechtes Charakteristikum BVD-kranker Rinder ist. Das zeigen Aufnahmen von BVD-kranken Rindern, die mir freundlicherweise von Kollegen BAUMGARTNER von der Klinik für Wiederkäuer der VUW zur Verfügung gestellt worden sind. Weitere klinische Folgen einer BVD-Infektion wird der Beitrag von Georg WOLF aus München vor Augen führen.

Eine alte Spruchweisheit lehrt uns: „Es ist klüger, sein Wissen zu verheimlichen, als seine Unwissenheit zu offenbaren.“ Dagegen rät uns Johann Wolfgang GOETHE: „Alles Gescheite ist schon gedacht worden. Man muss nur versuchen, es noch einmal zu denken.“ Für die nächsten zwei Tage erhoffen wir uns, dass wir durch die Präsentation des spezifischen Wissens der Einzelnen die partielle Unwissenheit der Mehrheit mindern. Wir wollen Ihnen und uns in den nächsten zwei Tagen verschiedene Facetten des BVD-Seuchengeschehens präsentieren. Heute stehen Fragen der Infektion, Erkrankung, Immunität und Immunisierung im Mittelpunkt.

Wir beginnen gleich anschließend mit drei Referenten aus Gießen. Kollege THIEL wird Ihnen die tödliche Variante der BVD-Erkrankung, die *Mucosal Disease*, vorstellen und dabei insbesondere auf die molekulare Pathogenese eingehen, und Kollege TAUTZ wird darauf aufbauend die molekularen und zellulären Aspekte weiter vertiefen. Kollege RÜMENAPF wird dann darüber sprechen, wie es dem BVD-Virus gelingt, in die Wirtszellen einzudringen. Kollege PETERHANS aus Bern wird über die Umgehung der angeborenen Immunabwehr als Voraussetzung für Immuntoleranz und Viruspersistenz sprechen.

Die heutige Nachmittagssitzung wird Kollegin MÖSTL von der VUW einleiten mit ihrem Referat über das Wirtsspektrum von Pestiviren und die möglichen Kreuzinfektionen. Die klinischen und insbesondere die wirtschaftlichen Folgen einer BVDV-Herdeninfektion werden von Kollegen WOLF analysiert. Anschließend wenden wir uns dann den Impfmaßnahmen zu. Kollege HAAS aus Hannover wird über verschiedene Strategien im Rahmen der BVD-Bekämpfung sprechen und Frau Kollegin MOSSBRUGGER aus München über die Immunantwort, insbesondere die Rolle der zytotoxischen T-Zellen. Aus terminlichen Gründen ist dann eine Programmänderung notwendig. Herr Kollege VALLE aus Oslo wird uns heute schon über die norwegischen Erfahrungen mit der BVD-Eradikation berichten und wohl auch über den

Stand in den anderen skandinavischen Ländern Auskunft geben. Da das skandinavische Eradikationsmodell auch in einzelnen Bundesländern Österreichs erfolgreich praktiziert wird, erwarten wir diesen Vortrag mit besonderem Interesse.

Morgen stehen dann die Diagnostik und programmatische Eradikation auf dem Programm. Kollege BEER von der Insel Riems musste leider absagen. Kollege HOFFMANN aus dem gleichen Institut, der für ihn eingesprungen ist, hat die in Riems praktizierten Nukleinsäure-basierten Diagnostikverfahren entwickelt. In dieser Sitzung werden auch Fragen der Identitätssicherung in Zusammenhang mit der Probengewinnung bei BVD erörtert, und Kollege FUX aus München wird über Einflussfaktoren auf die Analyse diagnostischer Ohrstanzen sprechen. Kollege WOLF wird über BVDV-Antigene und -Antikörper im Blut und Gewebe referieren.

Die Bekämpfung der BVD wird über zwei Wege angegangen: entweder die Verhinderung der Neuankömmlinge trächtiger Tiere oder die Identifikation und Elimination von PI-Tieren. Über beide Wege werden wir heute und morgen Neues erfahren.

Bevor wir von den Kollegen ROSSMANITH und OBRITZHAUSER über ihre Erfahrungen mit der BVD-Bekämpfung in Niederösterreich und der Steiermark hören werden, wird Kollege DAMOSER vom zuständigen Ministerium über den rechtlichen Rahmen für das BVD-Programm in Österreich referieren. Die Kollegen OETTL und STIFTER werden über ihre Erfahrungen mit der Ohrstanzprobengewinnung und deren Analytik berichten.

Gestatten Sie mir zum Schluss noch einige Marginalien zu meiner BVD-Beziehung. Als gelernter Tierzüchter ist man nicht *per se* mit BVD in Kontakt. Meine BVD-Affäre hat sich, wie das öfters im Leben passiert, so *peu à peu* entwickelt. Vor fast 10 Jahren haben wir in Zusammenarbeit mit Georg WOLF vom Institut für Infektionsmedizin der Tierärztlichen Fakultät der LMU, als Zuarbeit für die Entwicklung eines BVD-Impfstoffes, versucht, BVD-Antigene in transgenen Kaninchen zu erstellen. Ein wenig erfolgreiches Geplänkel. Später kam es dann immerhin zu frühreproduktiven Erscheinungsformen, weil wir uns mit BVD-Infektionen in Rinderembryonen befasst haben (MÖDL et al. 1995, 1997).

Seit über fünf Jahren fokussieren sich unsere gemeinsamen Bemühungen auf den zweiten Bekämpfungsweg, die frühzeitige Erkennung von PI-Tieren, um deren Elimination zu ermöglichen und so das Virusreservoir in der Population auszutrocknen. Die oft beschworene Interdisziplinarität, hier praktiziert zwischen Seuchenbekämpfer und Tierzüchter, begann – nein leider nicht, obwohl es als Münchner Geschichte so schön wäre, bei einem gepflegtem Bier – bei einem nicht minder anregenden Kaffee im Laborbüro von Schorsch WOLF an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Er war fasziniert von unserem TypiFix-Probenentnahmesystem und ich von seinen Ausführungen über die Persistenz von BVD-Viren in Hautproben. Kollege EHRENSPERGER in Zürich hatte BVD in Hautbiopsien von Kälbern immunhistochemisch nachgewiesen. Leider kann er auf Grund einer Terminkollision heute nicht hier sein, und seine Mitarbeiterin Frau Dr. HILBE ist diese Woche so schwer erkrankt, dass sie leider auch absagen musste. Wir wünschen ihr eine baldige Genesung.

Mit der Idee, die BVD-Diagnostik auf Ohrmarken-Stanzproben aufzubauen, lief es ähnlich wie bei vielen neuen Ideen. Die Innovation, also die praktische Nutzenanwendung, nahm viel mehr Zeit in Anspruch, und es war auch alles schwieriger als erwartet – und eigentlich manchmal zum Verzweifeln. Zum Durchhalten muss wieder der alte GOETHE herhalten: „An unmöglichen Dingen soll man selten verzweifeln, an schweren nie.“

Mein Dank gilt hier auch den Allgäuer Amtstierärzten Dr. Hans LUDWIG und Dr. Franz GÖTZ, die auf Anregung von Schorsch WOLF die ersten praktischen Erfahrungen mit der

BVD-Bekämpfung durch Gewinnung von Ohrstanzproben erarbeitet haben. Der nächste entscheidende Schritt erfolgte dann in Österreich. Seit dem 1. 1. 2005 wurden, dank des Engagements von Landestierarzt Dr. WALLNÖFER, in Tirol und in Südtirol flächendeckend Ohrstanzproben für die BVDV-Diagnostik gewonnen und analysiert. Morgen werden die Kollegen OETTL und STIFTER, die in beiden Ländern maßgeblich diese Programme betreuen, erstmals über die Ergebnisse berichten.

Wir haben ein Symposium angekündigt, auch wenn wir die Reihenfolge des antiken „Trinkgelages bei heiterem Tafelgespräch“ umdrehen und uns erst durch eifriges Diskutieren den Zugang zum Wein verdienen müssen. Wien ist Wein und Wein ist Wien! Ich kenne keine schönere und sinnigere Lautverschiebung, und ich hoffe, dass Sie mir darin nach dem heutigen Heurigenabend zustimmen werden. Wien ist die einzige Kulturstadt der Welt, in der Wein angebaut wird, und das seit über 2500 Jahren. Der „Heurige“, den sie heute Abend genießen werden, ist der junge Wein, gekeltert aus einem gemischten Satz, ein erfrischender, spritziger und bekömmlicher Wein, also genau das, was wir brauchen, um unsere Diskussionen beschwingt weiter in den Abend hinein zu führen.

Ich danke allen Referentinnen und Referenten und den Moderatoren nochmals sehr herzlich, dass Sie sich die Zeit genommen haben, nach Wien zu kommen. Ich hoffe, Sie fühlen sich wohl hier und behalten diese Tage in guter Erinnerung, und ich wünsche, es möge gelingen, einen breiten Erfahrungs- und Informationsaustausch zu erreichen, so dass am Ende alle bereichert heimkehren. Die größte Bereicherung für alle wäre sicherlich, wenn es uns auf Grund unserer gemeinsamen Anstrengungen gelingen würde, dem BVD-Virus endgültig Herr zu werden und diese Geißel der Rinderzucht irgendwann auszurotten. In diesem Sinne arbeiten wir sozusagen daran, uns überflüssig zu machen. Sorgen um zukünftige Arbeit in der Seuchenbekämpfung braucht sich aber wohl niemand zu machen. Viele Krankheiten, mit denen wir uns heute so intensiv beschäftigen, waren für unsere Großväter noch kein Thema. Die Natur ist uns immer einen Schritt voraus, was ja auch BVD mit seiner nur 60-jährigen Geschichte belegt, aber wenn wir nicht permanent hinterherlaufen, wird der Abstand noch größer.

Es ist mir eine ehrenvolle Pflicht, mich beim Sponsor unseres Symposiums, dem Bundesministerium für Gesundheit und Frauen, und Frau Bundesminister RAUCH-KALLAT zu bedanken. Frau Bundesministerin ist es auf Grund einer Terminkollision leider nicht möglich, heute hier ein Grußwort zu sprechen. Ich freue mich sehr, dass der zuständige Abteilungsleiter, Diplomtierarzt Mag. HERZOG, auf dessen Mitinitiative diese Veranstaltung zurückgeht, heute das Grußwort und morgen das Schlusswort sprechen wird. Schon jetzt herzlichen Dank dafür. Weiterhin danke ich den Firmen IDEXX, Andiatec und Xenogenetik für die finanzielle Unterstützung. Unserem Rektor, Dr. FIRCKS, danke ich sehr herzlich dafür, dass er uns die Durchführung dieser Veranstaltung in den Räumen der VUW ermöglicht hat und uns durch Herrn GRUBER und sein Team unterstützen lässt. Scheuen Sie sich nicht, sich an Herrn GRUBER zu wenden, wenn Sie irgendein Problem haben. Er hat nahezu alles Organisatorische geregelt und ist nach eigener Einschätzung im Zweifelsfall an fast allem Schuld. Ohne seine Hilfe und rund um die Uhr Unterstützung – und das ist durchaus wörtlich gemeint – hätten wir es nie geschafft. Dafür herzlichen Dank, den ich sicher nicht nur im eigenen Namen ausspreche, sondern in den ich auch das Auditorium mit einbeziehen darf.

Für die Hilfe bei der Vorbereitung und Durchführung unseres Symposiums danke ich der Leopoldina, an ihrer Spitze Herrn Präsident Prof. TER MEULEN und der Generalsekretärin Frau Prof. SCHNITZER-UNGEFUG sowie den Brüdern Dres. KAASCH. Weiterhin danke ich der

Österreichischen Akademie der Wissenschaften und ihrem Präsidenten Prof. MANG, die diese gemeinsame Veranstaltung mit der Leopoldina ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem lieben Kollegen Schorsch WOLF. Mit ihm verbindet mich seit vielen Jahren eine überaus fruchtbare Zusammenarbeit, während der er mich mit seinem unbändigen Enthusiasmus in Sachen Seuchenbekämpfung angesteckt hat. Er hat mich auch bei der Konzeption des Programms maßgeblich unterstützt. An dieser Stelle ist es mir eine ganz besonders große Ehre, seinen und meinen besonders verehrten Lehrer, den Altvater der Virologie, Prof. Dr. h. c. mult. Toni MAYR, seit 36 Jahren Mitglied der Leopoldina, begrüßen zu können. In der zweiten Rede von *Elifas* im *Buch Hiob* (Kap. 15) sagt dieser: „Was weißt du, das wir nicht wissen? Was verstehst du, das uns nicht bekannt ist? Es sind Ergraute und Alte unter uns, die länger gelebt haben als dein Vater.“ Nehmen Sie dieses Zitat als unsere Bitte um den Rat und die Weisheit der Weisen.

Die Leopoldina und die ÖAW werden die Berichte und Diskussionen nach Abschluss des Symposiums als Tagungsband in der Reihe *Nova Acta Leopoldina* herausgeben. In diesem Zusammenhang danke ich den Brüdern Dres. KAASCH für die redaktionelle Betreuung. Mein besonderer Dank gilt nochmals allen Referierenden, die Manuskripte geliefert haben.

Damit übergebe ich das Wort an Prof. MÜLLER, Vorsitzender des Senats der VUW, der die erste Sitzung moderieren wird. Vielen Dank für Ihre geschätzte Aufmerksamkeit.

Literatur

- CHILDS, T.: X disease in cattle – Saskatchewan. *Canad. J. Comp. Med.* 10, 316–319 (1946). Quoted by: GOENS, D.: The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Canad. Vet. J.* 43/12, 946–954 (2002)
- MÖDL, J., PALMA, G. A., WOLF, G., BEER, M., and BREM, G.: Screening for BVD virus in the in vitro production of bovine embryos and the improve of the production conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 32, 32 (1997)
- MÖDL, J., WOLF, G., PLAMA, G., und BREM, G.: Ausschluß von BVD-Virus beim Einsatz moderner Reproduktionstechniken: Kontrolle von Schlachthofovarien. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Embryo-Transfer Deutschland (AET-d), Kleve, 2. 6. 1995. (1995)
- OLAFSON, P., MACCALLUM, A. D., and FOX, A.: An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36, 205–213 (1946). Quoted by: GOENS, D.: The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Canad. Vet. J.* 43/12, 946–954 (2002)
- RAMSEY, F. K., and CHIVERS, W. H.: Mucosal disease of cattle. *North Amer. Veterinarian* 1953, 629–633 (1953). Quoted by: GOENS, D.: The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Canad. Vet. J.* 43/12, 946–954 (2002)

Prof. Dr. Dr. h. c. Gottfried BREM
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
A-1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 25077600
Fax: +43 1 25077690
E-Mail: gottfried.brem@vu-wien.ac.at

I. BVD-Virus und Infektion

Molekulare Pathogenese der Mucosal Disease

Norbert TAUTZ und Heinz-Jürgen THIEL ML (Gießen)

Mit 9 Abbildungen

Zusammenfassung

Das Genom des Bovinen Virusdiarrhoe-Virus kodiert für die N-terminale Protease (N^{pro}), virale Strukturproteine, nämlich das Kapsidprotein (C) sowie die Glykoproteine E^{ns} (E für „envelope“, Hülle; rns für Ribonuklease sezerniert), E1 und E2, sowie die Nichtstrukturproteine (NS) p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Die NS-Proteine dienen dem Virus u. a. zur Spaltung dieses Teils vom Polyprotein (Proteasen NS2 und NS3) und zur Vervielfältigung seines Genoms (RNA-Polymerase NS5B). Von besonderem Interesse ist das NS3, weil es lediglich nach Infektion mit zytopathogenen Pestiviren über den gesamten Verlauf der Infektion in großen Mengen nachweisbar ist. Pestiviren kommen als zwei Biotypen vor, die im Hinblick auf ihre Eigenschaften bei der Vermehrung in Kulturzellen unterschieden werden. Nicht zytopathogene (nzp) Pestiviren replizieren ohne sichtbare Veränderungen der Zielzellen. Im Gegensatz dazu führt die Infektion mit zytopathogenen (zp) Pestiviren zur Lyse infizierter Zellen. Die Aufdeckung der Genomorganisation liefert Einsichten in die Pathogenese der *Mucosal Disease*.

Abstract

The genome of the bovine virus diarrhoea virus encodes N-terminal protease (N^{pro}), viral structural proteins, such as capsid protein (C) and the glycoproteins E^{ns} (E for “envelope”; rns for ribonuclease-secreted), E1 and E2, as well as non-structural proteins (NS) p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B. The virus uses the NS proteins for processing this part of the polyprotein (proteases NS2 and NS3) and replicating its genome (RNA polymerase NS5B). NS3 is of particular interest because it can be detected in large quantities through the entire process of the infection only after infection with cytopathogenic pestiviruses. Pestiviruses occur as two biotypes, which can be distinguished with regard to their characteristics of replication in tissue culture cells. Non-cytopathogenic (ncp) pestiviruses replicate without morphological changes of the target cells. In contrast, infection by cytopathogenic (cp) pestiviruses causes lysis of the infected cells. Insight into the organization of the genome helps to understand the pathogenesis of *mucosal disease*.

1. Einleitung

Das Virus der Bovinen Diarrhoe (BVDV-1, BVDV-2), das Virus der klassischen Schweinepest und das *Border-disease*-Virus der Schafe bilden das Genus Pestivirus in der Virusfamilie Flaviviridae. Zu derselben Familie gehören außerdem das Genus Flavivirus mit Vertretern wie Frühsommermeningoenzephalitisvirus, Gelbfiebervirus und *Louping-ill*-Virus sowie das Genus Hepacivirus mit dem Hepatitis-C-Virus (THIEL et al. 2005).

Pestiviren sind kleine (40–60 nm) behüllte Viren, deren Genom aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität mit meist etwa 12 300 Nukleotiden besteht. Die Genomorganisation ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Die Abschnitte im 5'- und 3'-terminalen Bereich des Genoms kodieren nicht für Proteine (nicht translatierte Regionen, UTR), enthalten aber wichtige Signale für die Vermehrung des Virusgenoms und die Synthese der Virusproteine durch die Zelle.

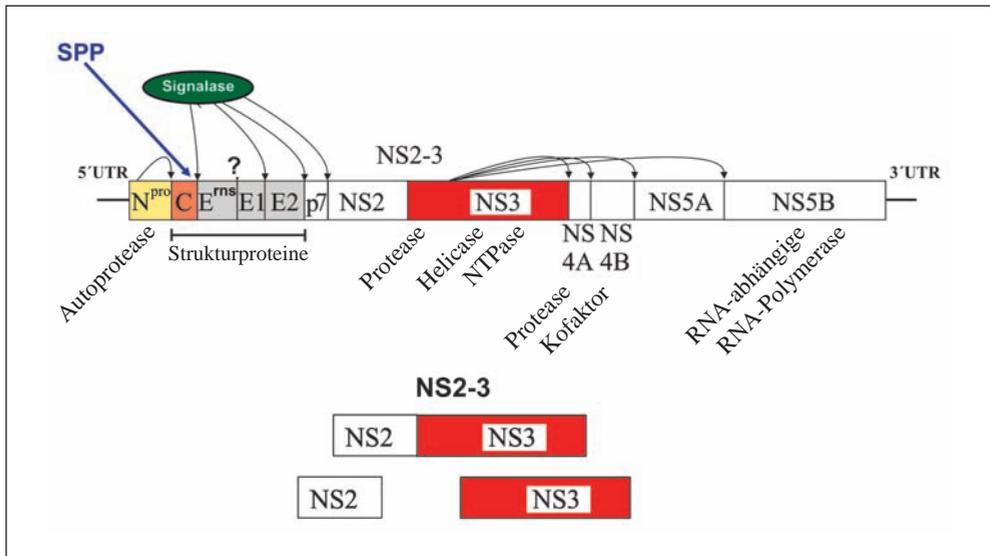


Abb. 1 Genomorganisation von BVDV. NS = Nichtstrukturprotein; UTR = nicht translatierte Region; SPP = Signalpeptid-Peptidase; andere Abkürzungen siehe Text

Nach Infektion einer Zielzelle wird ausgehend von der viralen RNA ein hypothetisches Polyprotein synthetisiert. Dieses Polyprotein, bestehend aus etwa 3900 Aminosäuren, wird teilweise schon während der Translation durch zelluläre und virale Enzyme in die reifen Virusproteine gespalten. Das erste durch das virale Genom kodierte Protein ist die N-terminale Protease (N^{pro}). Dieses Protein spaltet sich vom Rest des Polyproteins ab (Autoprotease). Es folgen die viralen Strukturproteine: das Kapsidprotein (C) sowie die Glykoproteine E^{ms} (E für „envelope“, Hülle; ms für Ribonuklease sezerniert), E1 und E2. Das Kapsidprotein bildet mit der viralen Nukleinsäure das Core, den vermutlich ikosaedralen Innenkörper des Virus. Umgeben ist das Core von einer Lipidmembran, die das Virus im Verlauf der Partikelreifung von der Wirtszelle erhält. In diese Lipidmembran sind die viralen Glykoproteine eingebettet. Das Glykoprotein E2 induziert nach Infektion oder Impfung neutralisierende Antikörper. Neben E2 induziert auch das Glykoprotein E^{ms} neutralisierende Antikörper nach Infektion eines Wirtes.

Dem für die Strukturproteine kodierenden Bereich folgt im viralen Genom ein Abschnitt, der für die folgenden Nichtstrukturproteine (NS) kodiert: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Die NS-Proteine dienen dem Virus u. a. zur Spaltung dieses Teils vom Polyprotein (Proteasen NS2 und NS3) und zur Vervielfältigung seines Genoms (RNA-Polymerase NS5B). Von besonderem Interesse ist das NS3, weil es lediglich nach Infektion mit zytopathogenen Pestiviren über den gesamten Verlauf der Infektion in großen Mengen nachweisbar ist. Pestiviren kommen als zwei Biotypen vor, die im Hinblick auf ihre Eigenschaften bei der Vermehrung in Kulturzellen unterschieden werden. Nicht zytopathogene (nzp) Pestiviren replizieren ohne sichtbare Veränderungen der Zielzellen. Im Gegensatz dazu führt die Infektion mit zytopathogenen (zp) Pestiviren zur Lyse infizierter Zellen. Im Falle von zp BVDV ist neben dem Vorläuferprotein NS2-3 stets auch NS3 in erheblichen Mengen vorhanden. Bei

einer Infektion mit nzp BVDV lässt sich NS3 hingegen nur über einen Zeitraum von wenigen Stunden nach Infektion nachweisen (LACKNER et al. 2004).

BVDV führt zu einer systemischen Infektion, die mit Virämie einhergeht. Die Folgen einer solchen Infektion können vielfältig sein. Während Infektionen nicht tragender Tiere oft klinisch inapparent verlaufen, kann es bei trächtigen Tieren zur diaplazentaren Übertragung des Virus mit schwerwiegenden Folgen für den Embryo/Fötus kommen. Hierbei spielt das Trächtigkeitsstadium in Verbindung mit der Entwicklung des fötalen Immunsystems eine wichtige Rolle. Bei Infektionen ausschließlich mit nzp BVDV etwa zwischen dem 40. und 125. Trächtigkeitstag kann sich eine persistierende Infektion des Fötus etablieren. In dieser Zeitspanne ist das Immunsystem des Fötus noch nicht entwickelt, und es kommt daher zu einer erworbenen Immuntoleranz gegenüber dem betreffenden nzp BVDV-Stamm. Persistent infizierte Tiere scheiden Virus lebenslang in großen Mengen aus und stellen hierdurch ein besonders wichtiges Erregerreservoir dar. Solche Tiere sind meist negativ in Tests auf Antikörper gegen BVDV, können jedoch nach Infektion mit einem heterologen BVD-Virusstamm Antikörper bilden. Persistent infizierte Tiere bleiben häufig im Wachstum zurück (sogenannte Kümmerer), können aber klinisch unauffällig sein (THIEL et al. 1996).

Eine persistierende Infektion mit einem nzp BVDV-Stamm ist Voraussetzung für die Entstehung der *Mucosal Disease* (MD) des Rindes. Diese tödlich verlaufende Infektionskrankheit tritt meist im Alter von sechs Monaten bis zwei Jahren auf. Das klinische Bild der MD ist durch Fieber, Anorexie und eine hochgradige, häufig blutige Diarrhoe gekennzeichnet; der Tod tritt meist innerhalb von zwei bis zehn Tagen nach Auftreten der Symptome ein. An den Schleimhäuten des gesamten Verdauungstraktes können Läsionen wie Ulzerationen und Nekrosen vorliegen. Im Bereich des Verdauungstraktes kommt es außerdem zu einer ausgeprägten Zerstörung des lymphatischen Gewebes. Ferner zählen Hautnekrosen im Zwischenklauenspalt zum Spektrum der klinischen Erscheinungen.

Wie bereits erwähnt, sind persistent infizierte Tiere immer Träger von BVD-Viren, die keinen zytopathischen Effekt in Kulturzellen induzieren (nzp BVD-Viren). Interessanterweise lässt sich aus an MD-erkrankten Tieren neben nzp BVDV stets ein zp BVDV isolieren; zp BVDV und nzp BVDV aus einem Tier werden als Viruspaar bezeichnet. Vergleichende Analysen haben nämlich gezeigt, dass sich die aus einem Tier stammenden zp und nzp Virusisolate serologisch in der Regel nicht oder nur geringfügig voneinander unterscheiden. Dies ist bemerkenswert, da die antigenetische Variabilität von BVDV sehr ausgeprägt ist. Daher lag die Vermutung nahe, dass das zp BVD-Virus im persistent infizierten Tier durch Mutation aus dem nzp Virus hervorgeht. Diese Hypothese konnte in den letzten 15 Jahren u. a. durch molekulare Charakterisierung zahlreicher Viruspaare verifiziert werden (MEYERS und THIEL 1996). Im Rahmen dieser Studien wurden Veränderungen in Genomen von zp BVD-Viren identifiziert, die bei nzp BVDV nicht vorkommen. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die meisten zp BVDV-Stämme durch RNA-Rekombination entstehen, nur wenigen zp BVDV-Stämmen fehlen solche offensichtlichen Rearrangements der Genome. Die bei zp BVD-Viren gefundenen Veränderungen korrelieren mit erhöhter NS3-Expression, erhöhter RNA-Replikation und Zytopathogenität. Im Folgenden werden zwei Gruppen der beschriebenen Genomveränderungen kurz dargestellt:

- Rearrangements oder Mutationen, welche die NS2-Autoprotease aktivieren. Hierbei kommt es zu erhöhter Produktion von NS3 und folglich erhöhter RNA-Replikation. So enthält der Stamm NADL innerhalb des NS2-Gens ein Fragment des zellulären Jiv-Gens

(Abb. 2). Wie unten beschrieben, handelt es sich bei Jiv um einen Kofaktor der NS2-Protease (LACKNER et al. 2005). Überexpression von Jiv und auch des Fragments führt zu erhöhter zeitlich nicht regulierter NS2-3-Spaltung.

- Insertion von Sequenzen unmittelbar stromaufwärts von der NS3-kodierenden Region, die für Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine kodieren. Solche Insertionen führen zur Prozessierung des Polyproteins durch zelluläre Proteasen wie Ubiquitin C-terminale Hydrolase und somit ebenfalls zu erhöhter Bildung von NS3 (MEYERS und THIEL 1996) (Abb. 3).

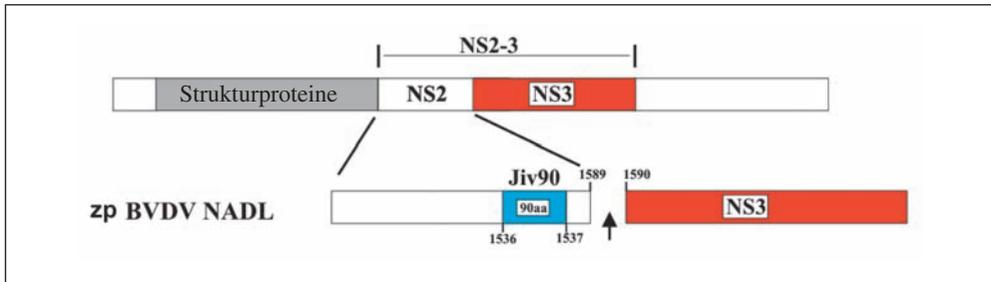


Abb. 2 zp BVDV-Stamm NADL mit Insertion eines Fragmentes von Jiv. Jiv ist ein hoch konserviertes zelluläres Protein. Es gehört zur Familie der DnaJ-ähnlichen Proteine (Chaperone). Eine Funktion von Jiv in der Zelle ist nicht bekannt. Ebenso ist eine Rolle bei der Proteolyse bislang nicht beschrieben. Jiv ist in zahlreichen zp BVDV- und zp BDV-Stämmen vorhanden.

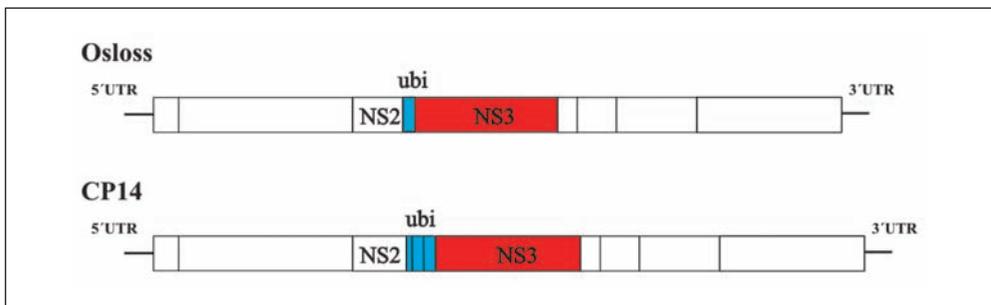


Abb. 3 zp BVDV-Stämme mit Ubiquitin-Insertionen. Ubiquitin ist ein hoch konserviertes zelluläres Protein mit verschiedenen Funktionen (Proteinabbau u. a.). Die Prozessierung von Vorläufermolekülen erfolgt durch C-terminale Hydrolasen (Ubiquitin als Substrat). Ubiquitin konnte in mehr als 10 zp BVDV-Stämmen nachgewiesen werden.

Neben der Veränderung des nzp Virus im infizierten Tier kann MD durch Infektion eines persistent infizierten Tieres mit zp BVD-Virus, u. a. durch Impfung, ausgelöst werden (BECHER et al. 2001). Nach Übertragung des zp Virus erfolgt der Ausbruch der Erkrankung entweder innerhalb von drei Wochen (Frühform oder „early onset“ MD) oder erst mehrere Monate später (Spätform oder „late onset“ MD) (FRITZEMEIER et al. 1995). Bei der Frühform ist das zp Virus dem persistierenden nzp Virus sehr ähnlich und löst die Erkrankung direkt aus. Die Spätform der MD ist hingegen auf eine Rekombination des zp Virus mit dem persistierenden nzp Virus zurückzuführen, wobei das nzp BVD-Virus vor allem den für die Zytopathogenität

verantwortlichen Genomabschnitt des zp Virus erhält. Somit entsteht eine zp Viruschimäre, die sich im persistent infizierten Tier aufgrund der erworbenen Immuntoleranz ungehindert ausbreiten kann.

2. Ein genetisches System zur Untersuchung der BVDV-Replikation

Anhand authentischer cDNA-Kopien („infektiöse cDNA“) des BVDV-Genoms konnte ein revers-genetisches System für BVDV etabliert werden, welches die *In-vitro*-Synthese von BVDV-Genomen erlaubt (MEYERS et al. 1996). Nach Einbringung dieser RNAs in bovine Zellen läuft der vollständige Replikationszyklus ab, und es werden neue infektiöse Partikel gebildet. Mit diesem System können auch genetisch veränderte virale Genome hergestellt werden, um Rückschlüsse auf die Funktion einzelner viraler Proteine zu erhalten.

Arbeiten mit diesem System haben gezeigt, dass bei Pestiviren mit Ausnahme von N^{pro} alle viralen Proteine notwendig sind, um infektiöse Nachkommenviren zu erzeugen (TRAT-SCHIN et al. 1998); neben den reifen Proteinen wird zusätzlich ungespaltenes NS2-3 benötigt (AGAPOV et al. 2004).

Im Gegensatz dazu sind für die Replikation der viralen RNA die Proteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B ausreichend; N^{pro}, p7, NS2, ungespaltenes NS2-3 sowie alle Strukturproteine werden hierfür nicht benötigt (BEHRENS et al. 1998).

3. Virale RNA-Replikation und Persistenz bei BVDV

Für die Persistenz von BVDV ist von herausragender Bedeutung, dass das Virus replizieren kann, ohne den Tod der Wirtszelle zu induzieren. Die Menge der in der Zelle vorhandenen viralen RNA spielt dabei eine zentrale Rolle. Bereits 1998 wurde nachgewiesen, dass Zellen nach einer zp BVDV-Infektion erheblich größere Mengen viraler RNA enthalten als nzp BVDV-infizierte Zellen (MENDEZ et al. 1998, VASSILEV und DONIS 2000). Ein Zusammenhang zwischen viraler RNA-Menge und dem Tod der infizierten Zelle wird vermutet, ist aber bis dato nicht bewiesen worden. Mehrere Arbeiten haben aber gezeigt, dass die zp BVDV-Infektion den programmierten Zelltod mittels Apoptose verursacht (ADLER et al. 1997, GRUMMER et al. 2002a, b, HOFF und DONIS 1997, LAMBOT et al. 1998, ZHANG et al. 1996). Ein möglicher Auslöser der Apoptose könnte doppelsträngige virale RNA sein, die als Replikationsintermediat gebildet wird. Darüber hinaus könnte auch die gesteigerte virale Proteinsynthese, welche mit der höheren Abundanz der zp BVDV RNA einhergeht, die Apoptose auslösen.

Diese Befunde machen deutlich, dass der intrazellulären Menge viraler RNA in BVDV-infizierten Zellen eine zentrale Bedeutung für die virale Persistenz zukommt: Nur wenn es dem Virus gelingt, die Menge viraler RNA unter einem kritischen Schwellenwert zu halten, unterbleibt die Apoptose der Wirtszelle, und das Virus kann persistieren.

4. Regulation der RNA-Replikation bei RNA-Viren

Viren haben viele unterschiedliche Mechanismen zur Regulation der Genomreplikation ausgebildet: Viele Viren modulieren die Genomreplikation mittels differentieller Transkription sub-

genomischer mRNAs, wodurch die Menge der verschiedenen an der Replikation beteiligten Proteine variiert werden kann. Dieser Mechanismus kommt bei den Pestiviren nicht zum Tragen, da neben der genomischen RNA keine zusätzlichen subgenomischen mRNAs entstehen.

Bei animalen Plus-Strang-RNA-Viren umfasst die Proteinexpression stets die Translation eines Polyproteins, welches unter Beteiligung viruskodierter Proteasen sukzessiv in die funktionellen Proteinfragmente zerlegt wird (KRÄUSSLICH und WIMMER 1988). Dabei üben häufig Prozessierungszwischenprodukte essentielle Funktionen aus, wie z. B. für das Poliovirus gezeigt wurde. In Analogie ist im BVDV-System ungespaltenes NS2-3 essentiell für die Bildung infektiöser Viruspartikel (AGAPOV et al. 2004). Für das Sindbisvirus, ein Alphavirus, wurde weiterhin nachgewiesen, dass sich im Verlauf der Infektion das Prozessierungsmuster des Polyproteins verändert: Während anfangs noch ungespaltene Vorläufermoleküle vorliegen, erfolgt später eine vollständige Prozessierung der Nichtstrukturproteine. Dadurch kommt es spät in der Infektion zu einem Umschalten auf die reine Synthese plus-strängiger genomischer RNAs, welche für die Erzeugung neuer infektiöser Partikel benötigt werden (LEMM et al. 1994).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass bei Plus-Strang-RNA-Viren der Polyproteinprozessierung eine wesentliche Bedeutung für die Regulation der viralen Replikation zukommt.

5. Zeitliche Regulation der NS2-3-Prozessierung bei nzp BVDV

Zwischen zp und nzp BVDV-Stämmen ist seit langem ein Unterschied im Prozessierungsmuster des Polyproteins bekannt, nämlich die Expression großer Mengen NS3 selektiv in zp BVDV-infizierten Zellen (DONIS und DUBOVI 1987, POCOCK et al. 1987). Es galt lange als Dogma, dass nach einer nzp BVDV-Infektion nur ungespaltenes NS2-3 und kein NS3 exprimiert wird. Daher wurde stets angenommen, dass in nzp BVDV-infizierten Zellen das ungespaltene NS2-3 die essentiellen Funktionen von NS3 bei der RNA-Replikation übernimmt. Kürzlich publizierte Arbeiten widerlegen jedoch diese Annahmen. Die diesbezüglichen Untersuchungen bezogen sich auf den zp BVDV-Stamm CP7. Dieses Virus weist eine stamm-spezifische 9-Aminosäuren-Insertion zentral im NS2 auf, welche essentiell und ausreichend ist, um eine effiziente NS2-3-Spaltung zu induzieren und somit den zp Biotyp des Virus zu bestimmen (TAUTZ et al. 1996). In Analogie zum humanpathogenen Hepatitis-C-Virus, für welches bereits die Existenz einer Cystein-Protease im NS2 beschrieben war, konnte gezeigt werden, dass auch die NS2-3-Spaltung des BVDV CP7 durch eine virale Protease im NS2 erfolgt (LACKNER et al. 2004) (Abb. 4). Die NS2-Autoprotease katalysiert die intramolekulare Spaltung des NS2-3 in NS2 und NS3. Die Inaktivierung der NS2-Protease im Kontext des Stamms CP7 mittels Mutagenese führte aber nicht zur Erzeugung eines nzp Virus, sondern zur vollständigen Inhibition der viralen RNA-Replikation (LACKNER et al. 2004). Das Experiment zeigte, dass es sich bei der NS2-Protease um ein essentielles Enzym handelt und dass die Freisetzung von NS3 essentiell für die virale Replikation ist. Diese Experimente erlaubten auch die Schlussfolgerung, dass die Funktion von NS3 nicht durch ungespaltenes NS2-3 ersetzt werden kann.

Interessanterweise führte die Inaktivierung der NS2-Protease auch im Kontext eines nzp BVDV-Stamms zur Inhibition der viralen Replikation. Diese Ergebnisse legten nahe, dass auch in nzp BVDV-infizierten Zellen eine NS2-3-Prozessierung/NS3-Expression erfolgt. Es

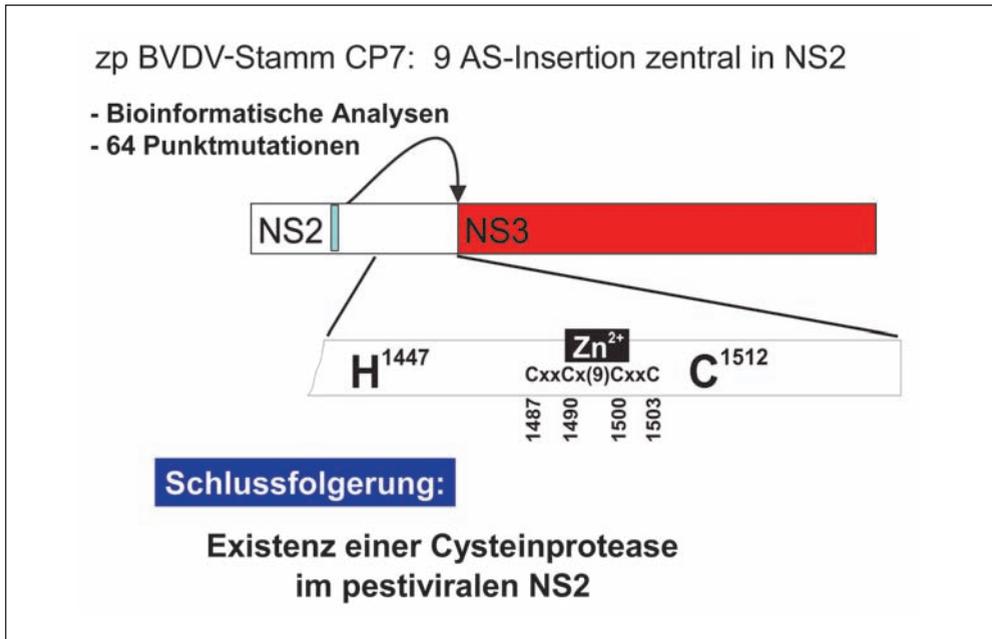


Abb. 4 Nachweis einer Cystein-Protease im NS2 des zp BVDV-Stammes CP7

war zu vermuten, dass entweder stets sehr wenig NS3 erzeugt wird oder dass NS3 nur zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion generiert wird. Um eine dieser Möglichkeiten zu bestätigen, erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion von Gewebekulturzellen mit nzp BVDV eine metabolische Markierung mit ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein für einen Zeitraum von jeweils einer Stunde. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und vorhandenes NS2-3 und NS3 mittels Immunpräzipitation (IP) angereichert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und per Autoradiographie dargestellt. Es zeigte sich, dass in nzp BVDV-infizierten Zellen im Zeitraum zwischen 5 und 8 h nach Infektion NS3 vorhanden ist; zu späteren Zeitpunkten wird in den Zellen nur noch ungespaltenes NS2-3 nachgewiesen (LACKNER et al. 2004) (Abb. 5).

6. Zeitliche Regulation der viralen RNA-Synthese bei nzp BVDV

Wie oben ausgeführt, stellt NS3 einen essentiellen Bestandteil der viralen Replikase dar, der funktionell nicht durch ungespaltenes NS2-3 ersetzt werden kann. Die Generierung von NS3 nur in den ersten 8 h nach Infektion mit nzp BVDV legte somit den Schluss nahe, dass es zu späteren Zeitpunkten zu einer Herabregulierung der nzp BVDV-RNA-Replikation kommen sollte. Um dies zu überprüfen, wurden nzp oder zp BVDV-infizierte Zellen mit ^{32}P metabolisch markiert, die zelluläre RNA-Synthese inhibiert und somit die neu synthetisierte virale RNA selektiv markiert. Die Analyse dieser RNAs ergab zu frühen Zeitpunkten (5–8 h) nach Infektion für zp und nzp BVDV vergleichbare RNA-Replikationsaktivitäten; zu späten Zeitpunkten (24–26 h nach der Infektion) brach hingegen die virale RNA-Synthese selektiv in den nzp BVDV-infizierten Zellen ein (LACKNER et al. 2004) (Abb. 6).

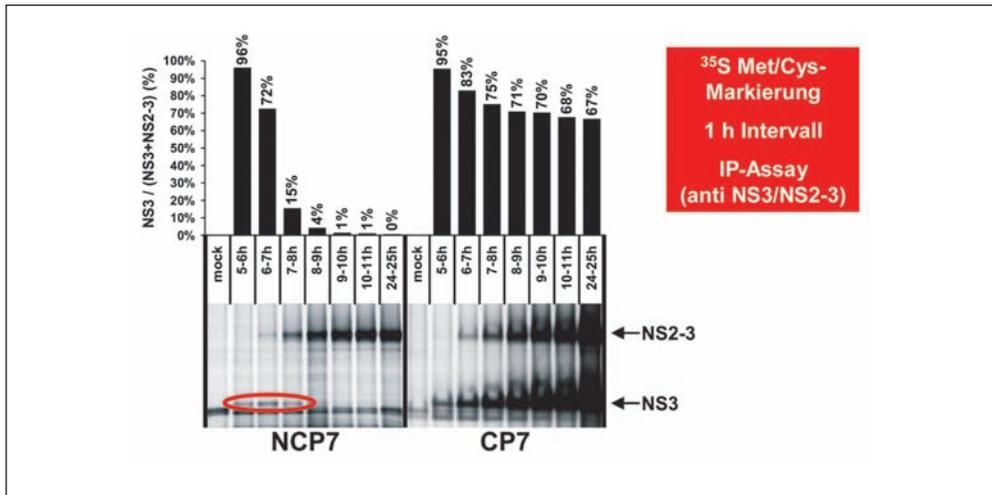


Abb. 5 Zeitliche Regulation der NS2-3-Spaltung in nzp BVDV-infizierten Zellen. nzp BVDV: Aktivität der NS2-Protease ist nur in den ersten Stunden nach Infektion nachweisbar.

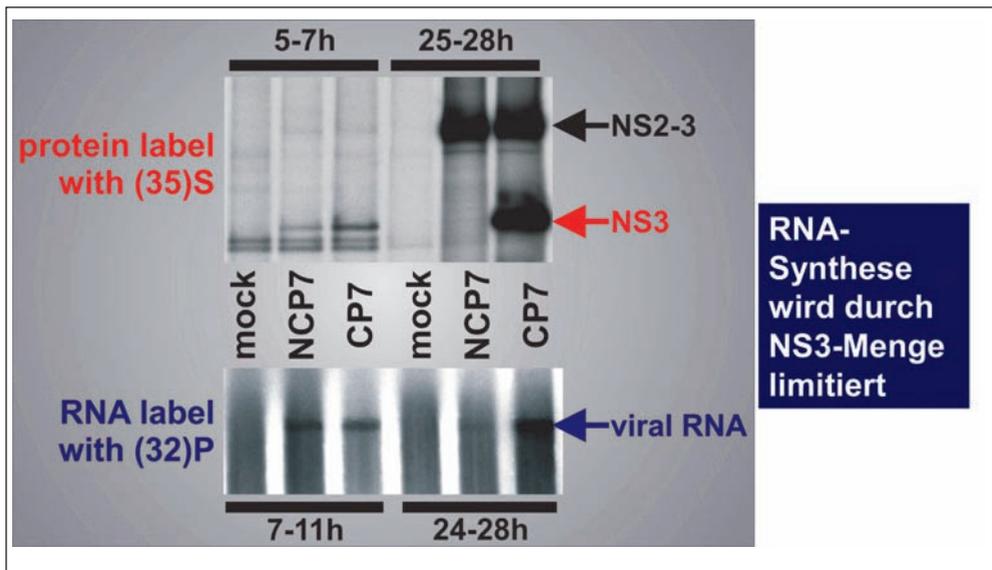


Abb. 6 Zeitliche Regulation der NS2-3-Spaltung korreliert mit Effizienz der viralen RNA-Synthese (LACKNER et al. 2004)

Dieses Experiment belegt eine Korrelation zwischen der zeitlichen Regulation der NS2-3-Spaltung und der Effizienz der viralen Replikation in nzp BVDV-infizierten Zellen.

7. Mechanismus der zeitlichen Regulation der NS2-3-Prozessierung bei nzp BVDV – die Rolle eines zellulären Chaperons

Die oben beschriebenen Befunde belegen, dass in nzp BVDV-infizierten Zellen bereits 9 h nach der Infektion keine NS2-Proteaseaktivität mehr nachweisbar ist, obwohl die NS2-3-Synthese auf hohem Niveau fortgesetzt wird. Dieser außergewöhnliche Befund legte nahe, dass sich

- in nzp BVDV-infizierten Zellen entweder ein die Spaltung inhibierender Faktor im Lauf der Infektion anreichert oder
- ein für die Spaltung durch die NS2-Protease essentieller Faktor verbraucht wird.

Wie oben ausgeführt, zeigen verschiedene zp BVDV-Stämme eine deregulierte, also über den ganzen Infektionszyklus anhaltende NS2-3-Spaltung. Für einen dieser Stämme, zp BVDV CP8, war gezeigt worden, dass ein im N-terminalen Bereich des Polyproteins insertiertes Fragment eines zellulären J-Domänenproteins für die NS2-3-Spaltungsinduktion essentiell und ausreichend war (MÜLLER et al. 2003). Weitere Arbeiten hatten gezeigt, dass das zelluläre J-Domänenprotein mit dem viralen NS2-Protein eine stabile Interaktion eingeht. Daher wurde das zelluläre Protein als „J-domain protein interacting with viral protein“ (Jiv) bezeichnet (RINCK et al. 2001). Weiterhin führte die Koexpression von nzp BVDV NS2-3 und Jiv oder dessen 90 Aminosäuren langen Fragments Jiv90 im heterologen System zur Induktion der NS2-3-Spaltung (RINCK et al. 2001).

Aufgrund dieser Daten stellte das zelluläre Protein Jiv einen attraktiven Kandidaten dar, der für die zeitliche Regulation der NS2-3-Prozessierung in nzp BVDV-infizierten Zellen verantwortlich ist.

8. Jiv als essentieller Kofaktor der NS2-Protease

Eine Möglichkeit war, dass die Bindung von Jiv an NS2 zur Aktivierung der NS2-Protease führt. Um dies zu überprüfen, erfolgte eine Koexpression von Jiv mit nzp BVDV NS2-3; zusätzlich wurde Jiv mit einer proteolytisch inaktiven nzp BVDV-NS2-Proteasemutante koexprimiert (LACKNER et al. 2005). Es zeigte sich, dass eine intakte nzp BVDV-NS2-Protease eine essentielle Voraussetzung für die Jiv-induzierte NS2-3-Spaltung ist. Dieser Versuch belegt, dass es sich bei Jiv nicht um eine Protease handelt, welche NS2-3 spaltet. Vielmehr handelt es sich bei Jiv um einen essentiellen Kofaktor der NS2-Protease von nzp BVDV (Abb. 7).

Zusammen mit weiteren Analysen, welche eine direkte proteolytische Aktivität von Jiv ausschlossen, ergaben diese Untersuchungen, dass es sich bei Jiv um einen essentiellen Kofaktor der viralen NS2-Protease handelt (LACKNER et al. 2005).

9. Der Jiv-Spiegel limitiert die NS2-3-Spaltung und RNA-Replikation in nzp BVDV-infizierten Zellen

Unsere Untersuchungen hatten gezeigt, dass in Rindergewebekulturzellen nur sehr wenig Jiv-Protein exprimiert wird. Zusammen mit der Rolle von Jiv als essentiellen Kofaktor der

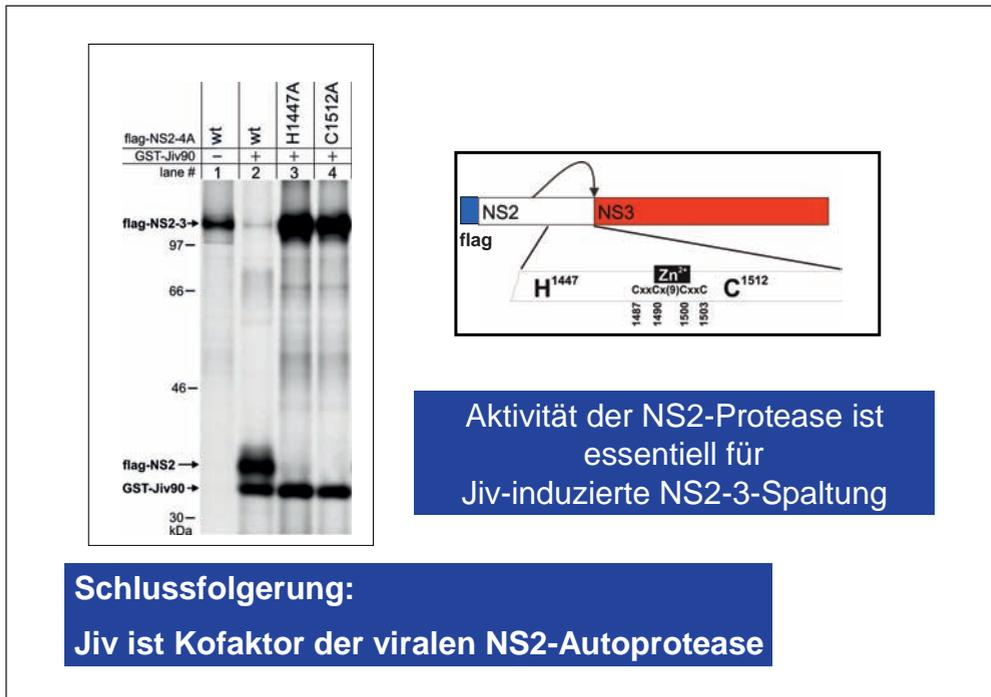


Abb. 7 Rolle von Jiv bei der NS2-3-Spaltung

NS2-Protease von nzp BVDV führte dies zur Hypothese, dass der intrazelluläre Jiv-Spiegel ursächlich für die zeitliche Limitierung der NS2-3-Spaltung in nzp BVDV-infizierten Zellen ist. Um dies zu überprüfen, wurden rekombinante Rinderzellen, welche eine regulierte Überexpression von Jiv erlauben, mit nzp BVDV infiziert. Die Überexpression von Jiv hatte folgende Auswirkungen (Abb. 8, 9):

- auch zu späten Zeitpunkten nach Infektion erfolgte die Generierung von NS3; die zeitliche Herabregulierung der NS2-3-Spaltung wurde also außer Kraft gesetzt;
- die Menge der intrazellulären viralen RNA stieg durch die Anhebung des Jiv-Spiegels ca. um den Faktor 10 an;
- die Zellen zeigten einen zytopathischen Effekt; somit kommt es in Anwesenheit hoher Jiv-Mengen zu einem Biotypwechsel von nzp zu zp BVDV (LACKNER et al. 2005).

10. Der limitierende Effekt von Jiv ist essentiell für die virale Persistenz

Als Schlussfolgerung lässt sich festhalten, dass ein niedriger Jiv-Spiegel eine Voraussetzung für den nzp Biotyp von BVDV ist (LACKNER et al. 2005). Wird der darauf basierende Regulationsmechanismus für die virale Replikation aufgehoben, z. B. durch Anhebung des intrazellulären Jiv-Spiegels, ist BVDV nicht mehr in der Lage eine persistierende Infektion auszubilden. Im BVDV-System ist somit ein Wirtsfaktor, der die virale Replikation limi-

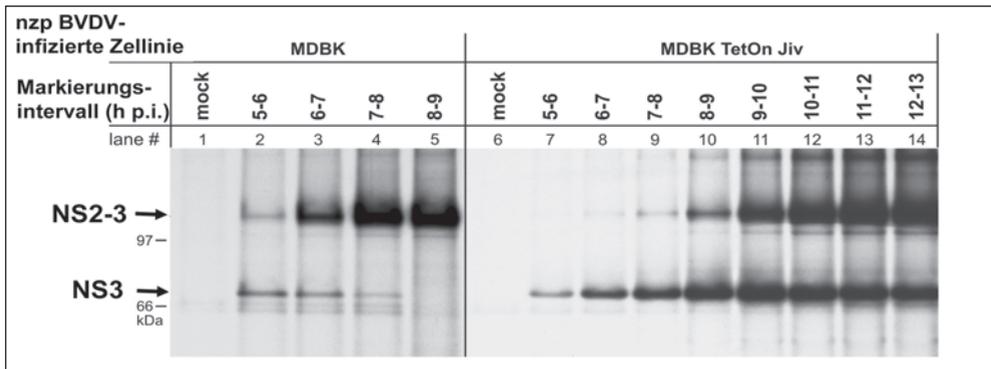


Abb. 8 Anhebung des Jiv-Spiegels unterdrückt zeitliche Regulation der NS2-3-Spaltung

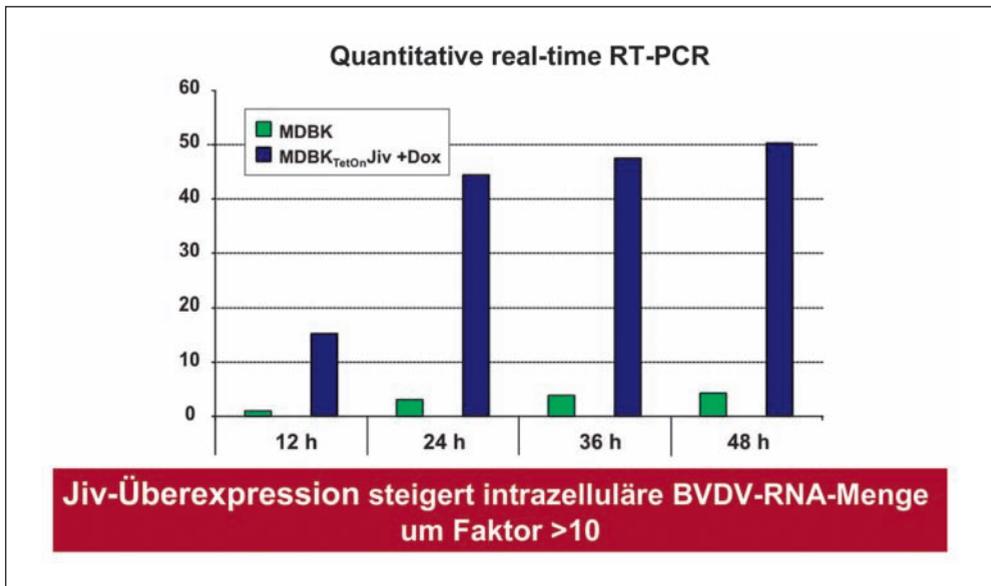


Abb. 9 Jiv-Überexpression stimuliert pestivirale RNA-Replikation

tiert, entscheidend für die Fähigkeit dieses Virus, persistierende Infektionen zu etablieren. Zp BVDV-Stämme haben aufgrund von Mutationen die Fähigkeit zur zeitlichen Regulation der NS3-Expression und damit der viralen RNA-Replikation verloren. Einhergehend damit sind sie auch nicht mehr in der Lage, persistierende Infektionen im Rind zu etablieren.

Zukünftige Arbeiten sollen zeigen, ob es sich beim bovinen Wirtsfaktor Jiv um ein Protein handelt, welches essentiell für die Replikation von nzp BVDV ist. Sollte dies der Fall sein, kann mit züchterischen oder genetischen Methoden versucht werden, ein für BVDV unempfindliches Rind zu generieren.

Literatur

- ADLER, B., ADLER, H., PFISTER, H., JUNGI, T. W., and PETERHANS, E.: Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *J. Virol.* **71**, 3255–3258 (1997)
- AGAPOV, E. V., MURRAY, C. L., FROLOV, I., QU, L., MYERS, T. M., and RICE, C. M.: Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* **78**, 2414–2425 (2004)
- BECHER, P., ORLICH, M., and THIEL, H.-J.: RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.* **75**, 6256–6264 (2001)
- BEHRENS, S.-E., GRASSMANN, C. W., THIEL, H.-J., MEYERS, G., and TAUTZ, N.: Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* **72**, 2364–2372 (1998)
- DONIS, R. O., and DUBOVI, E. J.: Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and non-cytopathic biotypes of bovine diarrhoea-mucosal disease virus. *Virology* **158**, 168–173 (1987)
- FRITZEMEIER, J., GREISER-WILKE, I., HAAS, L., PITUCO, E., MOENNIG, V., and LIESS, B.: Experimentally induced “late-onset” mucosal disease – characterization of the cytopathogenic viruses isolated. *Vet. Microbiol.* **46**, 285–294 (1995)
- GRUMMER, B., BENDFELDT, S., and GREISER-WILKE, I.: Apoptosis inhibitors delay the cytopathic effect of bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **49**, 298–303 (2002a)
- GRUMMER, B., BENDFELDT, S., WAGNER, B., and GREISER-WILKE, I.: Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus. *Virus Res.* **90**, 143–153 (2002b)
- HOFF, H. S., and DONIS, R. O.: Induction of apoptosis and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection. *Virus Res.* **49**, 101–113 (1997)
- KRÄUSSLICH, H. G., and WIMMER, E.: Viral proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 701–754 (1988)
- LACKNER, T., MÜLLER, A., KÖNIG, M., THIEL, H.-J., and TAUTZ, N.: Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J. Virol.* **79**, 9746–9755 (2005)
- LACKNER, T., MÜLLER, A., PANKRAZ, A., BECHER, P., THIEL, H. J., GORBALENYA, A. E., and TAUTZ, N.: Temporal modulation of an autoprotease is crucial for replication and pathogenicity of an RNA virus. *J. Virol.* **78**, 10765–10775 (2004)
- LAMBOT, M., HANON, E., LECOMTE, C., HAMERS, C., LETESSON, J. J., and PASTORET, P. P.: Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J. Gen. Virol.* **79**, 1745–1749 (1998)
- LEMM, J. A., RÜMENAPF, T., STRAUSS, E. G., STRAUSS, J. H., and RICE, C. M.: Polypeptide requirements for assembly of functional sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J.* **13**, 2925–2934 (1994)
- MENDEZ, E., RUGGLI, N., COLLETT, M. S., and RICE, C. M.: Infectious bovine viral diarrhoea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.* **72**, 4737–4745 (1998)
- MEYERS, G., TAUTZ, N., BECHER, P., THIEL, H.-J., and KÜMMERER, B.: Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhoea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* **70**, 8606–8613 (1996)
- MEYERS, G., and THIEL, H.-J.: Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in virus research* **47**, 53–117 (1996)
- MÜLLER, A., RINCK, G., THIEL, H.-J., and TAUTZ, N.: Cell-derived sequences located in the structural genes of a cytopathogenic pestivirus. *J. Virol.* **77**, 10663–10669 (2003)
- POCOCK, D. H., HOWARD, C. J., CLARKE, M. C., and BROWNLIE, J.: Variation in the intracellular polypeptide profiles from different isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Arch. Virol.* **94**, 43–53 (1987)
- RINCK, G., BIRGHAN, C., HARADA, T., MEYERS, G., THIEL, H.-J., and TAUTZ, N.: A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J. Virol.* **75**, 9470–9482 (2001)
- TAUTZ, N., MEYERS, G., STARK, R., DUBOVI, E. J., and THIEL, H.-J.: Cytopathogenicity of a pestivirus correlated with a 27 nucleotide insertion. *J. Virol.* **70**, 7851–7858 (1996)
- THIEL, H.-J., COLLETT, M. S., GOULD, E. A., HEINZ, F. X., HOUGHTON, M., MEYERS, G., PURCELL, R. H., and RICE, C. M.: Family Flaviviridae. In: FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., and BALL, L. A. (Eds.): *Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; pp. 979–996. San Diego, USA: Academic Press 2005
- THIEL, H.-J., PLAGEMANN, P. G. W., and MOENNIG, V.: Pestiviruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., and HOWLEY, P. M. (Eds.): *Fields Virology*, 3rd Ed. Vol. *1*, pp. 1059–1073. Philadelphia, New York: Lippincott – Raven Publishers 1996

- TRATSCHIN, J. D., MOSER, C., RUGGLI, N., and HOFMANN, M. A.: Classical swine fever virus leader proteinase N^{pro} is not required for viral replication in cell culture. *J. Virol.* 72, 7681–7684 (1998)
- VASSILEV, V. B., and DONIS, R. O.: Bovine viral diarrhoea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Virus Res.* 69, 95–107 (2000)
- ZHANG, G., ALDRIDGE, S., CLARKE, M. C., and MCCAULEY, J. W.: Cell death induced by cytopathic bovine diarrhoea virus is mediated by apoptosis. *J. Gen. Virol.* 77, 1677–1681 (1996)

Prof. Dr. Norbert TAUTZ
Universität zu Lübeck
Institut für Med. Molekularbiologie
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck
Tel.: +49 451 5004080
Fax: +49 451 5003637
E-Mail: Tautz@molbio.uni-luebeck.de

Prof. Dr. Heinz-Jürgen THIEL
Universität Gießen
Institut für Virologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Frankfurter Straße 107
35392 Gießen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 641 9938350
Fax: +49 641 9338359
E-Mail: heinz-juergen.thiel@vetmed.uni-giessen.de

BSE – Status quo und Quo vadis?

Gemeinsames Symposium

der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und der
Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW)
vom 25. bis 26. Juli 2005 in Wien

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 94, Nr. 347

Herausgegeben von Gottfried BREM (Wien) und Mathias MÜLLER (Wien)

(2006, 265 Seiten, 70 Abbildungen, 17 Tabellen, 27,95 Euro, ISBN-10: 3-8047-2318-7,
ISBN-13: 978-3-8047-2318-4)

TSEs (Transmissible spongiforme Enzephalopathien) sind übertragbare Hirnerkrankungen mit schwammartigen degenerativen Veränderungen bei Mensch und Tier, die stets tödlich verlaufen. Besonders bekannt wurde die Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE). Noch immer gibt es weder eine verlässliche Prophylaxe noch Therapie. Seit 1996 hat die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina die Problematik wiederholt aufgegriffen und eine verbesserte und international koordinierte Tierseuchenbekämpfung, unabhängig von nationalstaatlichen Vorgaben, gefordert. Ziel der Veranstaltung 2005 war es, einen Überblick des gegenwärtig verfügbaren Wissens und des Stands der Forschung zu liefern. Der Band diskutiert die Auswirkungen der BSE-Problematik auf Landwirtschaft, Veterinärmedizin und Pharmaindustrie sowie die Wahrnehmung des „Rinderwahnsinns“ in Medien und Öffentlichkeit. Behandelt werden außerdem die neuesten Forschungen zur Prion-Hypothese und zu Fragen von Anfälligkeit/Resistenz sowie zu genetischen Komponenten bei verschiedenen Tierarten, darüber hinaus werden Pathogenese-Modelle und medizinisch-therapeutische Ansätze sowie Maßnahmen zur Sicherheit in den Nahrungs- und Futtermittelketten erörtert. Die BSE-Thematik ist auch nach über zehn Jahren intensiver Forschung noch von hoher wissenschaftlicher, gesellschaftlicher und politischer Brisanz.

In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Frühe Schritte der BVDV-Invasion in die Wirtszelle

Till RÜMENAPF und Thomas KREY (Gießen)

Mit 5 Abbildungen

Zusammenfassung

Der erste Schritt der Infektion eines Organismus durch ein Virus ist die Bindung an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle. Als Rezeptor für das Virus der Bovinen Virus-Diarrhoe (BVDV) sind bislang zwei Moleküle identifiziert worden, das bovine CD46-Molekül, ein Regulator der Komplementkaskade, und saure Glykosaminoglykane (z. B. Heparansulfat). Während die Bindung von BVDV an Heparansulfat vermutlich als Folge der Zellkulturadaptation auftritt, wird CD46 von nahezu allen untersuchten BVDV-Isolaten als Rezeptor verwendet. Eine molekulare Charakterisierung des CD46-Moleküls, das auch als Rezeptor für das humane Herpesvirus 6, bestimmte humane Adenoviren und einzelne Isolate von Masernvirus dient, erlaubte die Identifizierung von zehn Aminosäuren als Determinanten der BVDV-Bindungsstelle.

Nach der Adsorption erfolgt die Aufnahme von BVDV in die Zelle (Penetration) durch Clathrin-abhängige Endozytose und säureabhängige Fusion in ähnlicher Weise, wie es für verwandte Vertreter der Familie Flaviviridae bekannt ist. Im Gegensatz zu diesen sind BVDV und andere Pestiviren in hohem Maße säureresistent und besitzen damit eine gesteigerte Tenazität. Eine ähnliche Säurestabilität wurde kürzlich auch beim Hepatitis-C-Virus des Menschen gezeigt. Auf die Frage, wie ein Virus gleichzeitig säureresistent sein und säureabhängig fusionieren kann, wurde kürzlich eine mögliche Erklärung gefunden. Untersuchungen über die Virusfusion zeigten, dass Disulfidbrücken in den viralen Glykoproteinen das Virion stabilisieren und eine Auflösung dieser Disulfidbrücken eine Voraussetzung für die Membranfusion darstellt.

Abstract

The first step in the viral infection of an organism is the binding of a virion to a host cell via receptor molecules at the cell surface. For bovine viral diarrhea virus (BVDV) two different receptors have been identified. These are the bovine CD46 molecule, a regulator of complement activation, and charged glycosaminoglycans such as heparan sulfate. While the latter is restricted to a few strains, likely as a result of tissue culture adaptation, CD46 is used by a large number of BVDV-I and -II isolates. Molecular characterization of bovine CD46 revealed a BVDV binding site consisting of 10 amino acids within the most distal domain (CCP1).

After adsorption BVDV enters the host cell by clathrin-dependent endocytosis and acid-triggered membrane fusion, analogous to the entry pathway of other members of the family Flaviviridae. In contrast to flaviviruses for pestiviruses a remarkable acid resistance was described, a property that has also been reported for hepatitis C virus (HCV) recently. The contradiction between acid resistance and acid-dependent fusion is currently explained by abundant disulfide bonds that stabilize the pestiviral glycoproteins. There is evidence that reduction of disulfide bonds occurs during internalization that facilitates conformational changes required for fusion.

1. Einführung

Pestiviren sind eine Gruppe von serologisch verwandten Pathogenen, die beim Schwein als Erreger der Klassischen Schweinepest (KSP), beim Rind als Erreger der Virus-Diarrhoe (BVD) und beim Schaf als Erreger der „border disease“ (BD) in Erscheinung treten (MOENNIG und PLAGEMANN 1992, THIEL und MOENNIG 1996). Zusammen mit den Genera *Flavivirus* und

Hepacivirus bilden sie die Familie Flaviviridae. Virionen aller drei Genera ähneln sich morphologisch und liegen im Größenbereich von 40–60 nm (RICE 1996). Die Flaviviridae sind behüllte RNA-Viren mit einem einzelsträngigen Genom positiver Polarität, das ein großes offenes Leseraster (ORF) besitzt (RICE 1996). Pestiviren besitzen mit ca. 12,5 kb das längste Genom der Familie Flaviviridae und kodieren mit 4000 Aminosäuren auch das umfangreichste Polyprotein, das durch zelluläre und virale Proteinasen ko- und posttranslational in 11–12 reife Proteine gespalten wird ($\text{NH}_2\text{-N}^{\text{pro}}/\text{C}/\text{E}^{\text{ms}}/\text{E1}/\text{E2}/\text{p7}/\text{NS2-3}/\text{NS4A}/\text{NS4B}/\text{NS5A}/\text{NS5B}\text{-COOH}$) (COLLETT et al. 1991, THIEL und MOENNIG 1996). Das behüllte, pestivirale Virion besteht aus 4 Strukturproteinen, dem Kapsidprotein, dem peripheren Glykoprotein E^{ms} und den 2 membranverankerten Glykoproteinen E1 und E2. Diese Glykoproteine treten in der Virushülle als disulfidverbrückte E2-E2-, $\text{E}^{\text{ms}}\text{-E}^{\text{ms}}$ -, E1-E2- und $\text{E}^{\text{ms}}\text{-E2}$ -Homo- und Heterodimere auf (DURANTEL et al. 2001, LAZAR et al. 2003, THIEL et al. 1991, WEILAND et al. 1990). Diese kovalente Heterodimerisierung der Glykoproteine stellt einen bemerkenswerten Unterschied zu anderen Flaviviren dar.

2. Zelluläre Rezeptoren für BVDV

Pestiviren lassen sich nach Generalisierung der Erkrankung in den meisten Geweben nachweisen, die primäre Ausbreitung erfolgt jedoch vor allem im lymphatischen System. In den Tonsillen, Lymphknoten und der Milz ist das Virus zuerst nachweisbar und verteilt sich im Organismus während einer z. T. zellgebundenen Virämie (MOENNIG und PLAGEMANN 1992, THIEL und MOENNIG 1996). Pestiviren sind in ihrer natürlichen Verbreitung auf Paarhufer (Artiodactyla) beschränkt, wobei zwar Wiederkäuer (z. B. Rind) und Nichtwiederkäuer (z. B. Schwein) eigene Pestivirusspezies besitzen, der Wirtswechsel zwischen Rind und Schwein aber auch unter natürlichen Bedingungen beschrieben wurde. Auch in Zellkultur sind fast ausschließlich Zellen von Tierspezies der Ordnung Artiodactylae infizierbar.

Die bisherigen Kenntnisse über zelluläre Rezeptoren für Pestiviren beschränken sich im Wesentlichen auf BVDV. Als zellulärer Rezeptor für BVDV wurde der *Low-Density*-Lipoprotein (LDL)-Rezeptor postuliert (AGNELLO et al. 1999). Neben einer Hemmung der BVDV-Infektion von MDBK-Zellen durch Antikörper gegen den LDL-Rezeptor wurde berichtet, dass die Unempfindlichkeit von CRIB-Zellen („Cells resistant to infection with BVDV“, FLORES und DONIS 1995) gegenüber BVDV auf das Fehlen des LDL-Rezeptors zurückzuführen ist (AGNELLO et al. 1999). Eigene Untersuchungen lassen jedoch eine Beteiligung des LDL-Rezeptors bei der Invasion von BVDV zweifelhaft erscheinen (KREY et al. 2006b). Auch die Bindung von Pestiviren an saure Glykosaminoglykane scheint eine Rolle bei der Invasion zu spielen. Für das BVDV-Isolat PE515 wurde die Bindung von E^{ms} an Heparin beschrieben (IQBAL et al. 2000, IQBAL und MCCAULEY 2002). Die dabei identifizierte Bindungsdomäne ist identisch mit der bereits beobachteten Substitution von $\text{Ser}_{476}\text{Arg}$ im E^{ms} des Virus der klassischen Schweinepest (KSPV), die ebenfalls Bindung an Heparin bewirkte. Diese Mutation wurde allerdings als Folge einer Gewebekulturadaption charakterisiert, die während der Passage im Tier wieder verloren geht (HULST et al. 2001). Kürzlich gelang die Identifizierung des bovinen CD46 als zellulärer Rezeptor für BVDV (MAURER et al. 2004). Im Rahmen der Erzeugung serologischer Reagenzien gegen BVDV wurden drei monoklonale Antikörper (mAK) isoliert, die eindeutig die Infektion mit BVDV hemmten (SCHELP et al. 2000) und gegen ein zelluläres Protein gerichtet waren. Dieses Protein wurde später als das

bovine CD46 identifiziert. CD46 wird auf allen Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten und bestimmter Zellen des ZNS exprimiert (JOHNSTONE et al. 1993, LISZEWSKI et al. 1991). Es bindet als „membrane cofactor protein“ den Komplementfaktor C3b und ermöglicht die Spaltung durch die im Serum vorhandene Serin-Protease C4b. Dadurch werden Zellen vor dem Angriff durch das autologe Komplementsystem geschützt (LISZEWSKI et al. 1991). CD46 wurde als Rezeptor für bestimmte Masern-Virus (MV)-Stämme auf humanen Zellen identifiziert (DORIG et al. 1993, NANICHE et al. 1993). Kürzlich wurde CD46 auch als zellulärer Rezeptor des Humanen Herpesvirus 6 (HHV-6) (SANTORO et al. 1999) und verschiedener Serotypen humaner Adenoviren identifiziert (GAGGAR et al. 2003, SIRENA et al. 2004, WU et al. 2004). Die Häufung verschiedener Pathogene, die CD46 als Rezeptor benutzen (CATTANEO 2004), ist auffällig, der Grund dafür bleibt aber letztlich ungeklärt.

Überexpression von bovinem CD46 in Zellen verschiedener Spezies bewirkte stets eine deutliche Zunahme der Bindung von BVDV, jedoch war eine Steigerung der Empfänglichkeit nur in porcinen Zellen zu verzeichnen (Abb. 1). Dies unterstützt die Annahme, dass es neben CD46 als hochaffinem Bindungsrezeptor weitere, vermutlich für die Ordnung Artiodactylae spezifische Moleküle gibt, die für eine Infektion durch Pestiviren benötigt werden. Von besonderem Interesse war die Frage, ob bovines CD46 als Rezeptor nur bei einzelnen

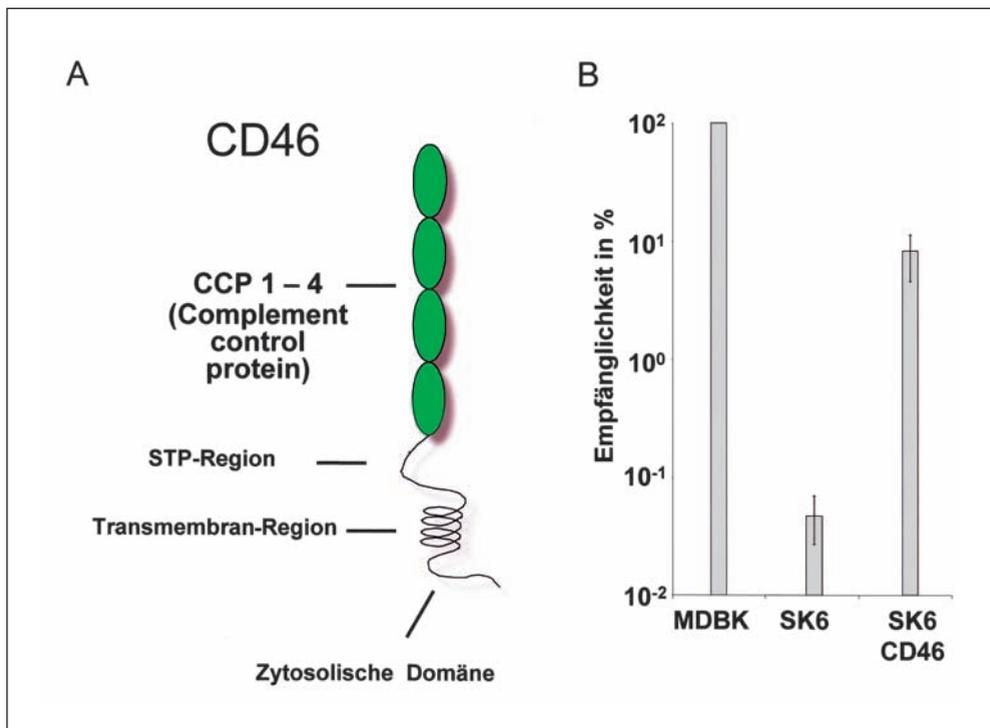


Abb. 1 (A) Schematischer Aufbau des CD46-Moleküls. (B) Expression von bovinem CD46 in porcinen SK6-Zellen steigert die Empfänglichkeit für BVDV. MDBK, SK6 und CD46 exprimierende SK6-Zellen wurden unter identischen Bedingungen mit BVDV NADL infiziert und 18 Stunden später die Zahl infizierter Zellen immunhistochemisch bestimmt. Die gegenüber MDBK-Zellen 1000-fach geringere Empfänglichkeit von SK6-Zellen wird durch Expression von CD46 100-fach stimuliert.

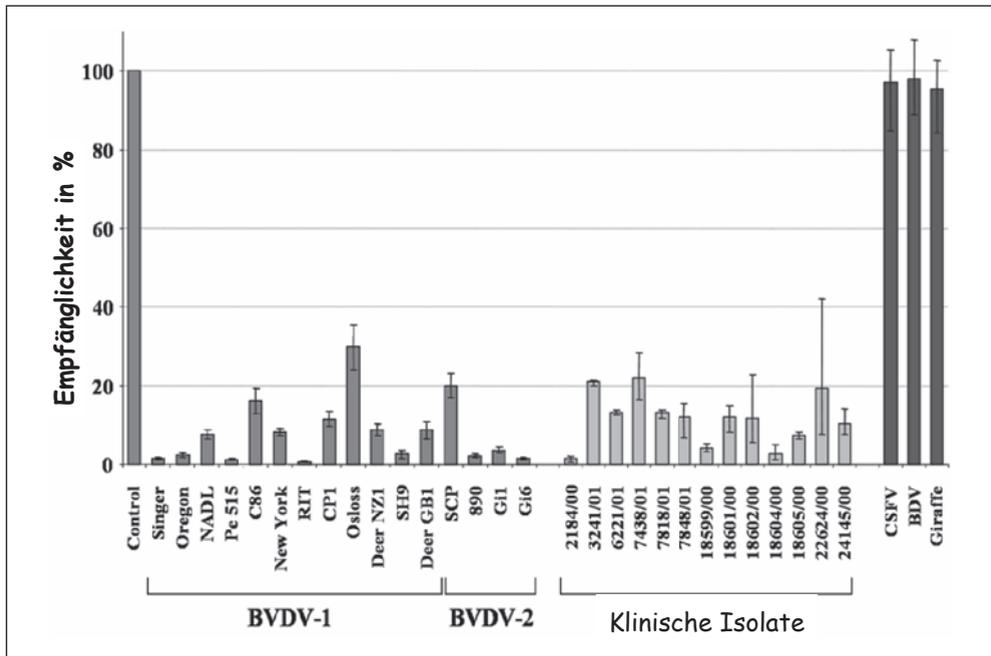


Abb. 2 Anti-CD46-Antikörper hemmen die Infektion von MDBK-Zellen mit BVDV-1- und -2-Stämmen sowie mit klinischen Isolaten. Die Infektionseffizienzen der angezeigten Virusisolaten wurden auf MDBK-Zellen verglichen, die entweder mit Präimmuns Serum oder mit Anti-CD46-Antiserum präinkubiert wurden. Die Anzahl infizierter Zellen nach Präinkubation mit Präimmuns Serum wurde als 100% angenommen, und die Infektionseffizienzen wurden in Prozent der Kontrolle angegeben.

(an Zellkultur adaptierten) BVDV-Isolaten eine Rolle spielt oder ob es sich um einen generellen BVDV-Rezeptor handelt. Als Untersuchungskriterium wurde die Hemmung der Infektion von MDBK-Zellen durch Anti-CD46-Antikörper herangezogen. Neben 18 bereits in Zellkultur passagierten BVDV Typ-1- und Typ-2-Laborstämmen wurden auch 10 klinische Isolate getestet. In allen Fällen wurde die Empfänglichkeit von MDBK-Zellen durch Anti-CD46-Antikörper um 60% – 98% reduziert, während die Infektion mit anderen Pestiviruspezies unbeeinflusst blieb (Abb. 2). Dies spricht dafür, dass bovines CD46 von allen untersuchten BVDV-Isolaten als Rezeptor verwendet wird und es sich nicht um ein Phänomen der Zellkulturadaptation handelt. Der unterschiedliche Grad der Hemmung ist vermutlich durch die Verwendung alternativer Rezeptoren zu erklären.

3. Identifizierung der BVDV-Bindungsdomäne im CD46

Um die Interaktion zwischen BVDV und CD46 auf molekularer Ebene zu verstehen, wurde die Bindungsdomäne im CD46 kartiert. CD46 ist ein aus vier CCP-Elementen (*complement control protein*) modular aufgebautes Typ-1-Transmembranprotein. Die bisher bekannten Liganden von CD46 binden an verschiedene CCPs im humanen CD46, so bindet der physiologische Ligand C3b an CCP 3 (ADAMS et al. 1991), das humane Herpesvirus 6 (HHV-6)

(MORI et al. 2002, SANTORO et al. 2003). Masern-Virus bindet dagegen an den CCPs 1 und 2 (BUCHHOLZ et al. 1997), humane Adenoviren ebenfalls an CCP 2 (GAGGAR et al. 2005). Um die Bindungsstelle von BVDV im bovinen CD46 zu kartieren, wurden zum einen Deletionsmutanten erzeugt, denen jeweils eine oder mehrere CCPs fehlen. Zum anderen wurden Substitutionsmutanten konstruiert, in denen bestimmte Aminosäuresequenzen durch die korrespondierenden Genabschnitte des porcinen CD46 ersetzt wurden, welches keine Bindungsaktivität für BVDV besitzt. Mit den veränderten CD46-Genen wurden stabile Zelllinien auf der Basis von porcinen Zellen (swine kidney 6; SK6; KASZA et al. 1972) erzeugt, die gegenüber BVDV eine mehr als 1000-fach geringere Empfänglichkeit aufweisen als bovine Zellen (Madin Darby

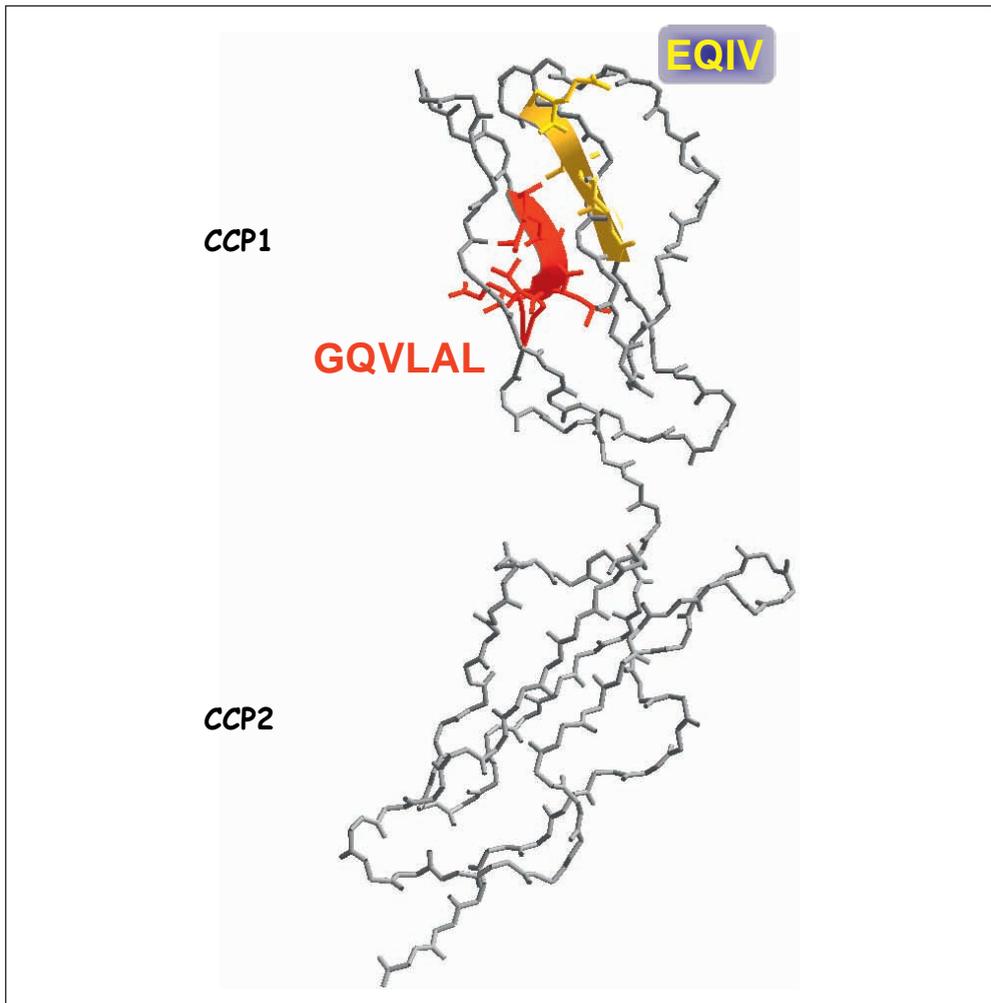


Abb. 3 Position der beiden Peptide EQIV und GQVLAL in CCP1 und 2 des bovinen CD46. Das bovine CD46 wurde auf der Basis der bekannten Kristallstruktur von CCP1 und 2 des humanen CD46 (CASASNOVAS et al. 1999) mit Hilfe von *Swiss model* modelliert. Die beiden Peptide EQIV (gelb) und GQVLAL (rot) befinden sich auf benachbarten, antiparallelen Beta-Faltblättern (*beta sheets*) und bilden eine Bindungsplattform in CCP1.

bovine kidney; MDBK). Die entstehenden Zelllinien wurden hinsichtlich Virusbindung und Empfänglichkeit gegenüber BVDV untersucht. Die Analysen zeigten, dass für die Virusbindung insbesondere die Identität des bovinen CCP1 entscheidend war. Durch eine Reihe von Chimären und Punktmutationen konnten zwei Peptidabschnitte lokalisiert werden, die für die BVDV-Bindung verantwortlich waren. Die Substitution dieser Bereiche im bovinen CD46 durch porcine Sequenzen führte zum Verlust der Rezeptoreigenschaften. Die umgekehrte Substitution, also das Ersetzen der porcinen Sequenzen im CCP1 von porcinem CD46 durch die beiden bovinen Peptidabschnitte E₆₇QIV₇₀ und G₈₄QVLAL₈₉ bewirkte hingegen einen „gain of function“ (KREY et al. 2006a). Eine Modellierung des bovinen CD46 auf der Grundlage der bekannten Kristallstruktur von CCP1 und 2 des humanen CD46 (CASASNOVAS et al. 1999) ergab, dass die 10 an der Bindung beteiligten Aminosäuren direkt benachbart auf antiparallelen Beta-Faltblättern (*beta sheets*) liegen und eine Bindungsplattform bilden (Abb. 3). Diese Bindungsstelle liegt seitlich an der Spitze des antennenartigen CD46-Moleküls.

CD46-Mutanten, bei denen die Distanz der Bindungsstelle von der Plasmamembran durch Einschub weiterer CCP-Module (von Komplementfaktor-4-bindendem Protein C4BP) vergrößert wurde, zeigten unveränderte Bindungseigenschaften, wogegen die Empfänglichkeit der entsprechenden SK6-Zelllinie abnahm (KREY et al. 2006a).

4. Charakterisierung des Internalisierungswegs von Pestiviren

Behüllte Viren überwinden die Zellmembran entweder mittels Membranfusion an der Zelloberfläche oder durch Endozytose mit Fusion an intrazellulären Membranen (MARSH und HELENIUS 1989). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression einer dominant-negativen Mutante der plasmamembranständigen GTPase Dynamin (Dynamin^{K44A}) (DAMKE et al. 1994), die den Endozytoseprozess blockiert, auch die BVDV-Invasion hemmt (KREY et al. 2005). Ebenso blockierten verschiedene chemische und physikalische Inhibitoren der Endozytose, z. B. Chlorpromazin oder Hyperosmolarität, die BVDV-Invasion. Damit konnte bewiesen werden, dass BVDV mittels Clathrin-abhängiger Endozytose in die Zelle gelangt, was auch durch die Abhängigkeit der BVDV-Infektion von Eps15, einem spezifisch in die Clathrin-abhängige Endozytose involvierten Membranprotein (LECOT et al. 2005), bestätigt wurde. Das Fusionsereignis findet demnach im Endosom statt, wie auch aus der hemmenden Wirkung verschiedener Inhibitoren der endosomalen Azidifizierung auf die BVDV-Infektion abzuleiten ist (KREY et al. 2005).

Der Invasionsprozess behüllter Viren mündet in die Membranfusion zwischen Virushülle und zellulärer Membran (SMITH und HELENIUS 2004) und führt zur Freisetzung der viralen Nukleinsäure bzw. des viralen Nukleokapsids in das Zytoplasma. Strukturelle Grundlage des Fusionsprozesses sind virale Oberflächenglykoproteine, die als Fusionsproteine bezeichnet werden. Im Verlauf der Invasion induzieren Virus-Zell-Interaktionen eine Konformationsänderung des Fusionsproteins, die zur Exposition eines vorher unzugänglichen, hydrophoben „Fusionspeptids“ führt. Dieses interagiert direkt mit der Ziellmembran.

Röntgenstrukturanalysen viraler Fusionsproteine führten zu einer Einteilung in zwei Klassen, I und II. Diese unterscheiden sich in strukturellen Gesichtspunkten sowie in der Position des Fusionspeptids in der Primärstruktur. Für die im Virion als Homotrimer auftretenden Fusionsproteine der Klasse I gilt das Influenza-Hämagglutinin als Prototyp (SKEHEL und WILEY 2000). Sie bestehen vorwiegend aus α -Helices und tragen ein N-terminales Fusionspeptid.

Zur Klasse II der viralen Fusionsproteine gehören bislang nur das E-Protein der Flaviviren (REY et al. 1995) und das Alphavirus-Protein E1 (LESCAR et al. 2001). Beide haben eine sehr ähnliche Faltung und Quartärstruktur gemeinsam, die trotz fehlender Homologie in der Aminosäuresequenz deutliche Hinweise auf eine Verwandtschaft liefert. Fusionsproteine der Klasse II besitzen hauptsächlich antiparallele Beta-Faltblattstrukturen, und das Fusionspeptid ist intern im Fusionsprotein lokalisiert. Während der Virusreifung treten Fusionsproteine der Klasse II als Heterodimere zusammen mit einem weiteren Glykoprotein auf, von dem eine Chaperonfunktion für die Faltung des Fusionsproteins angenommen wird. Diese assoziierten Glykoproteine werden während der Virusfreisetzung proteolytisch gespalten (HEINZ und ALLISON 2000, KIELIAN et al. 2000). Die proteolytische Reifung der Glykoproteine induziert bei Flaviviren die Bildung eines E-Protein-Homodimers, welches nur in murenen Virionen beobachtet wird (HEINZ und ALLISON 2000).

Die eigentliche Aktivierung der Klasse-II-Fusionsproteine durch den sauren, endosomalen pH beginnt mit der reversiblen Dissoziation des Hetero- (Alphavirus E1/E2) bzw. Homodimers (Flavivirus E). Die Oberflächenexposition des Fusionspeptids im entstehenden Monomer führt dann zu einer Interaktion mit der Zielmembran. Diese Interaktion in Verbindung mit dem sauren Milieu führt zur irreversiblen Homotrimerisierung des Fusionsproteins und zur Fusion zwischen viraler und endosomaler Membran (BRESSANELLI et al. 2004, GIBBONS et al. 2004, MODIS et al. 2004) (Abb. 4).

Die Identität des pestiviralen Fusionsproteins ist bislang unbekannt. In bioinformatischen Analysen wurde KSPV E2 auf Basis eines Sequenzvergleichs mit Hepatitis-C-Virus E1 und TBEV E als Fusionsprotein postuliert, während eine Sequenzhomologie zwischen dem akzessorischen Glykoprotein preM von TBEV und KSPV E1 festgestellt wurde (GARRY und DASH 2003). Die prädominante Glykoproteinform im pestiviralen Virion ist das E1/E2-Heterodimer (THIEL et al. 1991), ein Oligomerisierungsstatus, der mit dem anderer funktioneller Klasse-II-Fusionsproteine an der Virusoberfläche übereinstimmt.

Behüllte Viren, die mittels Rezeptor vermittelter Endozytose in die Zelle gelangen, werden in der Regel (Ausnahme: Rhabdoviren) durch ein saures Milieu vollständig inaktiviert. Durch die Konformationsänderung im viralen Fusionsprotein wird die Fähigkeit, den zellulären Rezeptor zu binden, eingebüßt. Dadurch wird die Infektiosität des Virions aufgehoben.

Interessanterweise ist für Pestiviren beschrieben, dass sie in erheblichem Maße resistent gegen niedrige pH-Werte sind (DEPNER et al. 1992). Darüber hinaus ist es unmöglich, an die Zellmembran adsorbierte pestivirale Virionen durch Ansäuerung des Milieus mit der Zellmembran zu fusionieren, eine Eigenschaft, die für Alpha- und Flaviviren als typisch gilt („fusion from without“). Es wird vermutet, dass die intermolekularen Disulfidbrücken zwischen den pestiviralen Glykoproteinen eine Stabilisierung der Dimere bewirken und damit auch die Grundlage für die Säureresistenz von Pestiviren bilden. Diese Hypothese wurde dadurch bestätigt, dass die Verbindung von niedrigem pH mit der Anwesenheit von Reduktionsmitteln zu einer deutlichen Verminderung der Säureresistenz und darüber hinaus auch zu einer „fusion from without“ an der Zellmembran führte (KREY et al. 2005). Daraus resultierend geht man momentan von einer Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücken in den pestiviralen Glykoproteinen während des Invasionsprozesses aus. Erst diese Destabilisierung ermöglicht die säureabhängige Konformationsänderung im pestiviralen Fusionsprotein. Die Identität der Isomeraseaktivität ist bislang unbekannt, interessanterweise wurde beim murinen Leukämievirus eine virale Disulfidisomeraseaktivität charakterisiert, deren aktives Zentrum ein CXXC-Motiv im Glykoprotein bildet (WALLIN et al. 2004). Bemerkenswerterweise ist ein solches

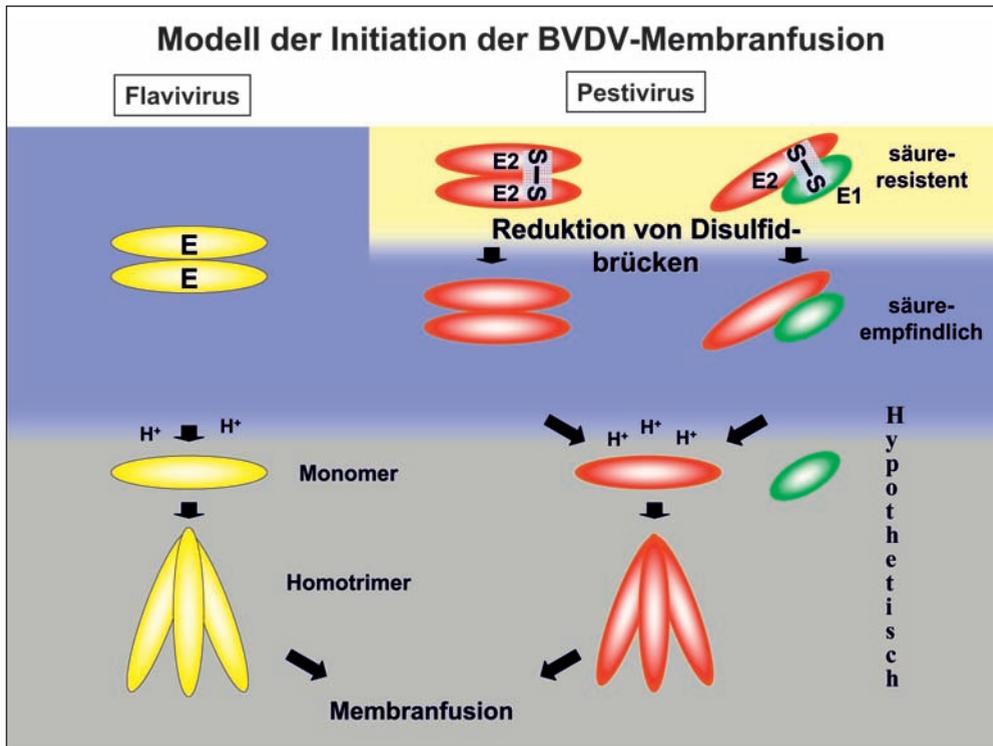


Abb. 4 Schema der Aktivierung flavi- und pestiviraler Fusionsproteine durch endosomale Azidifizierung. Das im reifen Flavivirus vorkommende E-Protein-Homodimer (gelb) ist säureempfindlich, dissoziiert als Reaktion auf den sauren pH und exponiert dabei das hydrophobe Fusionspeptid. Dieses interagiert mit der Zielmembran, und im sauren Milieu kann daraufhin eine irreversible Homotrimerisierung zur fusionsaktiven Form des E-Proteins beobachtet werden. Im Gegensatz zu Flaviviren werden die pestiviralen Glykoproteine durch intra- bzw. intermolekulare Disulfidbrücken stabilisiert und sind säureresistent. Sie gehen erst nach Reduktion bestimmter Disulfidbrücken in einen säureempfindlichen Zustand über. In Analogie zu Flaviviren wird bei endosomaler Azidifizierung eine Dissoziation der Glykoproteine mit darauffolgender Homotrimerisierung des Fusionsproteins vermutet.

CXXC-Motiv auch im pestiviralen E2 vorhanden. Kürzlich wurde eine auffallend ähnliche Säureresistenz auch für das mit Pestiviren verwandte Hepatitis-C-Virus des Menschen beschrieben (TSCHERNE et al. 2006). Hierbei ist beachtenswert, das HCV wahrscheinlich keine disulfidverbrückten E1-E2-Heterodimere enthält.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Infektionsweg von BVDV zwar weitgehend entschlüsselt ist, eine Reihe von Details aber noch der Aufklärung bedürfen. Die wichtigste Frage richtet sich auf die Identität und Funktion eines postulierten Corezeptors, der für eine CD46-unabhängige Infektion verantwortlich ist. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass ein solches Molekül existiert und vermutlich von allen Pestiviren verwendet wird. Möglicherweise liegt hier der Schlüssel für die Spezies- bzw. Ordnungsspezifität von Pestiviren. Nach Bin-

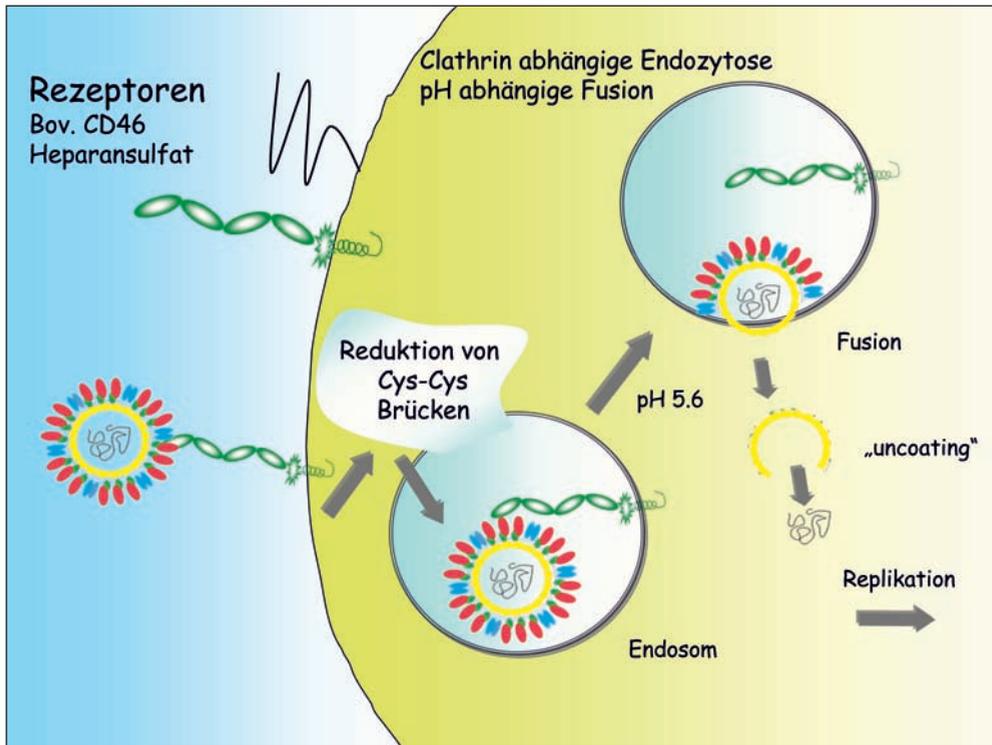


Abb. 5 Schematische Synopse der BVDV-Infektion der Wirtszelle

dung an den Rezeptor nimmt BVDV den gleichen Infektionsweg wie Flavi- und Alphaviren, weist jedoch wichtige Unterschiede im Detail auf (Abb. 5).

Dies ist nicht verwunderlich, müssen doch BVDV und andere Pestiviren außerhalb des Wirtes „überleben“, während z. B. Flaviviren durch Arthropoden übertragen werden, ohne ihre Infektiosität durch Umweltfaktoren zu gefährden. BVDV und andere Pestiviren haben eine einzigartige Strategie entwickelt, durch eine Kombination von akuter und persistierender Infektion in der Population präsent zu bleiben. Das Verständnis dieser Zusammenhänge ist eine wichtige Grundlage für eine rationale Bekämpfung von BVDV und anderen Pestiviren.

Dank

Die Arbeiten wurden durch den SFB 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ gefördert.

Literatur

- ADAMS, E. M., BROWN, M. C., NUNGE, M., KRYCH, M., and ATKINSON, J. P.: Contribution of the repeating domains of membrane cofactor protein (CD46) of the complement system to ligand binding and cofactor activity. *J. Immunol.* 147, 3005–3011 (1991)
- AGNELLO, V., ABEL, G., ELFAHAL, M., KNIGHT, G. B., and ZHANG, Q. X.: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12766–12771 (1999)

- BRESSANELLI, S., STIASNY, K., ALLISON, S. L., STURA, E. A., DUQUERROY, S., LESCAR, J., HEINZ, F. X., and REY, F. A.: Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 23, 728–738 (2004)
- BUCHHOLZ, C. J., KOLLER, D., DEVAUX, P., MUMENTHALER, C., SCHNEIDER-SCHAULIES, J., BRAUN, W., GERLIER, D., and CATTANEO, R.: Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J. Biol. Chem.* 272, 22072–22079 (1997)
- CASASNOVAS, J. M., LARVIE, M., and STEHLE, T.: Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *EMBO J.* 18, 2911–2922 (1999)
- CATTANEO, R.: Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J. Virol.* 78, 4385–4388 (2004)
- COLLETT, M. S., WISKERCHEN, M., WELNIAK, E., and BELZER, S. K.: Bovine viral diarrhoea virus genomic organization. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 19–27 (1991)
- DAMKE, H., BABA, T., WARNOCK, D. E., and SCHMID, S. L.: Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* 127, 915–934 (1994)
- DEPNER, K., BAUER, T., and LIESS, B.: Thermal and pH stability of pestiviruses. *Rev. Sci. Tech.* 11, 885–893 (1992)
- DORIG, R. E., MARCIL, A., CHOPRA, A., and RICHARDSON, C. D.: The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75, 295–305 (1993)
- DURANTEL, D., BRANZA-NICHITA, N., CARROUEE-DURANTEL, S., BUTTERS, T. D., DWEK, R. A., and ZITZMANN, N.: Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 75, 8987–8998 (2001)
- FLORES, E. F., and DONIS, R. O.: Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus infection due to a block in viral entry. *Virology* 208, 565–575 (1995)
- GAGGAR, A., SHAYAKHMETOV, D. M., and LIEBER, A.: CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature Med.* 9, 1408–1412 (2003)
- GAGGAR, A., SHAYAKHMETOV, D. M., LISZEWSKI, M. K., ATKINSON, J. P., and LIEBER, A.: Localization of regions in CD46 that interact with adenovirus. *J. Virol.* 79, 7503–7513 (2005)
- GARRY, R. F., and DASH, S.: Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* 307, 255–265 (2003)
- GIBBONS, D. L., VANEY, M. C., ROUSSEL, A., VIGOUROUX, A., REILLY, B., LEPAULT, J., KIELIAN, M., and REY, F. A.: Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature* 427, 320–325 (2004)
- HEINZ, F. X., and ALLISON, S. L.: Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv. Virus Res.* 55, 231–269 (2000)
- HULST, M. M., GENNIP, H. G. VAN, VLOT, A. C., SCHOOTEN, E., SMIT, A. J. DE, and MOORMANN, R. J.: Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J. Virol.* 75, 9585–9595 (2001)
- IQBAL, M., FLICK-SMITH, H., and MCCAULEY, J. W.: Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.* 81, 451–459 (2000)
- IQBAL, M., and MCCAULEY, J. W.: Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E(rns) of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. *J. Gen. Virol.* 83, 2153–2159 (2002)
- JOHNSTONE, R. W., LOVELAND, B. E., and MCKENZIE, I. F.: Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology* 79, 341–347 (1993)
- KASZA, L., SHADDUCK, J. A., and CHRISTOFINIS, G. J.: Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. *Res. Vet. Sci.* 13, 46–51 (1972)
- KIELIAN, M., CHATTERJEE, P. K., GIBBONS, D. L., and LU, Y. E.: Specific roles for lipids in virus fusion and exit. Examples from the alphaviruses. *Subcell. Biochem.* 34, 409–455 (2000)
- KREY, T., HIMMELREICH, A., HEIMANN, M., MENGE, C., THIEL, H.-J., MAURER, K., and RÜMENAPF, T.: Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *J. Virol.* 80, 3912–3922 (T. K. and A. H. contributed equally to this work) (2006a)
- KREY, T., MOUSSAY, E., THIEL, H. J., and RÜMENAPF, T.: Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 80/21, 10862–10867 (2006b)
- KREY, T., THIEL, H.-J., and RÜMENAPF, T.: Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J. Virol.* 79, 4191–4200 (2005)
- LAZAR, C., ZITZMANN, N., DWEK, R. A., and BRANZA-NICHITA, N.: The pestivirus E(rns) glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology* 314, 696–705 (2003)
- LECOT, S., BELOUZARD, S., DUBUISSON, J., and ROUILLE, Y.: Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 79, 10826–10829 (2005)

- LESCAR, J., ROUSSEL, A., WIEN, M. W., NAVAZA, J., FULLER, S. D., WENGLER, G., and REY, F. A.: The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105, 137–148 (2001)
- LISZEWSKI, M. K., POST, T. W., and ATKINSON, J. P.: Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 431–455 (1991)
- MARSH, M., and HELENIUS, A.: Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* 36, 107–151 (1989)
- MAURER, K., KREY, T., MOENNIG, V., THIEL, H.-J., and RÜMENAPF, T.: CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 78, 1792–1799 (2004)
- MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., and HARRISON, S. C.: Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313–319 (2004)
- MOENNIG, V., and PLAGEMANN, P. G.: The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 41, 53–98 (1992)
- MORI, Y., SEYA, T., HUANG, H. L., AKKAPAIBOON, P., DHEPAKSON, P., and YAMANISHI, K.: Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* 76, 6750–6761 (2002)
- NaNICHE, D., VARIOR-KRISHNAN, G., CERVONI, F., WILD, T. F., ROSSI, B., RABOURDIN-COMBE, C., and GERLIER, D.: Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* 67, 6025–6032 (1993)
- REY, F. A., HEINZ, F. X., MANDL, C., KUNZ, C., and HARRISON, S. C.: The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291–298 (1995)
- RICE, C. M.: Flaviviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., and HOWLEY, P. M. (Eds.): *Fields Virology*. 3rd ed. Vol. 1, pp. 931–959. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996
- SANTORO, F., GREENSTONE, H. L., INSINGA, A., LISZEWSKI, M. K., ATKINSON, J. P., LUSO, P., and BERGER, E. A.: Interaction of glycoprotein H of human herpesvirus 6 with the cellular receptor CD46. *J. Biol. Chem.* 278, 25964–25969 (2003)
- SANTORO, F., KENNEDY, P. E., LOCATELLI, G., MALNATI, M. S., BERGER, E. A., and LUSO, P.: CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99, 817–827 (1999)
- SCHHELP, C., GREISER-WILKE, I., and MOENNIG, V.: An actin-binding protein is involved in pestivirus entry into bovine cells. *Virus Res.* 68, 1–5 (2000)
- SIRENA, D., LILIENTHAL, B., EISENHUT, M., KALIN, S., BOUCKE, K., BEERLI, R. R., VOGT, L., RUEDL, C., BACHMANN, M. F., GREBER, U. F., and HEMMI, S.: The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.* 78, 4454–4462 (2004)
- SKEHEL, J. J., and WILEY, D. C.: Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–569 (2000)
- SMITH, A. E., and HELENIUS, A.: How viruses enter animal cells. *Science* 304, 237–242 (2004)
- THIEL, H.-J., STARK, R., WEILAND, E., RÜMENAPF, T., and MEYERS, G.: Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* 65, 4705–4712 (1991)
- THIEL, H.-J., and MOENNIG, P. P.: Pestiviruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., and HOWLEY, P. M. (Eds.): *Fields Virology*. 3rd ed. Vol. 1, pp. 1059–1069. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996
- TSCHERNE, D. M., JONES, C. T., EVANS, M. J., LINDENBACH, B. D., MCKEATING, J. A., and RICE, C. M.: Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J. Virol.* 80, 1734–1741 (2006)
- WALLIN, M., EKSTROM, M., and GAROFF, H.: Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *EMBO J.* 23, 54–65 (2004)
- WEILAND, E., STARK, R., HAAS, B., RÜMENAPF, T., MEYERS, G., and THIEL, H.-J.: Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.* 64, 3563–3569 (1990)
- WU, E., TRAUER, S. A., PACHE, L., MULLEN, T. M., SEGGERN, D. J. VON, SIUZDAK, G., and NEMEROW, G. R.: Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J. Virol.* 78, 3897–3905 (2004)

Prof. Dr. Till RÜMENAPF
Dr. Thomas KREY
Institut für Virologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
Frankfurter Straße 107
35392 Gießen
Bundesrepublik Deutschland

Tel.: +49 641 9938356
Fax: +49 641 9938359
E-Mail: Till.H.Ruemenapf@vetmed.uni-giessen.de

Reproduktionsmedizin in Klinik und Forschung: Der Status des Embryos

Leopoldina-Symposium

vom 17. bis 18. November 2006 in Lübeck

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 96, Nr. 354

Herausgegeben von Klaus DIEDRICH (Lübeck), Hermann HEPP (München) und

Sören VON OTTE (Lübeck)

(2007, 248 Seiten, 11 Abbildungen, 10 Tabellen, 24,95 Euro,

ISBN-13: 978-3-8047-2426-6)

Unerfüllter Kinderwunsch wird zunehmend zu einem sozialen und medizinischen Problem unserer Zeit. Seit der Geburt des ersten *in vitro* gezeugten Kindes vor fast 30 Jahren sind weltweit inzwischen mehr als drei Millionen „Retorten-Babys“ geboren worden. *In vitro*-Fertilisation und Embryotransfer wurden zur Grundlage für die weitere Entwicklung diagnostischer und intervenierender Methoden der Reproduktionsmedizin. Mit Beginn der 1990er Jahre wandelten sich Indikations- und Methodenspektrum der assistierten Reproduktion erneut erheblich. So wurden international z. B. die intrazytoplasmatische Spermatozoeninjektion und die Präimplantationsdiagnostik möglich. Für die Reproduktionsmedizin in Klinik und Forschung besitzt der Status des Embryos eine besondere Bedeutung. Damit ist eine Vielzahl von ethischen und juristischen Fragen (z. B. Embryonenschutzgesetz, zukünftiges Fortpflanzungsmedizingesetz) verbunden. Der Band verdeutlicht das Spektrum der medizinischen Methoden und ethisch-juristischen Problemfelder und liefert sowohl Ärzten als auch ratsuchenden Patienten einen umfassenden Überblick zu den Möglichkeiten und Grenzen der modernen Reproduktionsmedizin.

In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

BVD-Virus: Umgehung der angeborenen Immunabwehr als Voraussetzung für Immuntoleranz und Viruspersistenz

Ernst PETERHANS, Philippe MÄTZENER, Ioannis MAGKOURAS,
Hanspeter STALDER, Thomas JUNGI und Matthias SCHWEIZER (Bern)

Mit 1 Abbildung und 1 Tabelle

Zusammenfassung

Gegenüber den *transienten* sind *persistierende* Infektionen mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) selten, sie stellen aber die Viruspersistenz in der Rinderpopulation sicher. Einzigartig bei der persistierenden Infektion ist die gegenüber dem infizierenden Virusstamm hochspezifische Immuntoleranz. Neben der Toleranz des adaptiven Immunsystems stellt sich die Frage, wie das sogenannte angeborene, native Immunsystem auf BVDV reagiert. Ein in der Abwehr von Virusinfektionen wichtiger nativer Mechanismus ist Interferon Typ I (IFN). Dieser Virushemmstoff wird durch infizierte Zellen gebildet („Induktion“) und kann nach Bindung an nicht infizierte Zellen einen antiviralen Zustand hervorrufen („Wirkung“). Wir konnten zeigen, dass zytopathogenes (zp) BVDV in Rindermakrophagen die Bildung von IFN induziert, während das nicht zytopathogene (nzp) BVDV die Zellen nicht zur IFN-Bildung anregt. Einmal mit nzp BVDV infiziert, sind die Zellen refraktär auf die IFN-Induktion durch doppelsträngige RNA, welche ein sehr potentes Signal für die Bildung des Virushemmstoffs ist. Nicht infizierte Zellen wurden durch Zugabe von IFN geschützt. Wurde IFN hingegen zu bereits mit nzp BVDV infizierten Zellen gegeben, so konnte der Virushemmstoff das Virus auch nach 10 Zellpassagen nicht eliminieren. Erstaunlicherweise wurden hingegen die persistent BVDV-infizierten Zellen durch IFN vor einer Infektion mit anderen Viren geschützt. Dies zeigt erstmals, dass auf dem Niveau einer einzelnen Zelle bei der IFN-Wirkung unterschieden wird zwischen einem bereits in der Zelle vorhandenen Virus (BVDV) und viralen „Neuankömmlingen“, indem IFN seine Wirkung nur gegen letztere entfaltet. Die Aktivierung der nativen Immunantwort ist eine Vorbedingung zur Auslösung einer adaptiven Immunantwort. Die fehlende Induktion von Interferon durch das nzp BVDV könnte entscheidend sein für die Etablierung der persistenten Infektion im Fötus, indem das Virus während der kritischen Phase der fötalen Entwicklung nicht eliminiert wird und dadurch mit dem Virus reagierende T- und B-Zellen aus dem Repertoire entfernt werden. Die fehlende Eliminierung aus persistent infizierten Zellen durch IFN stellt sicher, dass das BVDV bei Infektionen durch andere Viren (welche die Bildung von IFN anregen) nicht aus seinem Wirt eliminiert wird. Andererseits werden auch BVDV-infizierte Zellen durch IFN vor einer Infektion mit anderen Viren geschützt. Letztlich profitiert BVDV davon, dass sein Wirt trotz der persistenten Infektion durch IFN vor anderen Virusinfektionen geschützt werden kann – auch für BVDV gilt der Grundsatz: „Ein toter Wirt ist kein guter Wirt.“

Abstract

Persistent BVDV infections, even though rare in comparison with transient BVDV infections, ensure viral persistence within a herd of cattle. Persistent infection is characterized by a unique and highly specific immunotolerance to the infecting viral strain. Quite apart from the tolerance shown by the adaptive immune system there arises the question of how the so-called innate immune system reacts to BVDV. Interferon type I (IFN) is an important mechanism in the fight against viral infections. IFN is made by infected cells (induction) and can generate an antiviral state after attachment to non-infected cells (effect or action). We showed that in bovine macrophages, cytopathic (cp) BVDV induces IFN whereas non-cytopathic (ncp) BVDV does not. Once cells have been infected with ncp BVDV, double-stranded RNA (a very strong signal for the induction of IFN) fails to stimulate the synthesis of IFN. IFN was thus shown to protect as yet uninfected cells from infection with BVDV. When, however, IFN was added to ncp BVDV infected cells it was not able to eliminate the virus even after 10 cell passages. Astonishingly, IFN protected persistent BVDV-infected cells from infection with other viruses. This demonstrates, for the first time, that at the single

cell level IFN distinguishes between a virus (BVDV) that already exists in the cell and viral “newcomers” – IFN only has an effect on the latter. The activation of a native immune reaction is a prerequisite to triggering an adaptive immune response. A lack of interferon induction by ncp BVDV may well be a decisive factor in establishing persistent infection in the fetus, as during the critical phase of fetal development the virus is not eliminated and thus the T and B cells that would have reacted with the virus are dropped from the repertoire. The lack of elimination by IFN from persistently infected cells ensures that BVDV is not eliminated from its host if that host becomes infected with other viruses (that induce the production of IFN). On the other hand, IFN protects BVDV infected cells from infection with other viruses. In the last analysis, BVDV profits from protection by IFN from other viral infections despite its host’s persistent infection – the motto “a dead host is a bad host” also applies to BVDV.

1. Einleitung

Um erfolgreich zu sein, müssen sich Viren in der Wirtspopulation auf Dauer etablieren. Dies erreichen sie, indem sie entweder von Wirt zu Wirt springen oder aber in einzelnen Wirten persistieren (HILLEMANN 2004). Die erste Strategie ist nur erfolgreich, wenn eine genügende Dichte von empfänglichen Wirten zur Verfügung steht und die Infektion effizient weitergegeben wird. Weil sich diese Infektionen in einer empfänglichen Population ähnlich wie eine Welle ausbreiten, nennt man sie auch „Hit and Run“-Infektionen. Nach dem „Hit“ sind die Wirte tot, wie bei der sylvatischen Tollwut der Füchse, oder aber immun, wie bei Röteln bei Menschen (akut-transiente Infektion). Die zweite Strategie, „Infect and Persist“, gründet auf der Persistenz in den Wirten. Die Persistenz in den Wirten ist geeignet für Situationen, in welchen wegen einer ungenügenden Dichte oder zu geringem Kontakt mit empfänglichen neuen Wirten eine „Hit and Run“-Strategie versagen würde.

Das BVD-Virus ist mit seiner weltweiten Verbreitung und hohen Inzidenz zweifellos eines der erfolgreichsten Pathogene im Rinderbestand. Die Infektion mit dem BVD-Virus entzieht sich dem einfachen Schema von „Hit and Run“ und „Infect and Persist“ gleich in mehrerer Hinsicht. Zum einen ist dieses Virus in der Lage, beide Arten von Infektionen zu verursachen, zum anderen ist die persistente Infektion mit einer Immuntoleranz gegen das infizierende Virus verbunden. Die persistente BVDV-Infektion unterscheidet sich durch die Immuntoleranz von allen anderen persistenten Infektionen, indem das Virus auf keine der nachfolgend dargestellten Mechanismen zur Evasion vor dem Immunsystem angewiesen ist, sondern vielmehr durch dieses vollständig toleriert wird. In diesem Artikel werden die Strategien von „Infect and Persist“-Infektionen in knapper Form dargestellt und anschließend neue Erkenntnisse über die Rolle des unspezifischen Immunsystems bei der persistenten BVDV-Infektion diskutiert.

2. Das Immunsystem: spezifisch und unpezifisch

Man unterscheidet zwischen der „spezifischen“ Immunität und den „unspezifischen“ Mechanismen des Immunsystems (OPPENHEIM und YANG 2005). Zur spezifischen Immunität (auch „adaptiv“ genannt) werden als Effektormechanismen Antikörper und zytotoxische Lymphozyten gezählt, unter dem Begriff der unspezifischen Immunität werden sehr unterschiedliche Mechanismen wie Komplement, Fieber und Akut-Phase-Proteine zusammengefasst (ABBAS und LICHTMAN 2005b). Ebenfalls zu diesen Mechanismen gezählt wird das Interferon vom Typ I (IFN-I), ein Virushemmstoff, der von infizierten Zellen abgegeben wird und nicht infizierte Zellen vor einer Virusinfektion schützen kann (Übersicht bei HALLER et al. 2006,

WEBER et al. 2004). Bei den Mechanismen der persistenten Infektionen stand über lange Zeit die Interaktion der Viren mit der spezifischen Immunität im Zentrum des Interesses. Ein Grund dafür war die Beobachtung, dass eine Infektion mit Viren aus dieser Gruppe zwar eine Immunantwort auslöst, dass diese aber nicht imstande ist, das Virus aus dem Körper zu eliminieren. Ins Auge springt diese Eigenheit auch, weil gegen viele dieser Viren keine oder nur beschränkt wirksame Vakzinen existieren. Aus diesem Grund befasst man sich intensiv mit der Frage, wie diese Viren eine effiziente Immunabwehr verhindern. Das bekannteste Beispiel dafür ist HIV, welches die adaptive Immunabwehr mit einer verwirrenden Fülle von Tricks in die Irre führt (JOSEPH et al. 2005). Dazu zählt die Antigenvariation im infizierten Wirt, die Präsentation von immunogenen, aber für den Schutz irrelevanten Antigenstrukturen und die Maskierung von Epitopen, welche für die Neutralisation des Virus durch Antikörper wichtig sind (MANRUBIA et al. 2005). Verschiedene Viren haben auch Mechanismen gegen die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen entwickelt. Die zytotoxischen T-Zellen sind imstande, auf der Zelloberfläche durch Histokompatibilitätsantigene der Klasse I präsentierte, kurze virale Peptide zu erkennen und infizierte Zellen abzutöten. Diese Peptide stammen von Virusproteinen, welche durch Proteasen der Wirtszelle gespalten und anschließend mit den Histokompatibilitätsantigenen an die Zelloberfläche transportiert werden. Einige Viren blockieren den Transport der Peptide in das endoplasmatische Retikulum, eine Voraussetzung zur Präsentation auf der Zelloberfläche. Andere wiederum vermindern die Expression der Histokompatibilitätsantigene auf der Zelloberfläche, wodurch auch die Erkennung der Viruspeptide herabgesetzt ist (ALLEN et al. 2005).

Interessant ist der Umstand, dass die schon beinahe Chamäleon-artige Variation in einem infizierten Wirt nur bei RNA-Viren beobachtet wird, weil die Fehlerrate bei der Genomreplikation oder der Synthese der in Protein umsetzbaren RNA nur bei diesen Wirten zu beobachten ist. Aber auch DNA-Viren verfügen über ein eindrückliches Armamentarium, um mit ihrem Wirt eine Liaison auf Dauer einzugehen. Der wichtigste Mechanismus besteht darin, sich dem Immunsystem des Wirts nicht zu zeigen. Herpesviren erreichen dies, indem sie sich nach der ersten Phase der Infektion in die Latenz begeben, während der die virale DNA in episomaler Form im Kern persistiert. Weil das Virus in Ganglien latent vorhanden sein kann, unterscheiden sich die klinischen Erscheinungen bei einer Reaktivierung markant von der ersten Phase der Infektion (z. B. Windpocken zuerst und Gürtelrose bei Reaktivierung). Eine andere Form des Versteckens wird bei Papillomaviren beobachtet, die auf der Oberfläche von Warzen abgegeben werden, welche für das Immunsystem unerreichbar ist.

Seit einiger Zeit ist in der Forschung ein Trend hin zum sogenannten „unspezifischen“ Immunsystem festzustellen. Neben den weiter oben erwähnten Teilen des nativen Immunsystems entdeckte man im Lauf der Zeit ein ganzes Netzwerk von löslichen Mediatoren, welche die adaptive Immunantwort aktivieren und steuern (MANTOVANI et al. 2004, ABBAS und LICHTMAN 2005a). Neben der Interaktion durch die löslichen Zytokine tauschen Zellen auch durch direkten Kontakt untereinander Signale aus. Die Spezifität der Interaktion wird sichergestellt, indem auf der Zelloberfläche lokalisierte Liganden einer Zelle I an Oberflächenrezeptoren einer Zelle II binden, wodurch in dieser Zelle Signale ausgelöst werden, welche zur Expression spezifischer Gene oder zu einer Aktivierung von Effektormechanismen führen (WUCHERPFENNIG 2005, ABBAS und LICHTMAN 2005a). Zu den Zytokinen zählen neben den Interferonen insbesondere die Interleukine. Von letzteren kennt man inzwischen über 100, und laufend kommen neue zu dieser Liste hinzu (ABBAS und LICHTMAN 2005a). Da gewisse Zytokine die Effizienz der spezifischen Immunantwort steigern können, wird versucht,

entsprechende Zytokine direkt, oder als deren Gen, in neuartige Impfstoffe einzuschließen (AMLIE-LEFOND et al. 2005).

Die Induktion einer spezifischen Immunantwort braucht Zeit – virusspezifische Antikörper lassen sich im Blut erst eine bis zwei Wochen nach dem ersten Kontakt mit einem Virus feststellen. Diesbezüglich blieb eine Frage lange Zeit unbeantwortet: Wie erkennt das Immunsystem ein Virus, mit welchem es vorher noch nie in Kontakt gekommen ist? Diese Frage ist in den letzten Jahren in ihren Grundzügen beantwortet worden. Ein Meilenstein in der immunologischen Forschung war die Entdeckung, dass das „unspezifische“ Immunsystem in der Frühphase der Interaktion mit Infektionserregern durch chemische Strukturen alarmiert wird, welche mit den Pathogenen direkt verbunden sind oder aber während deren Vermehrung gebildet werden. Für die mit den Pathogenen verbundenen Strukturen hat sich der Begriff „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) durchgesetzt. Daneben rufen Pathogene in ihren Wirten Veränderungen hervor, die als „Gefahrensignale“ bezeichnet werden, häufig auch mit dem englischen Begriff „danger signal“. Das angeborene Immunsystem verfügt über Rezeptoren, mit welchen es die Anwesenheit von Pathogenen aufgrund von PAMPs und Gefahrensignalen erkennen kann. Neben „Pattern Recognition Receptors“ an der Zelloberfläche kennt man auch solche, die intrazellulär, z. B. in Endosomen und im Zytoplasma, lokalisiert sind. Intensiv erforscht werden insbesondere die „Toll-ähnlichen“ Rezeptoren (TLR für „Toll-like receptors“). Bei Säugern vermögen etwa 10 TLR das ganze Spektrum von PAMPs abzudecken (Tab. 1; FRITZ und GIRARDIN 2005, FROY 2005, NETEA et al. 2004, OPPENHEIM und YANG 2005). Das Engagement dieser TLR löst eine charakteristische Signaltransduktionskaskade aus. Diese mündet in verschiedene Effektorfunktionen, z. B. Sekretion von Zytokinen. In den dendritischen Zellen, die reich mit TLR bestückt sind, löst das Engagement von TLR einen Reifungsschub aus, der eine spezifische Immunantwort in Gang setzt.

Wenn der Körper mit PAMPs in hohen Dosen konfrontiert wird, kann dies dramatische oder sogar lebensbedrohende Effekte auslösen. Bekannt ist vor allem der durch Gram-negative Bakterien ausgelöste Schockzustand. Das dafür verantwortliche PAMP ist ein Endotoxin, ein Zellwandbestandteil dieser Bakterien (BEUTLER 2003, 2004).

Das für die Alarmierung des Immunsystems durch Viren wohl wichtigste Signal stellt die *doppelsträngige RNA* dar (dsRNA), welche bei der Vermehrung des Virusgenoms gebildet wird. Die dsRNA wird erkannt durch Rezeptoren, welche im Zytoplasma oder auf der Zelloberfläche und in Endosomen lokalisiert sind. Die Bindung der dsRNA an diese Rezeptoren löst in allen Körperzellen die Bildung von Interferon aus (SAMUEL 2001) (Abb. 1). Interferon wurde vor 50 Jahren im Zusammenhang mit seiner antiviralen Wirkung entdeckt (ISAACS und LINDEMANN 1957). Inzwischen kennt man zwei Klassen von Interferonen (I und II), wobei diese an unterschiedliche Rezeptoren binden und auch ein unterschiedliches Wirkspektrum besitzen. Klasse-II-Interferon (Interferon- γ) wird wegen seiner Herkunft aus Lymphozyten und aktivierenden Wirkung auf Makrophagen auch als Immuninterferon bezeichnet. Klasse-I-Interferone stellen nach wie vor den wichtigsten Abwehrmechanismus gegen Virusinfektionen auf der Stufe der einzelnen Zelle dar. Zu den wichtigsten zählen Interferon- α -, β -, τ und ω (HALLER et al. 2006, WEBER et al. 2004).

Im Folgenden konzentrieren wir uns auf die Klasse-I-Interferone. Man unterscheidet zwischen der *Induktion* und der *Wirkung* der Interferone. Obwohl in ihrer Herkunft und dem Mechanismus der Induktion unterschiedlich, rufen alle Vertreter der Klasse-I-Interferone nach der Bindung an den gemeinsamen Rezeptor einen antiviralen Zustand hervor. In Abbildung 1 ist die Induktion von Interferon- β in **Zelle I**, und die Wirkung in **Zelle II** dargestellt. Das

Tab. 1 Toll-ähnliche Rezeptoren und ihre Liganden (adaptiert von AKIRA und TAKEDA 2004, BEUTLER 2003, SIOUD 2006).

TLR	Ligand	Herkunft
1/2 ^[1]	Triacylierte Lipopeptide	Bakterien
2	Lipoproteine Peptidoglycan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Zymosan Virusprotein	Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mykobakterien Pilze Viren (Herpes, Cytomegalovirus)
3	Doppelsträngige (ds) RNA Poly(IC) Einzelsträngige (ss) RNA mit Sekundärstruktur	Viren synthetisches dsRNA-Surrogat Viren
4	LPS Fusionsprotein Taxol Verschiedene Wirtsproteine	Gram-negative Bakterien Respiratorisches Syncytialvirus Pflanzen Wirt (endogen)
5	Flagellin	Bakterien
6/2 ^[1]	Diacylierte Lipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	Mykoplasmen Gram-positive Bakterien Pilze
7	Einzelsträngige (ss) RNA Imidazoquinoline	Viren synthetische Substanzen, z. B. R848
8	Einzelsträngige (ss) RNA	
9	Nicht-methylierte CpG DNA	Bakterien, Viren
10 ^[2]	unbekannt	unbekannt
11 ^[3]	unbekannt	Uropathogene Bakterien
12, 13 ^[3]	unbekannt	unbekannt

[1] Heterodimer

[2] TLR-10 exprimiert im Mensch, nicht in der Maus

[3] TLR-11, -12, und -13 exprimiert in der Maus, nicht im Mensch

Alarmsignal für die Vermehrung eines Virus – dsRNA – bindet an die dsRNA-Rezeptoren und löst auf dem Weg einer komplexen Signaltransduktion die Expression der mRNA für Interferon aus. Nach der Translation der Interferon-mRNA wird das neu gebildete Interferonprotein von infizierten Zellen in die Umgebung abgegeben. Interferon selbst wirkt nicht antiviral, sondern löst nach Bindung an den Klasse-I-Interferon-Rezeptor einen antiviralen Zustand aus. Für den Schutz vor einer Virusinfektion ist eine große Anzahl von Genprodukten verantwortlich, deren Bildung durch Interferon ausgelöst wird. Von einigen der über

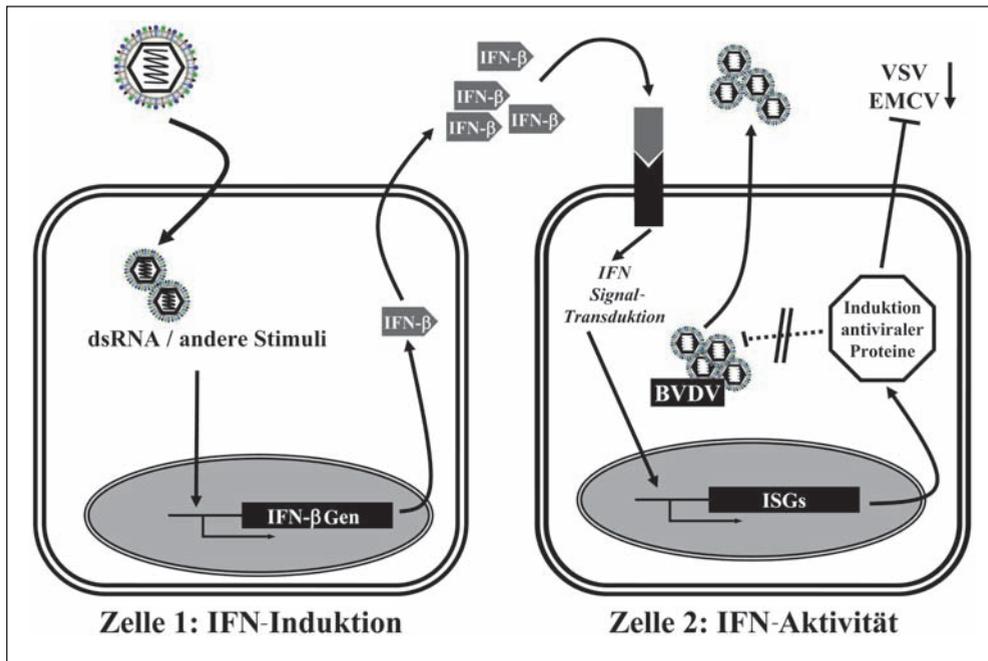


Abb. 1 Unterscheidung von „selbst“ und „nicht-selbst“ in der Aktivität von Interferon durch das BVD-Virus. In der Biologie von Interferon kann unterschieden werden zwischen der Induktion und der Aktivität. Doppelsträngige RNA oder andere mit der Virusvermehrung einhergehende „PAMPs“ (Pathogen-Associated Molecular Patterns) lösen über die entsprechenden Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors) die Transkription und anschließende Translation von Interferon-β aus. Dieses Protein wird von der infizierten Zelle 1 sezerniert und bindet an Interferonrezeptoren auf der Oberfläche von nicht infizierten Zellen (dargestellt als Zelle 2). Dadurch wird eine Signaltransduktion ausgelöst, welche die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) und die Synthese der entsprechenden antiviralen Proteine zur Folge hat. Bereits in der Zelle 2 vorhandenes BVD-Virus ist resistent gegen die Wirkung dieser antiviralen Proteine; es interferiert aber nicht mit deren Schutzwirkung gegen andere Viren, welche seine Wirtszelle infizieren, z. B. das Vesikulärstomatitis- und das Encephalomyokarditis-Virus (VSV, resp. EMCV).

100 durch Interferon induzierten Proteine kennt man den Mechanismus der antiviralen Wirkung recht gut. Die wichtigsten antiviralen Proteine sind Mx, Oligo-Adenylat-Synthetase und Proteinkinase R. Die Mx-Proteine hemmen den Zusammenbau einer Gruppe von Viren, deren bekanntestes das Influenzavirus ist („Mx“ steht für „Orthomyxovirus“, dessen wichtigste Vertreter die Influenzaviren sind). Die Oligo-Adenylat-Synthetase stellt aus ATP kurze Ketten von Adenylat her, welche ihrerseits ein RNA-spaltendes Enzym, die RNase L aktivieren. Diese baut virale und auch zelluläre RNA ab. Die Proteinkinase R phosphoryliert einen Initiationsfaktor der Proteinsynthese, wodurch die Synthese von Proteinen stark gehemmt wird. Zusammen mit weiteren, durch Interferon induzierten Proteinen werden Zellen vor einer Virusinfektion geschützt (HALLER et al. 2006). Wie wichtig die Bildung und Wirkung von Interferon bei Virusinfektionen ist, lässt sich aus zwei Beobachtungen schließen: Fehlen die Interferon-I-Rezeptoren oder Elemente aus der nachfolgenden Signalkaskade, so können selbst üblicherweise harmlose Virusinfektionen tödlich verlaufen (SHRESTA et al. 2005). Die zweite Beobachtung ist, dass bisher ausnahmslos alle untersuchten Viren Proteine bilden, die entweder die Induktion von Interferon (Zelle I), oder aber dessen Wirkung (Zelle II) teilweise

hemmen (HALLER et al. 2006, WEBER et al. 2004). Die biologische Bedeutung der gegen Interferon gerichteten Virusproteine kann auch daraus ersehen werden, dass deren Inaktivierung zu einer deutlichen Attenuierung dieser Viren führt. Derart attenuierte Viren vermehren sich gut in Zellen, deren Interferonabwehr ebenfalls gentechnisch inaktiviert ist; sie sind hingegen in ihrer Vermehrung in Zellen mit intakter Interferonverteidigung stark eingeschränkt. Die Inaktivierung der gegen Interferon gerichteten viralen Abwehrmechanismen stellt deshalb einen möglichen neuen Weg bei der Entwicklung neuer attenuierter Impfstoffe dar. Beispiele dafür finden sich bei Influenza-A- (FERKO et al. 2004) und dem bovinen respiratorischen Syncytialvirus, BRSV (VALARCHER et al. 2003).

Für die virale Abwehr gegen Interferon sind in den meisten Fällen Nicht-Strukturproteine verantwortlich, d. h. von Viren codierte Proteine, welche nicht Bestandteil des Viruspartikels sind. Praktisch alle Schritte bei der *Induktion* wie auch der *Wirkung* von Interferon sind das Ziel solcher Virusproteine: das NS1-Protein der Influenza-A-Viren bindet dsRNA; die V-Proteine der Paramyxoviren interferieren auf der Stufe der Signaltransduktion mit der Etablierung des antiviralen Zustands, und Proteine unterschiedlicher Pockenviren fangen IFN ab, bevor es an seinen Rezeptor binden kann (Übersicht bei HALLER et al. 2006).

Eine neue Dimension gewinnen die viralen Abwehrstrategien gegen Interferone, wenn man den Zusammenhang zwischen diesen Zytokinen und dem adaptiven Immunsystem betrachtet. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass nicht nur das „Immuninterferon“ Interferon- γ , sondern auch die Klasse-I-Interferone bei der Aktivierung der spezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Wie wir gesehen haben, wird die Bildung von Interferon durch PAMPs oder „Gefahrensignale“ induziert. Zusammen mit der antiviralen Aktivität lösen deshalb diese Signale auch die spezifische – adaptive – Immunantwort aus (OPPENHEIM und YANG 2005). Der Zusammenhang zwischen der Induktion der IFN-Synthese durch Viren und der Rolle von Interferon bei der Aktivierung der spezifischen antiviralen Immunantwort erklärt auch, weshalb es für die Viren so wichtig ist, bereits zu Beginn der Interaktion mit dem Wirt die innate Immunantwort zu hemmen.

3. Interaktion des BVD-Virus mit seinen Wirten

Das BVDV gehört sowohl zur Gruppe „Hit and Run“ wie auch zu „Infect and Persist“. Die transiente Infektion durch BVD-Virus unterscheidet sich immunologisch kaum von anderen transienten Virusinfektionen – die Tiere serokonvertieren und sind anschließend immun gegen eine weitere Infektion mit BVD-Virus. Für die persistente Infektion hingegen hat das BVDV einen Weg gefunden, welcher das raffinierte Ausweichen vor der spezifischen Immunantwort überflüssig macht: Es infiziert seinen Wirt bereits in der Frühphase von dessen intrauteriner Entwicklung (ca. zweiter bis vierter Monat). Meist geschieht diese Infektion als Folge einer transienten Infektion der Mutter; in einigen Fällen ist aber bereits die Mutter persistent infiziert. Zu diesem frühen Zeitpunkt seiner Entwicklung ist das Immunsystem des Fötus noch unreif und entwickelt eine vollständige Toleranz gegenüber dem Virus. Diese Immuntoleranz hält für das ganze Leben des persistierten Tieres an.

Die Definition der immunologischen Toleranz betrifft allerdings nur das spezifische, adaptive Immunsystem. Das native Immunsystem wird in der Ontogenese bereits viel früher ausgebildet, was sich u. a. auch darin zeigt, dass Zellen aus einem frühen Fötus bereits in der Lage sind, auf eine Virusinfektion hin Interferon zu bilden (BRACKENBURY et al. 2005).

Wir haben vor einiger Zeit gezeigt, dass die zu einer persistenten Infektion befähigten nicht-zytopathogenen BVD-Viren in infizierten Wirtszellen keine IFN-Synthese anregen. Im Gegensatz dazu induzieren die zytopathogenen BVD-Viren in Rindermakrophagen die Bildung von Interferon (ADLER et al. 1997). Besonders interessant war der Befund, dass mit nicht-zytopathogenen BVD-Viren infizierte Zellen gegenüber dsRNA – dem stärksten Alarmsignal für eine Virusinfektion – vollständig resistent waren. Infizierte Zellen konnten selbst durch eine sehr hohe Dosis von dsRNA nicht zur Bildung von Interferon veranlasst werden und waren zudem auch vor dem durch dsRNA ausgelösten Zelltod geschützt. Beide Effekte waren von der Vermehrung des BVD-Virus abhängig, was auf einen aktiven, durch das Virus vermittelten Mechanismus hindeutet. Dieser Mechanismus ist spezifisch, indem die Zellen nur gegen den durch dsRNA, nicht aber durch andere Agenzien ausgelösten Zelltod geschützt waren (SCHWEIZER und PETERHANS 2001).

Als nächstes interessierte die Frage, ob BVD-Viren nicht nur die Induktion, sondern auch die Wirkung von Interferon beeinflussen. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Zellen zunächst mit Interferon vorbehandelt, und anschließend versuchten wir, die Zellen zu infizieren. Im Einklang mit früheren Befunden war die Vermehrung des BVD-Virus in Interferon-vorbehandelten Zellen gehemmt. Ganz anders war der Befund in Zellen, die zuerst infiziert und anschließend mit Interferon behandelt wurden. Jetzt hatten selbst hohe Konzentrationen von Interferon kaum einen Effekt auf die Virusvermehrung – und auch 10-maliges Passagieren von mit BVD-Virus infizierten Zellen in ständiger Anwesenheit von Interferon vermochte die Viren nicht aus den Zellen zu eliminieren. Da sich die Zellen bei jeder Passage mindestens einmal teilen, kann man aus diesem Experiment zwei Schlüsse ziehen. *Erstens*, einmal in der Zelle eingekistet, ist das BVD-Virus gegen die Wirkung von Interferon resistent. Und, *zweitens*, das BVD-Virus infiziert die Tochterzellen kaum über den extrazellulären Raum, sondern wird eher direkt als „Passagier“ mit den neu entstehenden Zellen weitergegeben. Kürzlich wurde berichtet, dass eine Behandlung mit hochdosiertem Interferon persistent infizierte Rinder nicht von der Infektion zu heilen vermag. Dies zeigt, dass das BVD-Virus *in vivo* ebenfalls resistent auf Interferon ist (PEEK et al. 2004).

Noch wesentlich interessanter war aber die nächste Beobachtung. Wie weiter oben dargestellt, induziert die Behandlung mit Interferon in den Zellen die Synthese von antiviralen Proteinen. Die Bildung dieser Proteine auf eine Behandlung mit Interferon hin zeigt an, dass sich in der Zelle ein antiviraler Zustand eingestellt hat. Wir fanden, dass nicht nur nicht infizierte, sondern auch mit BVD-Virus infizierte Zellen auf die Behandlung mit Interferon mit der Bildung des antiviralen Proteins Mx reagierten. Das nächste Experiment zeigte, dass solche Zellen auf die Behandlung mit Interferon nicht nur mit der Bildung eines antiviralen Proteins reagieren, sondern tatsächlich auch gegen eine Infektion mit anderen Viren geschützt waren. Als Testviren verwendeten wir das zu den Rhabdoviren zählende Vesikulärstomatitisvirus und das Encephalomyokarditisvirus, ein Picornavirus. Aus zellbiologischer Sicht ist dieser Befund sehr bemerkenswert – er zeigt erstmals, dass in einer einzelnen Zelle ein intaktes, durch Interferon hervorgerufenen antivirales System existieren kann, auch wenn in dieser Zelle sich ein Virus vermehrt, dem der antivirale Zustand nichts anhaben kann. Im Zusammenhang mit dem adaptiven Immunsystem spricht man oft von der Unterscheidung von „selbst“ und „nicht-selbst“, wobei mit letzterem zumeist Infektionserreger oder transplantiertes Gewebe von einem genetisch unterschiedlichen Individuum gemeint ist. Auf die Situation eines sich in einer Zelle vermehrenden BVD-Virus bezogen, könnte man hier einen Vergleich anstellen – das sich in der Zelle vermehrende BVD-Virus wäre „selbst“ und das die Zelle neu infizierende

zweite Virus wäre „nicht-selbst“. Dem Virus „selbst“ kann das Interferon nichts anhaben – es schützt aber gegen das Virus „nicht-selbst“. So betrachtet existiert die Unterscheidung zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ nicht nur beim spezifischen Immunsystem, sondern auch bei Interferon, einem wichtigen Element des innatens Immunsystems (SCHWEIZER et al. 2006)!

4. Welche Bedeutung haben diese Befunde für die persistente Infektion *in vivo*?

Wie bereits geschildert, sind persistent infizierte Tiere gegenüber „ihrem“ Virus immuntolerant. Das Virus ist in vielen Arten von Zellen vorhanden – so u. a. in T- und B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, aber auch in Epithelzellen in der Haut und in Haarwurzelzellen. Von den Leukozyten ist stets nur ein Anteil infiziert, und die Art der infizierten Leukozyten kann zwischen einzelnen persistent infizierten Tieren unterschiedlich sein. Wichtig ist aber, dass nie 100% einer bestimmten Zellart infiziert sind (SOPP et al. 1994, LIEBLER-TENORIO et al. 2003, QVIST et al. 1990). Bezogen auf das BVD-Virus kann deshalb ein persistent infiziertes Rind als eine Chimäre betrachtet werden – das Genom des immunologisch tolerierten Virus ist nur in einem Teil der Zellen vorhanden. Virusinfektionen sind bei Rindern recht häufig. Wird nun ein persistent BVD-Virus-infiziertes Tier mit einem anderen Virus infiziert, so könnten sowohl Zellen infiziert werden, die bereits mit BVD-Virus infiziert sind, wie auch solche, die das BVD-Virus nicht in sich tragen. Wie wir gesehen haben, wird kein Interferon von Zellen gebildet, in denen sich BVD-Virus vermehrt – es deutet aber nichts darauf hin, dass das BVD-Virus auch die Bildung von Interferon in Zellen hemmen kann, in welchen es selbst nicht vorhanden ist. Deshalb wäre sichergestellt, dass in einem persistent mit BVD-Virus infizierten Rind auf eine zweite Virusinfektion hin Interferon gebildet werden kann. Dieses Interferon würde seine Wirkung sowohl in nicht mit BVD-Virus wie auch in mit BVD-Virus infizierten Zellen entfalten und diese vor der Infektion mit dem „neuen“ Virus schützen, währenddessen das bereits eingestete BVD-Virus von der Wirkung von Interferon nicht beeinflusst wird.

5. Wer profitiert von der raffinierten Subversion der Interferon-Verteidigung am meisten – Virus oder Wirt?

Wenn man die Situation in einem persistent infizierten Tier aus der Sicht eines Virus heraus betrachtet, so stellt sich rasch heraus, dass das Virus von der Manipulation der IFN-Abwehr profitiert. Für die Weitergabe an empfängliche Tiere stellt ein persistent infiziertes Rind eine Art Lebensversicherung dar. Während das Virus an der Außenwelt relativ rasch inaktiviert würde, scheiden persistent infizierte Tiere während des ganzen Lebens Virus aus und können es somit weitergeben. Gewiss ist ein Teil dieser Tiere infolge der persistenten Infektion häufiger als andere krank und bleibt im Wachstum zurück. Anderen aber sieht man nichts an, und wir haben persistent BVDV-infizierte Tiere auch schon unter Bullen gefunden, welche Kandidaten für die Besamungsstation waren. Gelegentlich findet man auch persistent infizierte Kühe, welche ein oder mehrere Kälber auf die Welt bringen (die dann ebenfalls persistent infiziert sind). Da persistent infizierte Tiere einerseits immer noch IFN produzieren können und andererseits durch dieses IFN sowohl BVDV-infizierte wie auch nicht infizierte Zellen geschützt werden können, sind diese Tiere anderen Virusinfektionen gegenüber nicht schutzlos

ausgeliefert. Dies kann lebensrettend sein für das Tier, und dem Virus bleibt dadurch seine „Replikationsmaschine“ erhalten. In einem gewissen Sinn ist das BVDV vergleichbar mit einem „Selfish Gene“, wie es Richard DAWKINS in seinem Buch auf die Wirts-eigenen Gene bezogen beschreibt (DAWKINS 2006). DAWKINS meint damit, dass unsere Funktion nur darin bestehe, Gene an die nächste Generation weiterzugeben. Das BVDV ist diesbezüglich noch eine Stufe raffinierter; man könnte es etwas salopp auch als „Kuckuck-Gen“ bezeichnen: es gehört zwar nicht zu den Genen seiner persistent infizierten Wirte, aber der Wirt akzeptiert es wie seine eigenen und ermöglicht ihm sein Überleben in der Rinderpopulation. Die Manipulation der IFN-Abwehr sorgt zwar dafür, dass sein Wirt nicht einfach massiv immunsupprimiert ist, wodurch er länger am Leben bleibt. Es ist aber kaum anzunehmen, dass diese Hilfestellung durch das Virus altruistisch zu interpretieren ist – Gene sind „selfish“, und Viren sind es erst recht!

Literatur

- ABBAS, A. K., and LICHTMAN, A. H.: Cytokines. In: Cellular and Molecular Immunology. 5th Ed. Chapter 11; pp. 243–274. Philadelphia: Elsevier Saunders 2005a
- ABBAS, A. K., and LICHTMAN, A. H.: Innate Immunity. In: Cellular and Molecular Immunology. 5th Ed. Chapter 12; pp. 275–297. Philadelphia: Elsevier Saunders 2005b
- ADLER, B., ADLER, H., PFISTER, H., JUNGI, T. W., and PETERHANS, E.: Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *J. Virol.* 71, 3255–3258 (1997)
- AKIRA, S., and TAKEDA, K.: Toll-like receptor signalling. *Nature Rev. Immunol.* 4, 499–511 (2004)
- ALLEN, T. M., ALTFELD, M., GEER, S. C., KALIFE, E. T., MOORE, C., O’SULLIVAN, K. M., DESOUZA, I., FEENEY, M. E., ELDRIDGE, R. L., MAIER, E. L., KAUFMANN, D. E., LAHAIE, M. P., REYOR, L., TANZI, G., JOHNSTON, M. N., BRANDER, C., DRAENERT, R., ROCKSTROH, J. K., JESSEN, H., ROSENBERG, E. S., MALLAL, S. A., and WALKER, B. D.: Selective escape from CD8⁺ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J. Virol.* 79, 13239–13249 (2005)
- AMLIE-LEFOND, C., PAZ, D. A., CONNELLY, M. P., HUFFNAGLE, G. B., DUNN, K. S., WHELAN, N. T., and WHELAN, H. T.: Innate immunity for biodefense: a strategy whose time has come. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 1334–1342 (2005)
- BEUTLER, B.: Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness – the central role of the Toll-like receptors. *Crit. Care* 7, 39–46 (2003)
- BEUTLER, B.: Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257–263 (2004)
- BRACKENBURY, L. S., CARR, B. V., STAMATAKI, Z., PRENTICE, H., LEFEVRE, E. A., HOWARD, C. J., and CHARLESTON, B.: Identification of a cell population that produces alpha/beta interferon in vitro and in vivo in response to non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 79, 7738–7744 (2005)
- DAWKINS, R.: *The Selfish Genome*. 3th Ed. Oxford: Oxford University Press 2006
- FERKO, B., STASAKOVA, J., ROMANOVA, J., KITTEL, C., SEREINIG, S., KATINGER, H., and EGOROV, A.: Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *J. Virol.* 78, 13037–13045 (2004)
- FRITZ, J. H., and GIRARDIN, S. E.: How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. *J. Endotoxin Res.* 11, 390–394 (2005)
- FROY, O.: Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol.* 7, 1387–1397 (2005)
- HALLER, O., KOCHS, G., and WEBER, F.: The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344, 119–130 (2006)
- HILLEMANN, M. R.: Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101/Suppl. 2, 14560–14566 (2004)
- ISAACS, A., and LINDENMANN, J.: Virus interference: I. The interferon. *Proc. Royal Soc. London B Biol. Sci.* 147, 258–267 (1957)

- JOSEPH, J., ETCHEVERRY, F., ALCAMI, J., and MARIA, G. J.: A safe, effective and affordable HIV vaccine-an urgent global need. *AIDS Rev.* 7, 131–138 (2005)
- LIEBLER-TENORIO, E. M., RIDPATH, J. F., and NEILL, J. D.: Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 221–232 (2003)
- MANRUBIA, S. C., ESCARMIS, C., DOMINGO, E., and LAZARO, E.: High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. *Gene* 347, 273–282 (2005)
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A., and LOCATI, M.: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686 (2004)
- NETEA, M. G., VAN DER GRAAF, C., VAN DER MEER, J. W., and KULLBERG, B. J.: Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J. Leukoc. Biol.* 75, 749–755 (2004)
- OPPENHEIM, J. J., and YANG, D.: Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 359–365 (2005)
- PEEK, S. F., BONDS, M. D., SCHAELE, P., WEBER, S., FRIEDRICH, K., and SCHULTZ, R. D.: Evaluation of antiviral activity and toxicity of recombinant human interferon alfa-2a in calves persistently infected with type 1 bovine viral diarrhea virus. *Amer. J. Vet. Res.* 65, 865–870 (2004)
- QVIST, P., AASTED, B., BLOCH, B., MEYLING, A., RONSHOLT, L., and HOUE, H.: Flow cytometric detection of bovine viral diarrhea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle. *Canad. J. Vet. Res.* 54, 469–472 (1990)
- SAMUEL, C. E.: Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 778–809 (2001)
- SCHWEIZER, M., MÄTZNER, R., PFAFFEN, G., STALDER, H. P., and PETERHANS, E.: “Self” and “Nonself” manipulation of interferon defense during persistent infection: Bovine viral diarrhea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J. Virol.* 80, 6926–6935 (2006)
- SCHWEIZER, M., and PETERHANS, E.: Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J. Virol.* 75, 4692–4698 (2001)
- SHRESTA, S., SHARAR, K. L., PRIGOZHIN, D. M., SNIDER, H. M., BEATTY, P. R., and HARRIS, E.: Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J. Immunol.* 175, 3946–3954 (2005)
- STOUD, M.: Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 12, 167–176 (2006)
- SOPP, P., HOOPER, L. B., CLARKE, M. C., HOWARD, C. J., and BROWNLIE, J.: Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. *J. Gen. Virol.* 75, 1189–1194 (1994)
- VALARCHER, J. F., FURZE, J., WYLD, S., COOK, R., CONZELMANN, K. K., and TAYLOR, G.: Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *J. Virol.* 77, 8426–8439 (2003)
- WEBER, F., KOCHS, G., and HALLER, O.: Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol.* 17, 498–515 (2004)
- WUCHERPFENNIG, K. W.: The structural interactions between T cell receptors and MHC-peptide complexes place physical limits on self-nonsel self discrimination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 296, 19–37 (2005)

Prof. Dr. Ernst PETERHANS
Institut für Veterinär-Virologie
Universität Bern
Länggass-Str. 122
PO Box
CH-3001 Bern
Schweiz
Tel.: +41 31 6312505
Fax: +41 31 6312534
E-Mail: ernst.peterhans@ivv.unibe.ch

Cardiovascular Healing – Focus on Inflammation

Leopoldina-Symposium

am 23. und 24. Juni 2006 in Würzburg

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 95, Nr. 351

Herausgegeben von Johann BAUERSACHS, Stefan FRANTZ und Georg ERTL
(Würzburg)

(2008, 122 Seiten, 11 Abbildungen, 21,50 Euro, ISBN: 978-3-8047-2465-5)

Schwerpunkt des dritten internationalen Herz- und Gefäß-Symposiums der Leopoldina in Würzburg war das Thema Entzündungen (Inflammation). Auf Verwundungen antwortet der Körper mit einer Entzündung und der Aktivierung des Immunsystems. Die entzündlichen Reaktionen sind wichtig für den Heilungsprozess, müssen aber strikt auf verletzte Areale des Organismus und zeitlich begrenzt bleiben, um eine Schädigung gesunder Bereiche zu vermeiden. Der Band mit *Extended Abstracts* und *Abstracts* diskutiert neuere Befunde zur Rolle von Immunität bei Herzversagen, über reaktive Sauerstoffradikale und Heilung im Herz-Kreislauf-System sowie die Rolle der Stickoxide (NO) und der Stickoxidsynthasen (NOS) bei Herzkrankheiten, außerdem zur Entzündung und Heilung bei Gefäßerkrankungen. Darüber hinaus wird auch die Stammzelltherapie in Zusammenhang mit der Behandlung von Myokardinfarkten behandelt. Die Beiträge zeigen, dass bei Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, wie der Herzinsuffizienz oder der Arteriosklerose, welche eigentlich keine klassischen Entzündungen sind, entzündliche Prozesse eine große Rolle spielen.

II. Erkrankung, Immunität und Immunisierung

Zum Wirtsspektrum von Pestiviren bei Wiederkäuern

Karin MÖSTL, Reinhild KRAMETTER-FRÖTSCHER, Angelika LOITSCH,
Hannes KOHLER, Alexandra SCHLEINER, Peter SCHIEFER und
Walter BAUMGARTNER (Wien)

Zusammenfassung

Pestiviren verursachen bei Wiederkäuern und Schweinen wirtschaftlich sehr bedeutende Infektionskrankheiten und stehen daher im Interesse von Bekämpfungsmaßnahmen. Eine epidemiologische Besonderheit stellt ihre geringe Wirtsspezifität dar. Speziell zwischen Rindern, Schafen, Ziegen und Wildwiederkäuern kann die Speziesbarriere durchbrochen werden, wodurch Kreuzinfektionen möglich sind. Inwieweit dieser Umstand für die Bekämpfung der Bovinen Virus-Diarrhoe und der *Mucosal Disease* bei Rindern, welche mit hohem finanziellem Aufwand betrieben wird, von Relevanz ist, lässt sich derzeit nicht eindeutig abschätzen. Die vorliegende Arbeit gibt eine Übersicht über die in Österreich zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen.

Abstract

Pestiviruses cause high economical losses in ruminants and pigs. Therefore eradication programmes are performed. Of special epidemiological interest is the fact, that these viruses are not strictly host-species specific but may cross the species barrier. This is particularly the case between cattle, sheep, goats and wild ruminants. The question whether such cross-species transmissions could cause a major problem for eradication programmes is of special importance and is actually not clarified. This review article gives an overview of the investigations performed in Austria.

1. Einleitung

Gemäß der aktuellen Nomenklatur (FAUQUET et al. 2005) zählen zum Genus *Pestivirus* der Familie der Flaviviridae die Spezies *Border-Disease-Virus* (BDV), *Bovines Virusdiarrhoe-Virus 1* (BVDV-1), *Bovines Virusdiarrhoe-Virus 2* (BVDV-2) und das *Klassische Schweinepestvirus* (CSFV). Ursprünglich wurden die Viren je nach der Spezies, in welcher sie nachgewiesen worden sind, bezeichnet. Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass diese Erreger keine hohe Wirtsspezifität aufweisen, sondern die Speziesbarriere durchbrechen können. Dies ist für die Pestiviren der Wiederkäuer bekannt, während das *Klassische Schweinepestvirus* nur von Schweinen isoliert wird. BVDV und BDV können hingegen zu Kreuzinfektionen zwischen Rindern, Schafen, Ziegen und Wildwiederkäuern sowie auch Schweinen führen.

2. Pestivirusinfektionen bei kleinen Wiederkäuern

2.1 Literatur

Bei kleinen Wiederkäuern konnten VILCEK et al. (1994, 1997) unter Isolaten aus dem Vereinigten Königreich, Schweden und Neuseeland sowohl BVDV-1 und BVDV-2 als auch BDV nachweisen. In Süditalien fanden PRATELLI et al. (2001) BVDV-1 und BVDV-2 unter kleinen

Wiederkäuern, in Nordirland wiesen serologische Untersuchungen von GRAHAM et al. (2001) auf BVDV-1-Infektionen in Schafen hin. Auch serologische Untersuchungen von O'NEILL et al. (2004) in Irland deckten ein überwiegendes Vorkommen von BVDV auf. Klinische Fälle von *Border Disease* und die erstmalige Isolierung des BDV in der Schweiz wurden von BRAUN et al. (2002) beschrieben. Die in der Schweiz isolierten BDV wurden von STALDER et al. (2005) als BDV-3 identifiziert.

2.2 Untersuchungen in Österreich

In eigenen Untersuchungen wurden Schafe und Ziegen aus den Bundesländern Tirol, Vorarlberg, Kärnten und Niederösterreich mittels eines Enzym-Immuno-Assays (ELISA; BDV-Ab Svanova Biotech AB, Uppsala, Schweden) auf Antikörper gegen Pestiviren untersucht. Dieser ELISA war zuvor von KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2005) auf seine Eignung zum Einsatz bei Schaf- und Ziegenseren untersucht worden. Er hatte bei Schafseren eine Sensitivität von 94,3 % und eine Spezifität von 93,7 % verglichen mit dem Serumneutralisationstest aufgewiesen, bei Ziegenseren hatten diese Werte sogar jeweils 100 % betragen.

Von 377 Schafherden wiesen 237 Herden mindestens ein seropositives Tier auf, was einer Prävalenz von 62,9 % entspricht (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. 2007). Auf die Einzeltiere bezogen enthielten 1448 von 4931 (29,4 %) untersuchten Schafseren Antikörper gegen Pestiviren (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. 2007). Sowohl bezüglich der Seroprävalenz auf Herden- als auch auf Einzeltierbasis konnten markante regionale Unterschiede beobachtet werden, wobei die höheren Prävalenzraten in den westlichen Bundesländern Tirol und Vorarlberg nachgewiesen wurden (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. 2007). Ein Zusammenhang mit der gehandhabten Praxis der Alpung konnte in Tirol gezeigt werden, wo gealpte kleine Wiederkäuer signifikant häufiger seropositiv waren als nicht gealpte (SCHIEFER et al. 2006). Aber auch der Umstand, ob Schafe und Rinder gemeinsam gehalten wurden, spielte eine wesentliche Rolle. Schafe bzw. Schafherden mit Kontakt zu Rindern waren signifikant häufiger seropositiv bzw. enthielten seropositive Tiere. In Kärnten z. B. waren 23,2 % der Schafe aus Beständen, in welchen auch Rinder gehalten wurden, seropositiv, verglichen mit nur 5,8 % Seroprävalenz unter Schafen, bei denen ein Rinderkontakt nicht gegeben war (SCHLEINER et al. 2006). Dies legt Pestivirusübertragungen von Rindern auf Schafe nahe. Um diese Frage näher abzuklären, haben wir die im ELISA positiven Serumproben in Serumneutralisationstests gegen BVDV-1 (Stamm NADL), BVDV-2 (Stamm 125) und BDV (Stamm Morredun) vergleichend getestet. Die Ergebnisse bestätigten die Vermutung insofern, als 85 % der differenzierbaren Seren (mindestens 4-fache Titerunterschiede wurden als signifikant gewertet) den höchsten Titer gegen BVDV-1 und nur 14 % gegen BDV aufwiesen. BVDV-2 war mit nur 1 % sehr gering vertreten. Interessant dabei ist auch, dass die Tiere mit Hinweis auf BDV-Infektion regional gehäuft anzutreffen sind (z. B. in Oberkärnten; SCHLEINER et al. 2006).

Die großen regionalen Unterschiede in der Seroprävalenz gegen Pestiviren konnten auch in den Ziegenpopulationen gefunden werden, wobei die Verbreitung von Pestiviren generell in der Ziegenpopulation geringer erscheint als in der Schafpopulation Österreichs. So betrug die Seroprävalenz gesamthaft für die 4 untersuchten Bundesländer auf Herdenbasis 31 % und auf Einzeltierbasis 12 %, mit Werten von 4 % in Niederösterreich bis 20 % in Vorarlberg (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. 2006). Unter den Ziegen dürfte der Infektionsdruck vom Rind noch höher sein als unter den Schafen, da bei 93–94 % der differenzierbaren Seren im Se-

rumneutralisationstest der signifikant höchste Titer gegen BVDV-1 gefunden wurde; nur bei 6–7% war dies gegen BDV der Fall (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. 2005, 2006).

3. Pestivirusinfektionen beim Rind

3.1 Literatur

Studien zu Genomanalysen der in den Rinderpopulationen kursierenden Pestivirusinfektionen belegen, dass in Europa BVDV-1 die weit überwiegende Spezies ist, was z. B. HURTADO et al. (2003) für Isolate aus Spanien, STALDER et al. (2005) aus der Schweiz und VILCEK et al. (2001) für verschiedene europäische Isolate zeigten. Wesentlich seltener wird vom Vorkommen von BVDV-2 berichtet, wie in Deutschland (WOLFMAYER et al. 1997), Belgien (LETELLIER et al. 1999) und Frankreich (VILCEK et al. 2001). BDV dürfte nur ausnahmsweise vom Rind isoliert werden (BECHER et al. 1997). Übertragungen von BVDV-Infektionen zwischen Rindern und Schafen und umgekehrt sind allerdings bekannt. So beschrieben PATON et al. (1997) eine alternierende Rind-Schaf-Rind-Schaf-Übertragung.

3.2 Untersuchungen in Österreich

In mehreren Untersuchungen konnten mit einer Ausnahme alle analysierten, aus Feldfällen stammenden Isolate als BVDV-1 charakterisiert werden (VILCEK et al. 2001, 2003, ROSSMANNITH et al. 2001, KOLESAROVA et al. 2004, SCHÖPF et al. 2005). Die eine Ausnahme betraf ein Isolat aus der Steiermark, welches sich als BVDV-2 erwies (VILCEK et al. 2003).

4. Pestivirusinfektionen bei Wildwiederkäuern

4.1 Literatur

Pestivirusinfektionen konnten in zahlreichen Wildtierarten, überwiegend auf serologischer Basis, nachgewiesen werden. Die höchsten Seroprävalenzraten konnten bei Rotwild gefunden werden: z. B. in einer Studie in Bayern 3% (SCHMITT und WITTKOWSKI 1999), im Ostallgäu 5,4% (KLEINSCHMIDT 2003), in Dänemark 5% (NIELSEN et al. 2000), in Norwegen 12% (LILLEHAUG et al. 2003). Die charakterisierten Isolate sind größtenteils BVDV-1 zuzuordnen. Bemerkenswert sind die Pestivirusinfektionen unter Gamsen in den Pyrenäen, welche mit Tierverlusten und damit einer Verringerung der Population einhergingen. Als ursächliche Erreger konnten ein Isolat aus Frankreich und eines aus Spanien als neuer Pestivirus-Genotyp (BDV-4) identifiziert werden (ARNAL et al. 2004, FRÖLICH et al. 2005).

4.2 Untersuchungen in Österreich

Von KRAMETTER et al. (2004) wurden 59 Seren von Rotwild, 77 von Rehwild, 4 von Damwild und 5 von Gamsen auf Antikörper gegen Pestiviren untersucht. Nur eine einzige Probe eines Rotwildes erwies sich als positiv. In einer Untersuchung an 152 Rehwildproben aus Niederösterreich konnte kein einziger Seroreagent gefunden werden (DEINHOFER et al. 2004).

5. Schlussfolgerungen

Sowohl Untersuchungsergebnisse aus der Literatur als auch unsere eigenen Untersuchungen über die epidemiologische Situation der Pestivirusinfektionen unter Wiederkäuern in Österreich deuten darauf hin, dass der Infektionsdruck vom Rind zu den kleinen Wiederkäuern massiver ausgeprägt ist als umgekehrt. Serologische Untersuchungen zeigen, dass die in den kleinen Wiederkäuerpopulationen kursierenden Erreger überwiegend der Spezies BVDV-1 zuzuordnen sein dürften. Zusätzlich gibt es bei Schafen regional aber auch ein von BVDV-Infektionen unabhängiges BDV-Infektionsgeschehen, was nicht nur durch die serologischen Untersuchungen, sondern auch durch die Detektion von mit BDV persistent infizierten Schafen belegt werden konnte (KOHLER 2006).

Von praktischer Bedeutung ist die Frage, ob Pestivirus-infizierte Schafe, Ziegen oder Wildwiederkäuer eine Infektionsquelle für Rinder darstellen könnten. Dass dies prinzipiell möglich ist, belegen Berichte von PATON et al. (1997) sowie KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (im Druck) über die Virusübertragung vom Schaf auf das Rind und von UTTENTHAL et al. (2005) über die indirekte Übertragung des Erregers von einem persistent BVDV-infizierten Moschustier auf ein Kalb. Detaillierte Untersuchungen über die Rolle von kleinen Wiederkäuern und Wildwiederkäuern als Infektionsquelle für Rinder stehen allerdings noch aus. Keine Hinweise auf ein derartiges Infektionsgeschehen fanden VILCEK und NETTLETON (2006). Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass das Infektionsrisiko sehr stark von der speziellen epidemiologischen Situation abhängt. Unsere Untersuchungen legen nahe, für Österreich folgenden Risikofaktoren Beachtung zu schenken:

- Pestivirusinfektionen sind in Österreichs Schafpopulationen, zumindest regional, sehr weit und in Ziegenpopulationen mäßig verbreitet.
- Schafe und Ziegen werden häufig gemeinsam mit Rindern gehalten.
- Rinder haben in etlichen Regionen Österreichs im Rahmen der Alpung oder Nutzung gemeinsamer Sommerweiden intensive Kontaktmöglichkeiten mit Schafen, Ziegen und Wildwiederkäuern.
- Durch die fortschreitende BVD-Bekämpfung innerhalb der Rinderpopulation wird nicht nur die Zahl der persistent infizierten Rinder rasch sinken, sondern auch die der empfänglichen Tiere drastisch ansteigen.
- In der Schafpopulation kursiert regional auch ein von BVDV unabhängiges Infektionsgeschehen mit dem BDV, von dem sich derzeit nicht endgültig abschätzen lässt, inwieweit ein Infektionsrisiko für Rinder bestehen könnte. Unsere eigenen Untersuchungen legen diese Möglichkeit aber nahe (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., im Druck).
- Es ist davon auszugehen, dass noch nicht alle vorkommenden Pestiviren identifiziert und charakterisiert sind, so dass möglicherweise auch noch unbekannte und schwer diagnostizierbare Virusreservoirs vorkommen (VILCEK und NETTLETON 2006).

Unserer Meinung, dass nach aktuellem Wissensstand die Möglichkeit einer Pestivirusübertragung (eventuell eines hochvirulenten Stammes) zwischen Wild- und Hauswiederkäuern nicht ausgeschlossen werden kann, schließen sich auch VILCEK und NETTLETON (2006) in ihrem kürzlich erschienenen Review zu diesem Thema an. Die Folgen könnten eine massive Gefährdung der teuren Sanierungserfolge bzw. verheerende Verluste in der Wildtierpopulation sein. Die weitere Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge, verbesserte Diagnosemöglichkeiten und entsprechende Screeninguntersuchungen sind daher wichtige Aufgaben der nahen Zukunft.

Literatur

- ARNAL, M., FERNANDEZ-DE-LUCO, D., RIBA, L., MALEY, M., GILRAY, J., WILLOUGHBY, K., VILCEK, S., and NETTLETON, P. F.: A novel pestivirus associated with deaths in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). J. Gen. Virol. 85, 3653–3657 (2004)
- BECHER, P., ORLICH, M., SHANNON, A. D., HORNER, G., KÖNIG, M., and THIEL, H. J.: Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. J. Gen. Virol. 78, 1357–1366 (1997)
- BRAUN, U., HILBE, M., EHRENSPERGER, F., SALIS, F., ALTHER, P., STRASSER, M., STALDER, H. P., and PETERHANS, E.: Border disease in a flock of sheep. SAT Schweiz. Arch. Tierheilk. 144, 419–426 (2002)
- DEINHOFER, M., ROSSMANITH, W., KÜHNE, S., DEINHOFER, R., JANACEK, R., KIENESBERGER, J., and WILHELM, E.: Erfolgreiche Kontrolle der BVD-Virusinfektion auf Gemeinschaftsweiden. VMA/Wien. Tierärztl. Mschr. 91, 72–76 (2004)
- FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANIHOFF, J., DESSELBERGER, U., and BALL, L. A.: Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, 1162 p. (2005)
- FRÖLICH, K., JUNG, S., LUDWIG, A., LIECKFELDT, D., GIBERT, P., GAUTHIER, D., and HARS, J.: Detection of a newly described pestivirus of Pyrenean Chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in France. J. Wildl. Dis. 41, 606–610 (2005)
- GRAHAM, D. A., CALVERT, V., GERMAN, A., and MCCULLOUGH, S. J.: Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. Vet. Rec. 148, 69–72 (2001)
- HURTADO, A., GARCIA-PEREZ, A. L., ADURIZ, G., and JUSTE, R. A.: Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain. Virus Res. 92, 67–73 (2003)
- KLEINSCHMIDT, M.: Prävalenz von Infektionen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe in der Wildwiederkäuerpopulation in Zusammenhang mit der Weidehaltung von Rindern. Inaugural-Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München 2003
- KOHLER, H.: Einfluss der Alping auf die Verbreitung von ruminanten Pestiviren beim kleinen Wiederkäuer. Dissertation Veterinärmedizinische Universität Wien 2006
- KOLESAROVA, M., FRANZ, S., JACKOVA, A., VILCEK, S., MÖSTL, K., BENETKA, V., SCHÖPF, K., SCHODER, G., HOFER, J., and BAUMGARTNER, W.: Genetic typing of bovine viral diarrhea virus from Austrian field samples. VMA/Wien. Tierärztl. Mschr. 91, 265–268 (2004)
- KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., BENETKA, V., MÖSTL, K., and BAUMGARTNER, W.: Transmission of Border Disease Virus from sheep to calves – a possible risk factor for the Austrian BVD eradication programme in cattle? VMA/Wien. Tierärztl. Mschr. (2008, im Druck)
- KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., LOITSCH, A., KOHLER, H., SCHLEINER, A., SCHIEFER, P., MÖSTL, K., GOLJA, F., and BAUMGARTNER, W.: Prevalence of antibodies to Pestiviruses in goats in Austria. J. Vet. Med. B 53, 48–50 (2006)
- KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., LOITSCH, A., KOHLER, H., SCHLEINER, A., SCHIEFER, P., MÖSTL, K., GOLJA, F., and BAUMGARTNER, W.: Serological survey for antibodies against Pestiviruses among sheep in Austria. Vet. Rec. 160, 726–730 (2007)
- KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., LOITSCH, A., MÖSTL, K., SOMMERFELD-STUR, I., and BAUMGARTNER, W.: Seroprävalenz von Border Disease und Boviner Virusdiarrhoe bei Schafen und Ziegen in ausgewählten Regionen Österreichs. VMA/Wien. Tierärztl. Mschr. 92, 238–244 (2005)
- KRAMETTER, R., NIELSEN, S. S., LOITSCH, A., FRÖTSCHER, W., BENETKA, V., MÖSTL, K., and BAUMGARTNER, W.: Pestivirus exposure in free-living and captive deer in Austria. J. Wildl. Dis. 40, 791–795 (2004)
- LETTELIER, C., KERKHOF, P., WELLEMAN, G., and VANOPDENBOSCH, E.: Detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. Vet. Microbiol. 64, 155–167 (1999)
- LILLEHAUG, A., VIKOREN, T., LARSEN, I. L., AKERSTEDT, J., THARALDSEN, J., and HANDELAND, K.: Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervides. J. Wildl. Dis. 39, 779–786 (2003)
- NIELSEN, S. S., ROENSHOLT, L., and BITSCH, V.: Bovine virus diarrhea virus in free-living deer from Denmark. J. Wildl. Dis. 36, 584–587 (2000)
- O'NEILL, R., O'CONNOR, M., and O'REILLY, P.: A survey of antibodies to pestivirus in sheep in the Republic of Ireland. Irish Vet. J. 57, 525–530 (2004)
- PATON, D., GUNN, M., SANDS, J., YAPP, F., DREW, T., VILCEK, S., and EDWARDS, S.: Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. Arch. Virol. 142, 929–938 (1997)
- PRATELLI, A., MARTELLA, V., CIRONE, F., BUONAVOGLIA, D., ELIA, G., TEMPESTA, M., and BUONAVOGLIA, C.: Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. J. Virol. Meth. 94, 81–85 (2001)

- ROSSMANITH, W., VILCEK, S., WENZL, H., ROSSMANITH, E., LOITSCH, A., DURKOVIC, B., STROJNY, L., and PATON, D. J.: Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. *Vet. Microbiol.* 81, 207–218 (2001)
- SCHIEFER, P., KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., SCHLEINER, A., LOITSCH, A., GOLJA, F., MÖSTL, K., und BAUMGARTNER, W.: Prävalenz Pestivirus-spezifischer Antikörper in Seren von Schafen und Ziegen aus Tirol (Österreich). *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 113, 55–58 (2006)
- SCHLEINER, A., KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., SCHIEFER, P., LOITSCH, A., GOLJA, F., MÖSTL, K., und BAUMGARTNER, W.: Seroepidemiologische Untersuchung bei Schafen in Kärnten zur Verbreitung von ruminanten Pestiviren. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 119, 203–208 (2006)
- SCHMITT, D., und WITTKOWSKI, G.: Untersuchungen zur Verbreitung von BVD-Virusinfektionen bei Schalenwild in Bayern. *Tierärztl. Umschau* 54, 284–288 (1999)
- SCHÖPF, K., GAEDE, W., und MATT, M.: Erfahrungen zur Bekämpfung der Bovinen Virus Diarrhoe (BVD/MD) mit spezieller Berücksichtigung der Verbreitung von BVDV-Genotypen im Bundesland Tirol. *VMA/Wien. Tierärztl. Mschr.* 92, 254–258 (2005)
- STALDER, H. P., MEIER, P., PFAFFEN, G., WAGECK-CANAL, C., RÜFENACHT, J., SCHALLER, P., BACHOFEN, C., MARTI, S., VOGT, H. R., and PETERHANS, E.: Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72, 37–41 (2005)
- UTTENTHAL, A., GRONDAHL, C., HOYER, M. J., HOUE, H., VAN MAANEN, C., RASMUSSEN, T. B., and LARSEN, L. E.: Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves. Do we know the reservoirs for BVDV? *Prev. Vet. Med.* 72, 87–91 (2005)
- VILCEK, S., GREISER-WILKE, I., DURKOVIC, B., OBRITZHAUSER, W., DEUTZ, A., and KÖFER, J.: Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Vet. Microbiol.* 91, 285–291 (2003)
- VILCEK, S., HERRING, A. J., HERRING, J. A., NETTLETON, P. F., LOWINGS, J. P., and PATON, D. J.: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136, 309–323 (1994)
- VILCEK, S., and NETTLETON, P. F.: Pestiviruses in wild animals. *Vet. Microbiol.* 116, 1–12 (2006)
- VILCEK, S., NETTLETON, P. F., PATON, D. J., and BELAK, S.: Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J. Gen. Virol.* 78, 725–735 (1997)
- VILCEK, S., PATON, D. J., DURKOVIC, B., STROJNY, L., IBATA, G., MOLUSSA, A., LOITSCH, A., ROSSMANITH, W., VEGA, S., SCICLUNA, M. T., and PALFI, V.: Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146, 99–115 (2001)
- WOLFMAYER, A., WOLF, G., BEER, M., STRUBE, W., HEHNEN, H. R., SCHMEER, N., and KAADEN, O. R.: Genomic (5'-UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142, 2049–2057 (1997)

Prof. Dr. Karin Möstl
Veterinärmedizinische Universität Wien
Klinische Virologie
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250772702
Fax: +43 1 250772790
E-Mail: Karin.Moestl@vu-wien.ac.at

Klinische und wirtschaftliche Folgen einer BVDV-Herdeninfektion

Georg WOLF (München)

Mit 1 Tabelle

Zusammenfassung

Die BVDV-Infektion verursacht hohe Kosten. Schadenskalkulationen basieren häufig auf vagen Annahmen, sie sind teilweise einseitig und dienen als Argument für kostenintensive Gegenmaßnahmen. Die Addition aller „hoch geschätzten“ Schäden verschiedener Krankheiten führt zu einem sehr hohen Wert. Für BVDV wurden in der Vergangenheit extrem unterschiedliche Werte publiziert, sie reichen bis über 100 € pro Tier und Jahr. Es ist daher wichtig, die verschiedenen Aspekte für Schwierigkeiten in der Schadenskalkulation bei der BVDV-Infektion zu betrachten.

Abstract

BVDV infection is an intense cost factor. Damage calculations are often based on vague assumptions, are lop-sided and provide a point for cost-intensive countermeasures. The sum total of the entire "overrated" damage estimate ascribed to different diseases yields a very high figure. The values published for BVDV in the past varied extremely widely, some gave over 100 € per animal and year. So it is important to consider different aspects of the difficulty of calculating potential damage due to BVDV infection.

1. Infektion und Erkrankung

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) ist hoch variabel. Auch bezüglich der Virulenz sind Unterschiede nachweisbar. Eine charakteristische Eigenschaft der BVDV-Infektion ist die lebenslange Persistenz (PI) nach einer Infektion in der frühen Fetalphase. PI-Tiere sind teilweise völlig gesund. Sie entwickeln die tödlich verlaufende *Mucosal Disease* (MD), wenn durch Mutation oder Rekombination ihres BVDV-Stammes ein zellzerstörendes Virus entsteht. Leben mehrere PI-Tiere zusammen, wird gehäuft MD in zeitlicher Nähe beobachtet, da sich die PI-Tiere mit dem zytopathogenen Stamm gegenseitig infizieren. Das klinische Bild der MD ist gekennzeichnet durch mehr oder weniger stark ausgeprägte Erosionen an allen Schleimhäuten, an der Haut, im Zwischenklauenspalt und am Kronsaum sowie häufig unstillbaren Durchfall.

Die hohe Infektiosität der PI-Tiere führt dazu, dass sich in der unmittelbaren Umgebung nach kurzer Zeit fast alle Rinder infizieren. Diese Infektionen verlaufen sehr unterschiedlich, je nach BVDV-Stamm und Disposition des infizierten Rindes. Oft werden keine nennenswerten Krankheitssymptome beobachtet, sofern die Tiere nicht trächtig sind. Hoch virulente Stämme bedingen eine hohe Morbidität. Schwere Allgemeinerkrankungen mit hochgradigen Enteritiden, Pneumonien und teilweise schweren Hämorrhagien (*hemorrhagic syndrome* HS) werden beobachtet. Die Infektion kann bei Tieren jeden Alters letal verlaufen. Das Bild des HS ist der MD ähnlich. Aufgrund der hochgradigen Virämie ist von einer hohen Kontagiosität bei transientser Infektion mit hochvirulentem BVDV auszugehen, dafür spricht auch die hohe Erkrankungshäufigkeit in betroffenen Herden.

Bei tragenden Rindern wird der Fötus infiziert. Im ersten Drittel der Gravidität kommt es zum Abort oder zur Erzeugung von PI-Tieren. Mit zunehmender Entwicklung des Immunsystems führt die Infektion zur spezifischen Immunantwort, was nicht nur zur Beseitigung des Virus, sondern auch zur Beseitigung infizierter Zellen führt. Dies kann zu erheblichen Störungen in der Organentwicklung führen. Fruchttod, Missbildungen, lebensschwache Neugeborene und Kümern sind die Folge. Die fetalen Schäden werden aufgrund dieser Pathogenese auch bei BVDV-Stämmen beobachtet, die ansonsten nicht virulent erscheinen. Zwischen Infektionszeitpunkt und Abort vergehen Wochen bis Monate. *Mucosal Disease* tritt möglicherweise erst Jahre nach der initialen Fetalinfektion auf. Typischerweise werden bei einer Neudurchseuchung einer Herde Schäden in zeitlicher Abfolge beobachtet: Durchfall und Grippe (können fehlen), lebensschwache Neugeborene, nach einigen Monaten Kümmerer, Missbildungen und viel später möglicherweise *Mucosal Disease* in einer Gruppe etwa gleichaltriger Tiere.

2. Wirtschaftlicher Schaden

Schadenskalkulationen basieren häufig auf vagen Annahmen, sie sind teilweise einseitig und dienen als Argument für kostenintensive Gegenmaßnahmen. Die Addition aller „hoch geschätzten“ Schäden verschiedener Krankheiten führt zu einem sehr hohen Wert. Die Tierhaltung wäre damit ein Verlustgeschäft. Für BVDV wurden in der Vergangenheit extrem unterschiedliche Werte publiziert, sie reichen bis über 100 € pro Tier und Jahr.

Die Schwierigkeiten in der Schadenskalkulation für die BVDV-Infektion sind durch mehrere Aspekte begründet:

- Die Manifestation einzelner Schäden variiert in Abhängigkeit vom BVDV-Stamm.
- Die Disposition des Rindes bei der Infektion beeinflusst den Schadensverlauf.
- Die Schadwirkungen sind sehr komplex.
- Häufig sind Daten zur Seroprävalenz bekannt, die Inzidenz von Infektionen in Abhängigkeit vom Alter ist dagegen nur vage schätzbar.
- Die monetäre Bezifferung einzelner Schadensmerkmale ist schwierig (regionale Unterschiede, Fluktuation der Produktpreise).

Für eine neue Bewertung der BVDV-bedingten Schäden wurde ein Kalkulationsprogramm erstellt, welches betriebsspezifisch zu erwartende Schäden bei Neuinfektionen errechnet, aber auch für eine Region anwendbar ist. Alle Parameter sind dabei frei variierbar. Die vorgestellten Zahlen wurden mit Daten aus der landwirtschaftlichen Statistik für bayerisches Fleckvieh berechnet (Struktur der Rinderhaltung, Tier- und Produktpreise; Roland TAFERTSHOFER). BVDV-spezifische Indizes (Morbidität, Letalität) wurden aus der Literatur entnommen und aufgrund eigener Beobachtungen geschätzt.

Für die Summierung wurde jedes Schadensmerkmal aus dem Produkt folgender Zahlenwerte berechnet:

- relativer Anteil BVDV-empfindlicher Tiere der betreffenden Altersgruppe;
- Anteil der Tiere in der jeweiligen Altersgruppe;
- relativer Anteil an Tieren, die für das Merkmal in Frage kommen (z. B. Graviditäten);
- Häufigkeit des Ereignisses nach einer Infektion (Manifestationsindex);
- Gesamttierzahl der Herde;
- Verlust in € für das Schadensmerkmal.

Tab. 1 BVDV-bedingte Schäden in einer Herde in Abhängigkeit von der Zeit nach der letzten Infektion bzw. laufender Schaden pro Kalbung in Abhängigkeit vom Infektionsintervall

letzte Herdinfektion vor x bzw. Infektionsintervall von x Jahren	Virulenz des BVDV-Stammes			
	schwach € pro Herde	hoch	schwach € pro Kalbung	hoch
0 (persistent infiziert)	298	449	4,3	32,6
1	330	1060	4,3	32,6
2	1674	3155	23,9	45,0
3	4106	6486	39,1	61,3
4	5854	9049	41,7	63,9
5	7346	11237	41,9	63,3
6	8700	13222	41,3	62,0
7	9882	14953	40,2	60,0
8	10790	16286	38,4	57,2
9	11384	17156	36,0	53,5
10	11755	17700	33,5	49,7

In einer bayerischen Fleckviehherde mit 60 Rindern (35 Kühe) errechnen sich die tabellierten Schadenssummen durch Neuinfektionen aller empfänglichen Rinder. Späte Folgeschäden durch frühere BVDV-Infektionen bleiben hier unberücksichtigt. (Schwach virulent: transiente Infektion führt nicht zum Tod, ca. 20 % der Infizierten erkranken an Grippe/Durchfall; hoch virulent: 10 % Letalität, 50 % Grippe/Durchfall.)

Entscheidend für die Kosten-Nutzen-Relation von BVDV-Bekämpfungsmaßnahmen ist die Bewertung des Schadens in der Population. Als Vergleichswert bietet sich eine Normierung auf den Schaden pro Kalbung an. Die vergleichsweise niedrigen Werte bei hoher Inzidenz ergeben sich, da hierbei Feldinfektionen bereits vor der ersten Gravidität stattfinden und zu einer belastbaren Immunität führen. Es kommt also nicht zu den sehr verlustreichen Graviditätsschäden, auch die Erzeugung neuer PI-Tiere findet nur selten statt. Diese Tatsache ist besonders zu berücksichtigen, wenn Bekämpfungsmaßnahmen nicht zur Eradikation bzw. vollständigen Verhinderung der Neuinfektion in den Herden führen. Die Verringerung der Inzidenz führt dann zu einer Erhöhung der Schadenssummen. Erst wenn die Inzidenz unter 20 % pro Jahr sinkt, also im Mittel alle fünf Jahre oder seltener Neuinfektionen in den Herden auftreten, sinkt der mittlere Schaden wieder, wenngleich die betroffenen Einzelherden dann extrem belastet werden. Aufgrund dieser Tatsache sind nicht stringente, freiwillige Bekämpfungsmaßnahmen ohne Impfprophylaxe als sehr kritisch zu betrachten.

Dr. Georg WOLF
 Institut für Medizinische Mikrobiologie,
 Infektions- und Seuchenmedizin
 der Tierärztlichen Fakultät
 der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Veterinärstraße 13
 80539 München
 Bundesrepublik Deutschland
 Tel.: +49 89 21802533
 Fax: +49 89 21802597
 E-Mail: georg.wolf@micro.vetmed.uni-muenchen.de

Evolution und Menschwerdung

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung vom 7. bis 9. Oktober 2005
zu Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 93, Nr. 345
Herausgegeben von Harald ZUR HAUSEN (Heidelberg)
(2006, 282 Seiten, 65 Abbildungen, 3 Tabellen, 34,95 Euro,
ISBN-13: 978-3-8047-2370-2)

Evolution und Menschwerdung gehören noch immer zu den interessantesten Themen, mit denen sich die Naturwissenschaft auseinandersetzt und die die Öffentlichkeit faszinieren. Die Thematik verlangt eine interdisziplinäre Auseinandersetzung, für die eine Akademie wie die Leopoldina prädestiniert ist. Daher griff die Jahresversammlung 2005 verschiedene Aspekte hierzu auf.

Die Schwerpunkte der Tagung spiegeln den enormen Fortschritt der Erkenntnisse über das Evolutionsgeschehen und den veränderten Blickwinkel wider, der sich aufgrund des außerordentlich großen Wissenszuwachses und veränderter Diskussionsebenen in der Forschung, aber auch zwischen Wissenschaft und Gesellschaft ergeben hat. Die Evolution des Menschen und dessen physische, geistige und kulturelle Entwicklungstendenzen stehen dabei im Zentrum.

Der Band spannt den Bogen vom Urknall und der Bildung der Planetensysteme über die Entstehung des Lebens, die Entwicklung von Prokaryoten und Eukaryoten, die Evolution und das Sterben der Saurier, die Analyse von Insektenstaaten bis hin zu Fragen der Menschwerdung und Formen der menschlichen Kultur. Hier werden unter anderem „Das Sprachmosaik und seine Evolution“, die „Evolution durch Schrift“, Rituale, Religionen, Gemeinschaftsbildung und sozialer Wandel unter evolutionären Aspekten untersucht, aber auch „Bilder in Evolution und Evolutionstheorie“ sowie die „Griechischen Anfänge der Wissenschaft“ betrachtet.

Impfmaßnahmen im Rahmen der BVD/MD-Bekämpfung

Ludwig HAAS und Volker MOENNIG (Hannover)

Zusammenfassung

Die Bovine Virusdiarrhoe/*Mucosal Disease* (BVD/MD) ist eine der wirtschaftlich bedeutsamsten Infektionskrankheiten des Rindes. Im Mittelpunkt einer jeden Bekämpfungsstrategie sollte die Erkennung und Eliminierung der persistierend mit dem BVD-Virus infizierten Rinder (PI-Rinder), Folge einer intrauterinen Infektion im ersten Trächtigkeitsdrittel, stehen.

Nach der Entfernung der PI-Tiere kann entweder der Status eines BVD-freien oder eines BVD-unverdächtigen Betriebes angestrebt werden. Bei einer hohen Rinderdichte mit einer beträchtlichen Durchseuchungsrate sollte zunächst letzterer Status erworben werden. Hierbei können die Betriebe unter Impfschutz gestellt werden. Bei der prophylaktischen Impfung ist der Schutz vor einer transplazentaren Infektion und damit das Verhindern der Entstehung von neuen PI-Tieren entscheidend, um die Infektionskette zu durchbrechen. Zur Verfügung stehen sowohl Lebend- als auch inaktivierte Vakzinen. Während Lebendimpfstoffe den sichersten Schutz vor einer intrauterinen Infektion verleihen, steht ihrem Einsatz u. a. das Risiko entgegen, dass sie bei trächtigen Rindern die Frucht schädigen sowie ausgeschieden werden können. Mit dem Einsatz eines sogenannten zweistufigen Impfverfahrens können Risiken weitgehend minimiert werden.

Eine Impfstrategie im Rahmen einer BVD-Bekämpfung ist aber nur dann erfolgversprechend, wenn sie konsequent und systematisch durchgeführt und von flankierenden Maßnahmen (Hygienemanagement im Betrieb, Tierverskehr und -handel, Sanierungskontrollen etc.) begleitet wird.

Abstract

Programs to control bovine viral diarrhoea (BVD) virus infections must be based on the testing and removal of persistently infected cattle. Several programs were successful without the further use of vaccination. In areas with high cattle densities this approach is risky because there is a high probability of reintroduction of the virus. A combination of test and removal strategy with subsequent systematic vaccination to achieve foetal protection could overcome this problem. Two-step vaccination is based on the use of inactivated vaccine followed by a modified live attenuated vaccine booster and has proven to be long lasting and efficient.

1. Bovine Virusdiarrhoe (BVD): Der Erreger und die Krankheit

Der Erreger, das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVD-Virus), gehört zu der Familie der Flaviviren und dort zur Gattung Pestivirus (Übersicht bei BECHER et al. 2001). Das Virus ist verwandt mit dem klassischen Schweinepestvirus und dem bei Schaf und Ziege vorkommenden *Border-Disease*-Virus. Das BVD-Virus zeigt eine deutliche genetische Variabilität und kommt in zwei Spezies vor (BVDV-1 und -2), wobei auch innerhalb einer Spezies beträchtliche Unterschiede vorhanden sein können. Infektionen mit dem BVD-Virus sind häufig, wie bei Untersuchungen zum Vorhandensein von Antikörpern gegen das Virus und damit der Bestimmung der Seroprävalenzen abzulesen ist. Hierbei ist eine positive Korrelation zur „Rinderdichte“ in den betroffenen Regionen zu konstatieren, wobei bei einer hohen Dichte die Seroprävalenzen

deutlich über 80 % liegen können. Daraus wird aber auch ersichtlich, dass eine Infektion mit dem Virus nicht notwendigerweise auch zu einer Erkrankung führen muss.

Obwohl die Infektion eines Rindes mit dem BVD-Virus im Laufe seines Lebens in einzelnen Fällen durchaus dramatisch verlaufen kann, ist doch die wirtschaftliche Bedeutung in der Infektion von tragenden, ungeschützten (seronegativen) und damit empfänglichen Rindern zu sehen, zwar kein häufiges – aufgrund der gerade erwähnten weiten Verbreitung des Virus – aber doch realistisches Szenario. Dem Muttertier selbst wird die Infektion kaum anzumerken sein, jedoch kann es, insbesondere in den ersten Monaten der Trächtigkeit, zu Schädigungen der Frucht kommen. Wie alle Pestiviren überwindet auch das BVD-Virus die Plazentaschranke effizient. Je nach dem Zeitpunkt der Infektion kann dies unterschiedliche Folgen für die Frucht haben. Im frühen Trächtigkeitsstadium kann der Embryo absterben und resorbiert werden, später kommt es zu Aborten, Mumifikationen oder angeborenen Missbildungen. In Einzelfällen schädigt das Virus die Frucht nicht, vermehrt sich jedoch uneingeschränkt. Dies setzt eine Infektion zu einem frühen Zeitpunkt voraus, bevor die Frucht „immunkompetent“ ist. Entwickelt sich das Immunsystem, so wird es das vorhandene Virus als „selbst“ tolerieren, d. h., keine immunologischen Abwehrmechanismen, wie z. B. die Bildung von Antikörpern, gegen den Erreger in Gang setzen. Zusätzlich zur spezifischen Immunantwort manipuliert das BVD-Virus hierbei auch die unspezifischen, „angeborenen“ Immunmechanismen (PETERHANS et al. 2006). Diese Tiere, die lebenslang das Virus in sich tragen (= persistent infizierte Tiere [PI-Tiere], „Virämiker“), scheiden dieses nach der Geburt andauernd in großen Mengen aus. Sie stellen das Virusreservoir dar und sind somit für die Aufrechterhaltung der Infektion in der Rinderpopulation verantwortlich. Ein beträchtlicher Teil der PI-Tiere zeigt nach der Geburt ein schlechtes Wachstum und bleibt in der Entwicklung zurück („Kümmerer“) oder stirbt an der fatalen *Mucosal Disease*, jedoch können solche Tiere auch jahrelang unbemerkt in einer Herde bleiben.

2. BVD-Bekämpfung

Die Bekämpfung der BVD/MD ist in Europa unterschiedlich weit fortgeschritten (SANDVIK 2004, MOENNIG et al. 2005a,b). 2002 wurde von der EU ein „Thematisches Netzwerk zur BVDV-Bekämpfung“ initiiert, dem die meisten EU-Staaten angehören.

Bei jeder Bekämpfungsstrategie stehen die PI-Tiere im Mittelpunkt. Sie müssen in jedem Falle diagnostisch aufgespürt und umgehend aus dem Bestand entfernt werden. Eine Reinfektion des Bestandes muss durch Monitoring-Maßnahmen schnell nachgewiesen werden, alles auf der Basis eines strikten Hygienemanagements (LINDBERG und HOUE 2005).

Im Prinzip sind dann zwei Bekämpfungsoptionen denkbar: Zum einen kann der Status eines BVD-freien Betriebs angestrebt werden. Hier ist der Erreger eliminiert und auch Antikörper gegen das Virus sind nicht (mehr) vorhanden. Eine Impfung ist bei diesem Verfahren nicht vorgesehen. Wie erwähnt, muss die Reinfektion der Herden durch regelmäßige Untersuchungen und strikte Kontrollmaßnahmen verhindert werden. Ein solches Vorgehen wurde mit Erfolg in den skandinavischen Ländern praktiziert, auch in anderen Ländern, z. B. Österreich (ROSSMANITH et al. 2005), wird diese Strategie verfolgt.

Eine zweite Möglichkeit ist die Schaffung BVDV-unverdächtiger Betriebe. Hierunter sind Bestände zu verstehen, in denen kein infektiöses Virus zirkuliert, die aber Antikörper gegen das Virus aufweisen. Hierbei ist die Impfung nicht verboten.

Eine hohe Rinderdichte, wie sie in einigen Regionen der Bundesrepublik anzutreffen ist, z. B. in Niedersachsen (BENDFELDT et al. 2004), korreliert mit der Zirkulation des Feldvirus. Es sind hierbei also Bestände, die die PI-Tiere eliminiert haben, einem zunehmenden Risiko einer Reinfektion ausgesetzt. Hier sollte zunächst der Status eines unverdächtigen Betriebes angestrebt werden, der mittels Impfung aufrechterhalten wird, um mögliche (hohe) wirtschaftliche Schäden zu vermeiden.

3. Impfstoffe und Impfmaßnahmen im Rahmen der Bekämpfung

Bei der prophylaktischen Impfung, insbesondere mit dem Fernziel der Sanierung, ist der Schutz der Frucht vor einer transplazentaren Infektion, der sogenannte fetale Schutz, und damit das Verhindern der Entstehung von neuen PI-Tieren entscheidend, um die Infektionskette zu durchbrechen. An diesem Anspruch müssen sich Impfstoffe und -programme messen lassen, wobei es 100%ige Protektion nicht geben kann (BEER und WOLF 2003).

Zur Verfügung stehen sowohl Lebend- als auch inaktivierte Vakzinen. Lebendimpfstoffe, die sich nach der Applikation noch systemisch im Tier vermehren können, imitieren am effektivsten die natürliche Infektion. Da sie neben der humoralen auch die zelluläre Immunreaktion stimulieren, die auch gegen gut konservierte interne Virusproteine und Nicht-Strukturproteine gerichtet ist (COLLEN et al. 2002), ist eine „breite“ Immunitätslage zu erwarten, die insbesondere für den Schutz vor heterologen BVD-Viren von Bedeutung sein dürfte, denn BVD-Viren zeichnen sich, wie eingangs erwähnt, durch eine beträchtliche antigene Diversität aus, was nicht ohne Konsequenzen für die Impfstoffentwicklung ist (FULTON et al. 2003, KÖNIG et al. 2003). Lebendimpfstoffe verleihen auch den sichersten fetalen Schutz, jedoch steht ihrem Einsatz u. a. das Risiko entgegen, dass sie bei Anwendung im frühen Trächtigkeitsstadium zu einer Schädigung der Frucht führen können. Auch eine Ausscheidung des Impfvirus, welches dann eventuell zur ungewollten Infektion seronegativer, trächtiger Rinder im ersten Trimester der Gravidität führen kann, muss in Betracht gezogen werden. Weiterhin führen sie zu einer vorübergehenden Leukopenie, wobei die Zahl der weißen Blutkörperchen im peripheren Blut verringert ist. Lebendimpfstoffe sind im „Handling“ zudem etwas anspruchsvoller, z. B. hinsichtlich ihrer Thermostabilität. In Einzelfällen kann die Impfung von PI-Tieren mit Lebendimpfstoffen eine tödliche *Mucosal Disease* provozieren.

Totimpfstoffe (inaktivierte Impfstoffe) enthalten kein vermehrungsfähiges Virus. Sie sind sicher im Sinne von Unschädlichkeit. So können sie zu jedem Zeitpunkt der Trächtigkeit eingesetzt werden. Auf der anderen Seite stimulieren sie das Immunsystem nicht so gut und müssen daher öfter verabreicht werden – und das bei gegenüber Lebendimpfstoffen höheren Kosten. Ihre Wirkung basiert insbesondere auf der Stimulierung der humoralen Immunität. Diese beruht bei der BVD-Virusinfektion vor allem auf der Generierung von neutralisierenden Antikörpern, die gegen das immundominante Hüllglykoprotein E2 gerichtet sind. Da dieses Protein jedoch bei den einzelnen BVDV-Stämmen deutlich variieren kann, ist eine Wirkung gegen wenig verwandte Feldviren unter Umständen gering ausgeprägt. Aus diesem Grunde ist auch die Frage des fetalen Schutzes insbesondere gegen solche heterologe Feldviren kritisch zu hinterfragen.

Aus dem Gesagten wird klar, dass gegenwärtig kein „idealer“ Impfstoff für die BVD-Bekämpfung existiert. Ansätze zur Herstellung attenuierter Viren mittels reverser Genetik, Deletions- und Rekombinationsvakzinen erlauben neue Perspektiven (BECHER und THIEL 2005), jedoch sind solche Impfstoffe noch nicht verfügbar.

Mit dem Einsatz eines sogenannten zweistufigen Impfverfahrens können die Vorteile der Impfstoffe weitgehend optimiert und die Risiken gleichzeitig überschaubar gehalten werden (MOENNIG et al. 2005a). Hierbei werden Rinder vor der ersten Belegung zunächst mit einer Totvakzine geimpft, und etwa vier Wochen später mit einem Lebendimpfstoff „geboostert“. Aufgrund des Priming-Effektes durch die Totvakzine erfolgt eine sehr schnelle Immunantwort. Zumindest im Experiment konnte keine Ausscheidung des Impfvirus nachgewiesen und ein fetaler Schutz gezeigt werden (FREY et al. 2002). Gegebenenfalls kann eine zusätzliche (jährliche) Nachimpfung bereits grundimmunisierter Rinder mit einer Totvakzine durchgeführt werden.

Auch bei dem Einsatz der Impfung muss sichergestellt werden, dass keine Reinfektionen, gewissermaßen unter der „Impfdecke“, im Bestand erfolgen. Dies könnte beispielsweise durch regelmäßige „Jungtierfenster“-Untersuchungen erfolgen.

4. Fazit

Die bevorstehende Bekämpfung aufgrund einer BVD-Verordnung in der Bundesrepublik Deutschland wird die Option einer Impfung beinhalten. Hiermit können in der Anfangsphase der Sanierung in rinderreichen Regionen Bestände ohne PI-Tiere vor einer Reinfektion mit beträchtlichen wirtschaftlichen Konsequenzen geschützt werden. Sobald durch die Elimination der PI-Tiere und Impfung dem Virus die Vermehrungsgrundlage entzogen wurde, kann in einer zweiten Bekämpfungsphase die Impfung eingestellt werden, damit die Betriebe den Status der BVD-Freiheit anstreben können.

Eine Impfstrategie im Rahmen einer BVD-Bekämpfung ist jedoch nur dann erfolgversprechend, wenn sie konsequent und systematisch durchgeführt und von flankierenden Maßnahmen (striktes Hygienemanagement im Betrieb, Regulierung von Tierverkehr und -handel, Monitoring etc.) begleitet wird.

Literatur

- BEER, M., und WOLF, G.: Impfstoffe zum Schutz gegen eine Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD): Eine kurze Übersicht. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 116, 252–258 (2003)
- BECHER, P., KÖNIG, M., und THIEL, H.-J.: Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease: Molekularbiologie des Erregers, Pathogenese, Labordiagnostik und Bekämpfung. *Tierärztl. Praxis* 29 G, 266–275 (2001)
- BECHER, P., und THIEL, H.-J.: Impfung gegen Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BVD/MD): Gegenwärtiger Stand und Perspektiven. *Tierärztl. Umschau* 60, 463–468 (2005)
- BENDFELDT, S., GRUMMER, B., HAAS, L., STAUBACH, C., MOENNIG, V., und LIESS, B.: Unterschiedliche BVD-Seroprävalenzen in vier niedersächsischen Landkreisen und ihre Bedeutung für die Wahl der Kontrollstrategie. *Tierärztl. Umschau* 59, 499–507 (2004)
- COLLEN, T., CARR, V., PARSONS, K., CHARLESTON, B., and MORRISON, W. I.: Analysis of the reservoir of cattle CD4⁺ T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 235–238 (2002)
- FREY, H.-R., EICKEN, K., GRUMMER, B., KENKLIES, S., OGUZOGLU, T. C., and MOENNIG, V.: Foetal protection against bovine virus diarrhoea virus after two-step vaccination. *J. Vet. Med. B* 49, 489–493 (2002)
- FULTON, R. W., RIDPATH, J. F., CONFER, A. W., SALIKI, J. T., BURGE, L. J., and PAYTON, M. E.: Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals* 31, 89–95 (2003)
- KÖNIG, M., CEDILLO ROSALES, S., BECHER, P., und THIEL, H.-J.: Heterogenität ruminanter Pestiviren: Akademisches Interesse oder wichtige Grundlage für die Entwicklung von Impfstoffen und Diagnostika? *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 116, 216–221 (2003)

- LINDBERG, A., and HOUE, H.: Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* 72, 55–74 (2005)
- MOENNIG, V., EICKEN, K., FLEBBE, U., FREY, H.-R., GRUMMER, B., HAAS, L., GREISER-WILKE, I., and LIESS, B.: Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev. Vet. Med.* 72, 109–114 (2005a)
- MOENNIG, V., HOUE, H., LINDBERG, A., and THIERMANN, A.: Die Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhoe in Deutschland und Europa. *Tierärztl. Umschau* 60, 651–664 (2005b)
- PETERHANS, E., JUNGI, T. W., und SCHWEIZER, M.: Wie das Bovine Virusdiarrhoe-Virus das Immunsystem überlistet. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 113, 124–129 (2006)
- ROSSMANITH, W., JANACEK, R., and WILHELM, E.: Control of BVD-infection on common grassland – The key for successful BVDV-eradication in Lower Austria. *Prev. Vet. Med.* 72, 133–137 (2005)
- SANDVIK, T.: Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 20, 151–169 (2004)

Prof. Dr. Ludwig HAAS
Institut für Virologie, Zentrum für Infektionsmedizin
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 17
30559 Hannover
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 511 9538860
Fax.: +49 511 9538898
E-Mail: ludwig.haas@tiho-hannover.de

Der Knochen als Archiv

Leopoldina-Meeting

vom 9. bis 10. März 2006 in München

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 94, Nr. 348

Herausgegeben von Bernd HERRMANN (Göttingen), Werner LINSS (Jena) und Reinhard PUTZ (München)

(2007, 144 Seiten, 69 Abbildungen, 5 Tabellen, 24,95 Euro,

ISBN-13: 978-3-8047-2371-9)

Als hochaktives Organ des Stoffwechsels und zugleich kompaktes, lange Zeiträume überdauerndes Material ist der Knochen in vielfältiger Weise Träger unterschiedlichster Informationen. Einerseits wurden Knochen – sei es von Tieren oder vom Menschen – von frühen Kulturen bis heute immer wieder als Werkstücke für die Herstellung von kunsthandwerklichen Schriftträgern und Objekten benutzt, andererseits spiegeln Struktur und Architektur der Knochenmatrix sowie ihr molekularer Aufbau getreu die Einflüsse der täglichen Umwelt wider und lassen uns einen Blick zurück in die Umweltsituation vergangener Epochen werfen. Das hohe Maß an Reaktionsfähigkeit des gesunden wie des kranken Knochengewebes geben uns Einblicke in die individuelle Geschichte der Beanspruchung des einzelnen Knochens und lassen uns die Mechanismen der Evolution des Skeletts besser verstehen.

Die Beiträge spannen daher den Bogen von den Fossilarchiven der Hominisation, über Tierknochen als Archive für Klima und Landschaft, aber auch als molekulares Archiv, genetische Komponenten ihrer Struktur, Geo- und Bioelemente in Knochen, den Werkstoff Knochen, den Knochenersatz und die Determinanten mechanischer Kompetenz der Knochen bis hin zur forensischen Bedeutung und der Darstellung von Knochen in der Grabdenkmalkunst.

In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

BVDV-Antigen und -Antikörper in Blut und Gewebe

Georg WOLF (München)

Mit 1 Tabelle

Zusammenfassung

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) kann grundsätzlich jede stoffwechselaktive Zelle infizieren. Die komplexe spezifische Immunantwort des infizierten Wirtes kontrolliert die Infektion und führt zur transienten Infektion mit vermutlich vollständiger Viruseliminierung. Infektionen von Rinderembryonen vor der Entwicklung einer spezifischen Immunkompetenz führen zur zentralen Immuntoleranz und damit lebenslang zur persistenten Infektion (PI). Kenntnisse zur nachweisbaren Menge an BVD-Virus, -Antigen, -RNA und -Antikörpern in relevanten Probenmaterialien vom lebenden Tier sind grundlegend für die Diagnose der unterschiedlichen Infektionszustände.

Abstract

Basically, the virus of bovine virus diarrhoea (BVDV) can attack any cell actively involved in metabolic processes. The complex specific immune response of the infected host controls the infection and leads to transient infection with presumably complete elimination of the virus. Infections of cattle embryos before the development of a specific immune competence cause central immune tolerance and therefore lifelong persistent infection (PI). Knowledge of the detectable level of BVD virus, BVD antigen, BVD RNA and BVD antibodies in relevant sample material of living animals is therefore a precondition of the diagnosis of different states of the infection.

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) kann grundsätzlich jede stoffwechselaktive Zelle infizieren. Ein zelluläres Rezeptormolekül wird auf allen Wirtszellen exprimiert (CD 46, vgl. RÜMENAPF und KREY 2008). Die langfristige Persistenz einer Infektion mit nicht zytotoxischen Feldstämmen in der Zellkultur und im immuntoleranten Tier ist möglich, ohne dass dabei eine relevante funktionelle Beeinträchtigung zu beobachten wäre. Die Infektion einer Zelle ist daher nicht limitiert. Die komplexe spezifische Immunantwort des infizierten Wirtes kontrolliert die Infektion und führt zur transienten Infektion mit vermutlich vollständiger Viruseliminierung. Infektionen von Rinderembryonen vor der Entwicklung einer spezifischen Immunkompetenz führen zur zentralen Immuntoleranz und damit lebenslang zur persistenten Infektion (PI). Diese PI-Rinder vermehren in allen endo-, meso- und ektodermalen Geweben BVDV, sie entwickeln weder Antikörper noch spezifische T-Zell-Reaktionen gegen ihren BVDV-Stamm. Meist sind diese Tiere klinisch gesund.

Kenntnisse zur nachweisbaren Menge an BVD-Virus, -Antigen, -RNA und -Antikörpern in relevanten Probenmaterialien vom lebenden Tier sind grundlegend für die Diagnose der unterschiedlichen Infektionszustände. Hierzu wird der zeitliche Verlauf der Antigen- und Antikörpermengen im Tier bei Infektionsversuchen mit verschiedenen BVDV-Stämmen (BVDV 1 und BVDV 2) dargestellt. Als Goldstandards wurden die Virusisolierung und der Serumneutralisationstest (SNT) angewandt. BVDV NS2/3 wurde in Leukozyten mit Immunfluoreszenz (Zytofluorometrie) und ELISA untersucht. BVDV Erns wurde im Serum und

in Hautgewebeproben mittels ELISA getestet. Ein indirekter ELISA-Test und Anti-BVDV NS2/3 Blocking-ELISAs dienen zum Antikörpernachweis (BVDV-PCR-Ergebnisse siehe HOFFMANN et al. 2008).

Transiente Infektionen naiver Rinder mit Feldstämmen sind zuverlässig mittels Virusisolierung aus Blutleukozyten oder Schleimhautabstrichen (Nase und Genitale) bei niederen Virustitern zwischen Tag 4 und 8 *post infectionem* (p. i.) nachweisbar. Alle Antigentests sind unzuverlässig. Antikörper sind frühestens am 10. Tag p. i. mit SNT oder NS2/3-Blocking-ELISA messbar, zuverlässig sind diese Tests ab zwei Wochen p. i., wohingegen der indirekte ELISA erst ab drei Wochen p. i. sicher anspricht.

Persistent infizierte immuntolerante Rinder weisen grundsätzlich sehr hohe Mengen Antigen im Blut und in allen Geweben auf. Eine aktive Bildung von Antikörpern gegen den Persistenzstamm ist nicht möglich. Maternale Antikörper können jedoch die Menge nachweisbaren Antigens empfindlich stören. Rinder, die nicht selbst PI sind, jedoch PI-Kälber gebären, entwickeln aufgrund der hochgradigen Immunstimulation durch Virus vom Fötus in der zweiten Hälfte der Gravidität sehr hohe Mengen BVDV-spezifischer Antikörper. Bereits vor der Kolostrumaufnahme sind bei den PI-Kälbern geringe Mengen BVDV-spezifischer Antikörper im Serumneutralisationstest und im NS2/3-Blocking-ELISA nachweisbar. Im Kolostrum sind SNT-Titer $>1 : 500\,000$ messbar. Über das Kolostrum wird eine extrem hohe virusneutralisierende Aktivität auf das Kalb übertragen (SNT-Titer bis $1 : 1\,000\,000$). Mit NS2/3-Blocking-ELISAs sind bei einigen PI-Tieren mindestens bis zum 200. Lebenstag Antikörper nachweisbar. Die BVDV-Antikörper in Blutproben stören die Virusisolierung und BVDV-Antigennachweise. Eine Separation der Antikörper durch mehrmalige Wäsche der Leukozytenfraktion erhöht die Sensitivität der Antigennachweise und der Virusisolierung bei qualitativ guten Blutproben. Bei toten Leukozyten wird die Membran für Antikörper permeabel, so dass auch intrazelluläre Antigene gebunden werden.

Die Virusneutralisation im Kalb führt zur drastischen Reduktion infizierter Leukozyten im peripheren Blut. Die Zahl BVDV-antigenhaltiger Blutleukozyten (hoch effizient gewaschene, lebende Zellen; FACS-Analyse) sinkt innerhalb weniger Tage unter die Nachweisgrenze. Nach individuell sehr unterschiedlicher Zeit werden Ausgangswerte von ca. 20% – 40% BVDV-antigenhaltiger Zellen wieder erreicht. Auch mit Hilfe der Virusisolierung, der RT-PCR (PETERHANS, Virologie Universität Bern; GAEDE, Stendal; HOFFMANN und BEER, FLI Riems) und in allen verfügbaren Antigen ELISAs konnte dieses Phänomen einer „diagnostischen Lücke“ bei Blutproben junger PI-Tiere beobachtet werden.

Immunhistochemische Untersuchungen mit Hautstanzproben ermöglichen auch in der kolostralen Phase eine zuverlässige Diagnose (EHRENSPERGER und HILBE, Veterinärpathologie Zürich). Der Laboraufwand ist jedoch vergleichsweise hoch. Alternativ werden derzeit Antigen-ELISAs und PCR-Methoden zur Untersuchung von Hautgewebeproben durchgeführt (siehe FUX et al. 2008, OETTL et al. 2008, TAVELLA et al. 2008).

Die Zeiträume für die kolostrale diagnostische Lücke von PI-Tieren unter Berücksichtigung aller Ergebnisse aus eigenen Laborstudien mit verschiedenen BVDV-Stämmen sind in der Tabelle 1 gelistet (Protokolle werden bei Bedarf zur Verfügung gestellt).

Bei der Interpretation der Zeitangaben in der Tabelle ist zu beachten, dass die präanalytische (Probenidentität und Zustand) und analytische Qualität (Test- und Laborqualität) natürlich einen Einfluss haben.

Tab. 1 Zeiträume für die kolostrale diagnostische Lücke von PI-Tieren unter Berücksichtigung aller Ergebnisse aus eigenen Laborstudien mit verschiedenen BVDV-Stämmen

Material/ Probe	Analyt	Methode	diagnostische Lücke (Alter in Tagen)	Bemerkung
Leukozyten aus stabilisiertem Vollblut	BVDV	Virusisolierung aus ca. 10 ⁶ Leukozyten	10 bis 30	hoch effizient gewaschene Leukozyten mit intakter Zell- membran (bei hämolytischen Proben prüfen!)
	NS2/3 (p125; p80)	Immunfluoreszenz FACS-Analyse, 10 ⁴ Leukozyten	3 bis 90	
		Antigen-ELISA mit lysierten Leukozyten	3 bis 90	
			Kolostrumaufnahme bis 200 (90?)	Leukozytenpräparation nach Herstellerrangabe, ohne Waschschritte
Blutplasma oder Serum	Erns; Erns&p80	Antigen-ELISA	Kolostrumaufnahme bis 60	
	BVDV-RNS (5'-UTR)	RT-PCR	3 bis 40	die RNA-Isolierung ist kritisch; Inhibitorenkontrolle!
EDTA-Blut getrocknete Ohrstanze		RT-PCR	keine (Einzelproben- bearbeitung)	
getrocknete Ohrstanze, Hautbiopsie	Erns; Erns&p80	Antigen-ELISA	keine??	laufende Untersuchungen im Labor und im Feld
	NS2/3	Antigen-ELISA	Kolostrumaufnahme bis 200 (90?)	

Literatur

- FUX, R., MOSSBRUGGER, I., und WOLF, G.: Einflussfaktoren auf die Analyse diagnostischer Ohrstanzen. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 95, Nr. 350, 189 (2008)*
- HOFFMANN, B., GALL, A., SCHIRMEIER, H., und BEER, M.: Nukleinsäure-basierte diagnostische Untersuchungen zum Nachweis von Pestiviren. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 95, Nr. 350, 103–123 (2008)*
- OETTL, J., SCHÖPF, K., MATT, M., DÜNSER, M., WOLF, G., und BREM, G.: Landesweite BVD-Sanierung durch populationsweite Beprobung in Tirol. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 95, Nr. 350, 179–181 (2008)*
- RÜMENAPF, T., und KREY, T.: Frühe Schritte der BVDV-Invasion in die Wirtszelle. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 95, Nr. 350, 37–47 (2008)*
- TAVELLA, A., ZAMBOTTO, P., STIFTER, E., FUGATTI, A., LOMBARDO, D., RABINI, M., ROBATSCHER, E., und BREM, G.: Rückblick über die Umsetzung eines flächendeckenden BVD-Bekämpfungsprogramms mittels Ohrgewebeprobe in der Autonomen Provinz Bozen-Südtirol. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 95, Nr. 350, 153–177 (2008)*

Dr. Georg WOLF
 Institut für Medizinische Mikrobiologie,
 Infektions- und Seuchenmedizin
 der Tierärztlichen Fakultät
 der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Veterinärstraße 13
 80539 München
 Bundesrepublik Deutschland
 Tel.: +49 89 21802533
 Fax: +49 89 21802597
 E-Mail: georg.wolf@micro.vetmed.uni-muenchen.de

**International Conference
Embryonic and Somatic Stem Cells –
Regenerative Systems for Cell and Tissue Repair**

Organisiert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina
vom 24. bis 27. September 2006 in Dresden

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 95, Nr. 352
Herausgegeben von Volker TER MEULEN (Würzburg – Halle/Saale) und
Anna M. WOBUS (Gatersleben)
(2006, 244 Seiten, 1 Abbildung, 21,95 Euro, ISBN-10: 3-8047-2351-9,
ISBN-13: 978-3-8047-2351-1)

Gegenwärtig gehört die Stammzellforschung zu den spannendsten und aktuellsten Wissensgebieten. Stammzellen bezeichnen Körperzellen von Mensch und Tier, die noch nicht ausdifferenziert sind, so dass ihre spätere Verwendung im Organismus noch offen ist. Sie unterscheiden sich nach ihrem Differenzierungspotential und ihrem ontogenetischen Alter. Außer den viel diskutierten embryonalen Stammzellen, deren Gewinnung (bei menschlichen Zell-Linien umstrittene) Embryonenforschung voraussetzt, gibt es auch somatische Stammzellen, die ethisch unproblematisch erforscht werden können. Über die verschiedenen Potentiale beider Formen werden zur Zeit viele Erkenntnisse gesammelt. Die Jahreskonferenz 2006 der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina diskutiert Fragen der Stammzellforschung im Hinblick auf naturwissenschaftliche, medizinische und ethische Probleme (z. B. therapeutisches Klonen), um ein Verständnis der molekularen Mechanismen und Regulationsprozesse in Stammzellen und differenzierten Zellen zu erreichen. Dabei stehen außer Resultaten der Grundlagenforschung (z. B. der Rolle bestimmter Gen-Netzwerke) auch mögliche Perspektiven für eine bessere Erforschung und Therapie solcher Krankheiten wie Krebs, Diabetes mellitus, Parkinson-Erkrankung und Alzheimer-Demenz im Vordergrund. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

III. BVDV-Diagnostik

Identitätssicherung in der Tierseuchenbekämpfung

Gottfried BREM ML (Wien)

Mit 4 Abbildungen

Zusammenfassung

Der Erfolg von Maßnahmen im Bereich der Tierseuchenbekämpfung auf Populationsebene ist davon abhängig, dass die erhobenen Daten und Tieridentitäten fehlerfrei vorliegen. Im Bereich der Labordiagnostik wird dies durch elektronische Erfassung sichergestellt. Kritisch sind aber konventionell erhobene Daten zur Tieridentität. Das Ziel muss sein, dass die Erfassung der Tieridentität eindeutig und fehlerfrei den Proben zugeordnet wird. Eine Probenahme, die in einem Arbeitsgang mit der Kennzeichnung von Tieren mittels offizieller Ohrmarken in identisch vorbeschriftete Behälter erfolgt, erfüllt diese Bedingung. Auf Basis der offiziellen Kennzeichnung wird in Deutschland für alle Rinder ein Pass ausgestellt, der das Tier begleitet. Für Tierseuchen, bei denen eine diagnostisch relevante Probenziehung bei der Kennzeichnung der Tiere erfolgen kann, kann das Ergebnis in den Tierpass eingetragen werden und somit das Tier begleiten. Für BVD kann durch Untersuchung von Ohrstanzgewebe ein Virusnachweis geführt werden. Sobald alle geborenen Kälber beprobt und diagnostiziert werden, kann bereits bei der Ausstellung des Tierpasses der BVD-Befund als Information aufgenommen werden. Damit wird die Ausstellung eines gesonderten Handelszertifikates überflüssig, und das Tier „reist“ mit seinem Tierpass als BVD-Befund. Ein positiver PI-Status eines Tieres und der Nachkommen weiblicher Tiere kann wie ein genetisches Merkmal behandelt werden.

Abstract

Success of measures in the field of animal disease control at the population level depends on the correctness of the collected data and animal identities. In the area of laboratory diagnostics this ensured by electronic recording. Critically, however, are conventional collected data for animal identity. The goal must be that the collection of animal identity is clearly and flawless associated with the samples. A sampling, in a single pass with the identification of animals by means of official eartags in the same pre-labeled containers, meets this condition. On the basis of official identification in Germany for all cattle a passport is issued, which accompanies the animal. For animal diseases, in which diagnostically relevant samples collected during the identification of the animals, the result can be registered in the bovine passport, and therefore will accompany the animal. For BVD by investigating an earpunch sample a virus diagnostic can be done. Once all calves born will be diagnosed after sampling, already in issuing the passport the result of the BVD status can be used. Thereby the issue of a separate trade certificate is unnecessary and the animal “travels” with its passport as a BVD certificate. A positive PI-status of animal and the offspring of a female animal can be treated like a genetic trait.

1. Einleitung

Die Erkenntnisse und Entwicklungen der Molekulargenetik im 20. Jahrhundert und die Weiterentwicklungen dieser Technologien werden auch in der Tierproduktion zu epochalen Veränderungen führen. Molekulargenetisch gestützte Techniken erlauben bereits jetzt signifikante Optimierungen in allen Bereichen der Züchtung. In den kommenden Jahren und Jahrzehnten wird das Methodenspektrum molekulargenetischer Analysen auch bei der Verhinderung, Behandlung und Bekämpfung von Krankheiten und Seuchen von Nutztieren eine immer größer werdende Rolle spielen (BREM 2006).

Neben neuen diagnostischen und therapeutischen Verfahren ermöglicht die Identitätssicherung auf molekularer Ebene eine bislang nicht vorhandene Präzision bei der Zuordnung von individuellen Daten zu eben diesen Individuen. Voraussetzung dafür ist die umfassende populationsweite Verfügbarkeit von fehlerfrei gewonnenen individualisierten Proben, die zuverlässig und uneindeutig zuordenbar gewonnen und konserviert werden. Insbesondere bei der Bekämpfung und Eradikation von Tierseuchen ist es unerlässlich, dass die von Tieren in der Population gewonnenen Proben frei von systemimmanenten Fehlerquellen wie Verwechslungen und Vertauschungen sind, die bei manueller Datenerfassung und weiteren Verarbeitung unvermeidbar auftreten.

Am Beispiel der in Tirol (OETTL et al. 2008) und Südtirol (TAVELLA et al. 2008) begonnenen Eradikation des BVD-Virus aus den Rinderpopulationen soll nachfolgend gezeigt werden, wie eine moderne Probengewinnung und die damit verknüpfte Identitätssicherung zum Erfolg solcher Bekämpfungsprogramme beitragen können.

Der Erfolg von Maßnahmen im Bereich der Tierseuchenbekämpfung auf Populations-ebene ist in starkem Umfang davon abhängig, dass die Tieridentitäten und die ihnen zugeordneten Daten und Ergebnisse der Analysen zweifels- und fehlerfrei erhoben und bearbeitet werden (BREM 1998). In modern ausgestatteten und konsistent geführten Labors ist die Weiterverarbeitung von bereits erfassten Identitätsdaten und ihre Verknüpfung mit den im Labor erarbeiteten Ergebnissen kein Problem, da dies durch Zertifizierung und gegebenenfalls auch Akkreditierung der Arbeitsabläufe sichergestellt wird. Dazu wird in aller Regel im Labor ein Ablauf vorgegeben, der vom Eingang der Probe bis zur Herausgabe der Befunde durch elektronische Erfassung (Barcode, 3-D-Code, elektronische Markierung etc.) der Proben und Laborergebnisse fehlerfrei funktioniert und lückenlos dokumentiert.

Kritisch zu sehen sind hingegen die Daten zur Tieridentität. Hier gibt es bei konventionellen Verfahren eine Reihe von Fehlermöglichkeiten, insbesondere bei der Erfassung der Tieridentität, der Übertragung dieser Identität auf das jeweilige Probengefäß, bei der Gewinnung der Probe und schließlich beim Einbringen dieser Daten in das Laborinformationssystem. Bei handschriftlichen Aufzeichnungen oder Übermittlungen und deren „händischer“ Übernahme in EDV-Dateien bzw. Datenbanken entstehen durch missverständliches oder falsches Aufschreiben, Ablesen oder Eingeben geradezu zwangsläufig Fehler (Zahlendreher, Verwechslungen etc.). Diese Fehler sind systemimmanent unvermeidbar und außerdem extrem schwer zu finden bzw. meist nur mit enormem Aufwand zu bereinigen.

Im Sinne einer populationsweiten Tierseuchenbekämpfung ist es deshalb unerlässlich, die Erfassung der Tieridentität in vergleichbarer Weise wie die Weiterverarbeitung von Daten im Labor zu gestalten, um Fehler zuverlässig zu unterbinden. Nur dann können Befunde uneindeutig den richtigen Tieren zugeordnet bzw. verwendet werden und auch über Tierpässe oder vergleichbare Datenhandhabung genutzt werden.

2. Ausgangssituation

In den Jahren 2002 und 2003 wurden mit Unterstützung des Verbraucherschutzministeriums des Freistaates Bayern in ausgewählten BVDV-verdächtigen Betrieben Blut- und TypiFix®-Ohrstanzproben gewonnen. Die Untersuchung der Blut- und Gewebeproben erfolgte unabhängig voneinander im Institut für Mikrobiologie (Dr. WOLF) mittels ELISA, RT-PCR und FACS- Analyse und im Labor der Fa. Agrobiogen (Dr. VEIT) mittels ELISA. In Zusammen-

arbeit mit dem Veterinäramt Ostallgäu (Dr. LUDWIG und Dr. GÖTZ) wurden von 665 Kälbern Blut- und Gewebeprobe gewonnen und auf BVDV untersucht. Insgesamt wurden 40 PI-Tiere entdeckt. In 40 Ohrgewebeprobe konnten BVDV-Antigene nachgewiesen werden, und in 39 Blutuntersuchungen wurde ebenfalls BVDV festgestellt. In einem Fall stimmten das Ergebnis der Blut- und der Ohrgewebeuntersuchung nicht überein. Die Gewebeprobe war BVDV positiv, die Blutprobe BVDV negativ. Bei der Nachuntersuchung einer umgehend durchgeführten Zweitprobe zeigte sich, dass es bei der Blutprobengewinnung offensichtlich bei der Erstprobe zu einer Verwechslung gekommen war, denn bei der Zweitprobenanalyse war auch diese Blutprobe BVDV positiv.

In einem weiteren Feldversuch im Jahr 2004 wurden in Tirol (Dr. WALLNÖFER) von 80 BVDV-verdächtigen Tieren und Nachkommen sowohl Blut als auch TypiFix®-Ohrgewebeprobe gewonnen. 52 Tiere dieser Auswahlgruppe waren in der Ohrgewebeprobe BVDV positiv, in der Blutprobe waren 50 Tiere BVDV positiv. Die Nachuntersuchung einer Zweitprobe der beiden Tiere mit unterschiedlichem Ergebnis bestätigte bei der zweiten Gewebeprobe das positive BVDV-Ergebnis der Erstuntersuchung der Gewebeprobe und zeigte nun auch bei der Blutprobe ein BVDV-positives Ergebnis. Auch hier war es offensichtlich bei der ersten Blutprobengewinnung zu einer wie auch immer entstandenen Verwechslung gekommen.

Zusammenfassend zeigten diese Feldstudien, dass bei insgesamt 92 PI-Tieren in drei Fällen das Ergebnis der Blutuntersuchung auf Grund von Verwechslungen zu einer falsch negativen BVDV-Diagnose geführt hatte. Dies ist, selbst wenn der Anteil an falsch negativen Ergebnissen nicht immer so hoch sein sollte, eine für eine umfassende und zielgerichtete Eradikation von BVDV völlig unzureichende Situation. Insbesondere bei rückläufiger Persistenz des BVD-Virus, wie sie sich in laufenden Bekämpfungsprogrammen mit der Zeit einstellt, und der damit verbundenen Abnahme von adulten Tieren mit BVD-Antikörpern entsteht ein immer größer werdendes ökonomisches Risiko durch Neueinschleppung von BVDV in Antikörper-freie Bestände, das dann zu wesentlich höheren Verlusten und Schadensfällen führt als in durchsuchten Populationen (WOLF 2008). Oder mit anderen Worten ausgedrückt: Je weiter fortgeschritten ein Eradikationsprogramm in einer Population ist, umso gefährlicher und schädlicher wirken sich falsch negative Ergebnisse aus (WOLF 2008).

3. Methodik der BVDV-Probengewinnung für tierseuchenrechtlich relevante Analysen

Eine absolut sichere und zuverlässige Möglichkeit der Probengewinnung ist immer nur dann gegeben, wenn die Probennahme am Tier simultan mit einer Kennzeichnung des beprobten Tieres erfolgt, wenn also die dabei verwendeten Probenbehälter und Kennzeichnungsmittel vorab identisch beschriftet oder elektronisch markiert und elektronisch erfasst bzw. erfassbar sind. Nur eine Probennahme, die in einem Arbeitsgang gleichzeitig mit der Kennzeichnung des Tieres mittels offizieller Ohrmarken (Abb. 1) eine Probe in einen identisch beschrifteten Behälter einbringt und diese gleichzeitig und ohne weitere Eingriffsmöglichkeit in diesem Behälter versiegelt, erfüllt letztendlich diese Bedingung. Eine unmittelbar nach der Gewinnung am Tier durch den Probennehmer mögliche oder gar notwendige Handhabung der Probe zum Verpacken erfüllt diese Bedingung in keiner Weise, da es hierbei einerseits unabsichtlich zu Verwechslungen kommen kann und andererseits Manipulationen nicht ausgeschlossen



Abb. 1: Offizielle Kennzeichnung und Beprobung eines neugeborenen Kalbes für die BVD-Diagnose mittels Gewebeentnahme-Ohrmarke

werden können. Außerdem besteht die Gefahr der Kontamination der Probe durch Kontakt mit Material, das direkt oder indirekt von anderen Tieren stammen kann. Dadurch ist die Zuverlässigkeit der Individualität der Probe nicht mehr gewährleistet.

Für die Tierkennzeichnung mittels Ohrmarken ist dies zumindest beim Rind schon seit einigen Jahren in der EU bereits der Fall. Auf Basis der offiziellen Kennzeichnung wird für alle Rinder von den zuständigen Behörden in Deutschland ein Pass ausgestellt, der das Tier dann bei allen Transporten/Besitzerwechseln begleitet.

Für Tierseuchen, bei denen eine diagnostisch relevante Probenziehung bei der Kennzeichnung der Tiere erfolgen kann, ist damit eine qualifizierte – sprich eindeutige – Zuordnung des Befundes zur Identität des Tieres erreichbar. Das Ergebnis des Befundes kann in den Tierpass eingetragen werden und somit das Tier begleiten.

Die in Tirol und Südtirol durchgeführten Entnahmen von Ohrstanzproben erfüllten diese Vorgabe weitgehend, aber noch nicht vollständig. In Tirol wurde bei der Probenentnahme (durch beauftragte Tierärzte) eine Kennzeichnung des beprobten Tieres mit einer dritten (kleineren) Ohrmarke vorgenommen. In Südtirol wurde von den beauftragten Tierkennzeichnern ein identisch mit der offiziellen Ohrmarke beschrifteter Probensammelbehälter verwendet, um unmittelbar beim Vorgang der offiziellen Kennzeichnung eine Probe zu gewinnen. In bei-

den Systemen gibt es eine geringe, aber doch vorstellbare Restunsicherheit im Hinblick auf Verwechslungen. Auch ist der Arbeitsaufwand für diese Art der Probengewinnung höher. In Tirol und wohl auch in Südtirol wird deshalb das System zum 1. Januar 2008 auf eine simultane Probenentnahme umgestellt, bei der die Probe tatsächlich während des Einziehens der nach Viehverkehrsordnung offiziellen Kennzeichnungsmarke erfolgt.

Für BVD (Bovine Virus-Diarrhoe) kann durch Untersuchung von Hautproben (THÜR et al. 1996) oder von Ohrstanzgewebe ein Virusnachweis geführt werden (KÜHNE et al. 2004, HOLMQUIST et al. 2004, KÜHNE et al. 2005a,b, SCHROEDER et al. 2005). Unter der Voraussetzung, dass die Diagnostik alle Virusträger sicher erkennt, können alle nicht persistent infizierten (PI) Tiere mit diesem Befund in der Datenbank als solche gekennzeichnet werden und über die auf dieser Basis ausgestellten Handelszertifikate auch frei gehandelt werden. Bei gesicherter Mutterschaft kann auch das Muttertier als Nicht-PI-Tier zertifiziert und gehandelt werden.

Sobald ausnahmslos alle geborenen Kälber beprobt werden und eine flächendeckende und zeitnahe Diagnostik gewährleistet ist, kann bereits vor bzw. bei der Ausstellung des Tierpasses der BVD-Befund als Information aufgenommen werden. Damit wird die Ausstellung eines gesonderten Handelszertifikates überflüssig, und das Tier „reist“ von Anfang an mit seinem Tierpass als BVD-Befund. Gleiches gilt dann auch für PI-Tiere, wobei der Erstbefund als vorläufig gewertet werden kann. Neben einer restriktiven vorläufigen Verbringungsregelung erfordert dies dann gegebenenfalls nach einer Bestätigung des PI-Befundes anschließend die konsequent anzuordnende Schlachtung.

Das BVDV-Ergebnis kann für das untersuchte Tier wie ein genetisches Merkmal behandelt werden, da sich der Status – PI-Tier oder nicht PI-Tier – für dieses Tier Zeit seines Lebens nicht mehr ändert, weil die Tiere von Geburt an und Zeit ihres Lebens die genetische Information des BVD-Virus enthalten. Bei Nachkommen von weiblichen PI-Tieren gilt das sogar auch für die nächste Generation, da PI-Tiere immer PI-Tiere gebären.

4. Probengewinnung in Nutztierpopulationen

Grundsätzlich eignen sich alle Kern (DNA)-haltigen Zellen eines Organismus für die Gewinnung von Proben zur genetischen Analyse. In der Forensik werden aus allen nur denkbaren körperlichen Proben und zellhaltigen Flüssigkeiten und Ausscheidungen eines Individuums genetische Fingerabdrücke und DNA-Profile erstellt. Auch bei der Probengewinnung von Nutztieren für genetische Analysen wurden und werden verschiedene Quellen bzw. Probenmaterialien gewonnen und untersucht, wie Blut, Haarwurzeln, Milch, Sperma, Schleimhaut, Hautgeschabsel und Biopsien. Diese Probenmaterialien sind alle für Einzeluntersuchungen mehr oder weniger geeignet. Ist das Ziel aber die qualifizierte Beprobung von Herden oder gar Populationen, so spielen Kriterien wie Arbeitsaufwand für die Probengewinnung, Sicherheit gegen Verwechslung, Gesamtkosten der Probengewinnung, Probenhaltbarkeit bei Raumtemperatur, Geschlechtsabhängigkeit, Altersabhängigkeit, Hochdurchsatzzeichnung im Labor, Menge und Qualität der DNA, Ausfallrate und Kosten im Labor eine wichtige Rolle.

Qualifizierte Probengewinnung bedeutet insbesondere, dass Proben von allen Tieren zuverlässig und fehlerfrei gewonnen und konserviert werden und dass sie uneindeutig zuordenbar sind.

Eine separate Probennahme als reiner Selbstzweck ist zu kompliziert, zu fehleranfällig, zu arbeitsaufwendig und zu teuer. Eine Kombination mit anderen tierzüchterischen oder tier-

ärztlichen Maßnahmen, die zu anderen Zwecken ohnehin durchgeführt werden, ist aus Kostensenkungsgründen wünschenswert, ja geradezu notwendig.

Die biologische Individualität und genetische Einzigartigkeit eines Organismus wird bei der Syngamie von Eizelle und Spermium und der Bildung des diploiden Chromosomensatzes fixiert. Lediglich monozygote Zwillinge (identische mitochondriale DNA) und Klonlinge (partielle Heteroplasmie der mitochondrialen DNA) sind bekannte biologische Besonderheiten mit identischer chromosomaler Individualität. Die administrative Identität erhält ein Individuum üblicherweise erst nach seiner Geburt mittels artifizierlicher Kennzeichnung, die bei unseren Nutztieren heutzutage in aller Regel durch das Anbringen von ein oder zwei Ohrmarken erreicht wird und im **Herkunfts-Informationssystem Tier (HIT)** und gegebenenfalls der Ausstellung eines Rinderpasses (Abb. 2) dokumentiert wird.

Deshalb ist dieser Zeitpunkt für eine Beprobung geradezu ideal. Nach dieser „Beprobungskennzeichnung“ oder „Kennzeichnungsbeprobung“ sind Individualität und Identität untrennbar miteinander gekoppelt, und vor dieser Kennzeichnung und Beprobung gibt es keine legale wirtschaftliche Nutzung des Tieres.

Ungekennzeichnete Tiere dürfen nicht in den Handel gebracht oder verwertet werden. Lediglich ein Transport von Kälbern, die innerhalb der ersten sieben Lebensstage und vor einer Kennzeichnung verwendet sind, zur Tierkörperverwertung ist zulässig.

Ausgebende Stelle im Freistaat Bayern: Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V.  <i>Ranner</i> Ranner Haydnstraße 11, 80336 München Datum der Ausgabe: 28.09.04	Rinderpass gemäß § 24 h der Viehverkehrsverordnung		01101285144
		Ohrmarkennummer DE 09 848 65 005	
		Registrier-Nr. nach § 24 b Viehverkehrsverordnung 09 174 147 0272	
Tierhalter (Name, Vorname, Anschrift) Brem Gottfried Thalmannsdorf 25 86567 Hilgertshausen-Tandern		2. Herkunft des Tieres, sofern nicht aus dem Geburtsbetrieb: Aus folgendem Mitgliedstaat der EU: Aus folgendem Drittland eingeführt: Vom Drittland vergebene Ohrmarkennummer:	
1. Tierdaten Geburtsdatum: 22.09.04  Geschlecht: WEIBLICH Rasse: FLECKVIEH Ohrmarkennummer des Muttertieres: DE 09 83300400		3. Datum der Schlachtung, Verendung oder Tötung des Tieres: [] [] [] [] [] [] [] [] [] []	
5. Bestätigung der Angaben zu 1. und 2. Ort, Datum: <i>Hilgertshausen 28.09.04</i> Unterschrift des Tierhalters: <i>[Signature]</i>		4. Sonderprämie für männliche Rinder beantragt oder gewährt: <input type="checkbox"/> nein <input checked="" type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> 1. Altersklasse/ Einmalprämie <input type="checkbox"/> ¹⁾ 2. Altersklasse <input type="checkbox"/> ¹⁾ Stempel / Unterschrift d. Prämienbehörde <i>[Signature]</i> ^{1) Von der Prämienbehörde auszufüllen}	

Abb. 2 Beispiel eines Rinderpasses gemäß §24 der Viehverkehrsordnung

Wenn die Beprobung simultan mit der Kennzeichnung erfolgt, gibt es keine unbeabsichtigten Verwechslungsmöglichkeiten, und betrügerische Manipulationen werden nachhaltig erschwert, wenn auch nicht gänzlich unmöglich gemacht.

Das Einziehen der Kennzeichnungsohrmarke durch das Ohrgewebe ist ein penetrierender Vorgang und deshalb *per se* hervorragend geeignet zum Ausstanzen einer Haut- (und Knorpel-) probe. Erfolgt die Aufnahme der Stanzprobe in einen Behälter, der die gleiche Identitätsnummer (inklusive Barcode) wie die Ohrmarke trägt, ist die verwechslungsfreie Zuordnung absolut gewährleistet.

Die Probennahme beim Einziehen der Ohrmarke ist logisch und folgerichtig. Die Probennahme bedarf aber einer sehr zuverlässigen und ausgefeilten Technologie, um das zuverlässige Gewinnen einer Probe sicherzustellen. Das Ausstanzen der Probe, also die saubere Durchtrennung von Haut und Knorpel, erfordert eine präzise Abstimmung zwischen Stanzspitze des Ohrmarkendorns, dem Stanzboden und der Aufnahmeeinrichtung. Die lösbare Spitze des männlichen Teils der Ohrmarke wird deshalb als Stanzkopf mit einem scharfen Metallring ausgebildet. Der Stanzkopf wird während des Einziehens durch einen innen liegenden Metalldorn stabilisiert, damit er beim Durchdringen des Ohrgewebes nicht abknicken kann. Auch sichert dieser innere Führungsdorn die exakte Positionierung des Stanzkopfes beim Eindringen in den Probensammelbehälter. Nach dem Eindringen in den Probensammelbehälter verschließt der Stanzkopf den Sammelbehälter luft- und feuchtigkeitsdicht, er verhindert zudem eine nachträgliche Kontamination oder Verunreinigung der Probe sowie eine nicht nachvollziehbare Manipulation der Probenidentität (BREM 1998).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Probennahme ist die Konservierung. Entscheidend ist, dass die Proben in den Probensammelbehältern nicht gekühlt oder gefroren gelagert und transportiert werden müssen, da dies einen unverhältnismäßig hohen logistischen Aufwand, zusätzliche Kosten und Risiken beinhalten würde. Um dies zu erreichen, wird das Prinzip der Mumifikation, in diesem Fall die Austrocknung der Probe durch stark hygroskopische Substanzen, genutzt. Diese Wasser aufnehmenden Substanzen werden im Sammelbehälter vorgehalten und entziehen nach dem Einführen der Probe die Flüssigkeit. Ohne Flüssigkeit arbeiten die zellulären Enzyme nicht, und es wachsen keine Mikroorganismen, d. h., die Probe bzw. die enthaltenen Nukleinsäuren und Proteine werden nicht oder zumindest nicht wesentlich durch Abbau zerstört. Dieses „physikalische“ Prinzip der Konservierung hat darüber hinaus den Vorteil, dass es bei der späteren Isolation und Analyse der Nukleinsäure nicht stört, wie dies bei der Zuführung von konventionellen Konservierungsmitteln (z. B. Salz) der Fall wäre. Durch den unmittelbar bei der Probenentnahme gebildeten geschlossenen Probenraum und den direkten Kontakt mit dem hygroskopischen Material wird die zuverlässige Konservierung der Probe durch Austrocknung sichergestellt.

Mit Hilfe der Ohrstanzprobengewinnung kann eine Rinderpopulation innerhalb von einer Generation durch Probengewinnung bei Neugeborenen erfasst werden! Nach 6 Jahren wären bereits über 95 % aller Tiere systematisch erfasst, die restlichen – über 5 Jahre alten – Tiere könnten im Bedarfsfall nachbeprobte werden, so dass dann die gesamte Population erfasst wäre.

5. Probenaufarbeitung

Die DNA in durch Trocknung konservierten Proben ist nahezu unbeschränkt haltbar. Bei eigenen Versuchen konnte bislang zumindest eine uneingeschränkte Analyse der Proben-DNA

auch noch nach 8 Jahren nachgewiesen werden (BREM 2006). Hinsichtlich der Konservierung von viraler BVDV-RNA und von viralen Antigenen ist innerhalb der ersten 3 Monate keine nennenswerte Beeinträchtigung festzustellen. Längere Lagerungszeiten scheinen aber auf Grund der Sensitivität von RNA und Proteinen nicht unkritisch zu sein. Da jedoch speziell bei BVDV ohnehin ein schnelles und zeitnahes Erkennen der Virusträger (PI-Tiere) das Gebot einer wirksamen Eradikation ist, hat diese zeitlich eingeschränkte Konservierung viraler Komponenten keine praktische Auswirkung.

Zur Untersuchung der mittels Ohrstanzmethode gewonnenen Proben müssen diese unter Wahrung und sicheren Übertragung ihrer Identität aus den Sammelbehältern extrahiert werden. Dazu dienen die auf den Probenbehältern aufgedruckten Codifizierungen, die maschinenlesbar sind und während des Extraktionsprozesses verifiziert werden müssen.

Bei Massenuntersuchungen wird gleichzeitig mit der Extrahierung der Proben eine Überführung der Einzelproben in ein für den Hochdurchsatz übliches 96er Plattenformat vorgenommen. Dazu werden geeignete Laborroboter eingesetzt, die einerseits die Identität der Probe automatisch einlesen und andererseits die Extraktion der Proben und deren Überführung in 96er Platten gewährleisten. Ein Prototyp eines solchen Roboters, wie er in Abbildung 3 gezeigt wird, erlaubt bei Doppelschichten (16 Stunden pro Tag) und 6 Arbeitstagen pro Woche die Extraktion von bis zu 2 Millionen Proben pro Jahr.

Werden die BVDV-Proben mittels ELISA untersucht, können die Platten unmittelbar nach der Probenextraktion mit Puffer beladen und die Untersuchung eingeleitet werden. Bei der

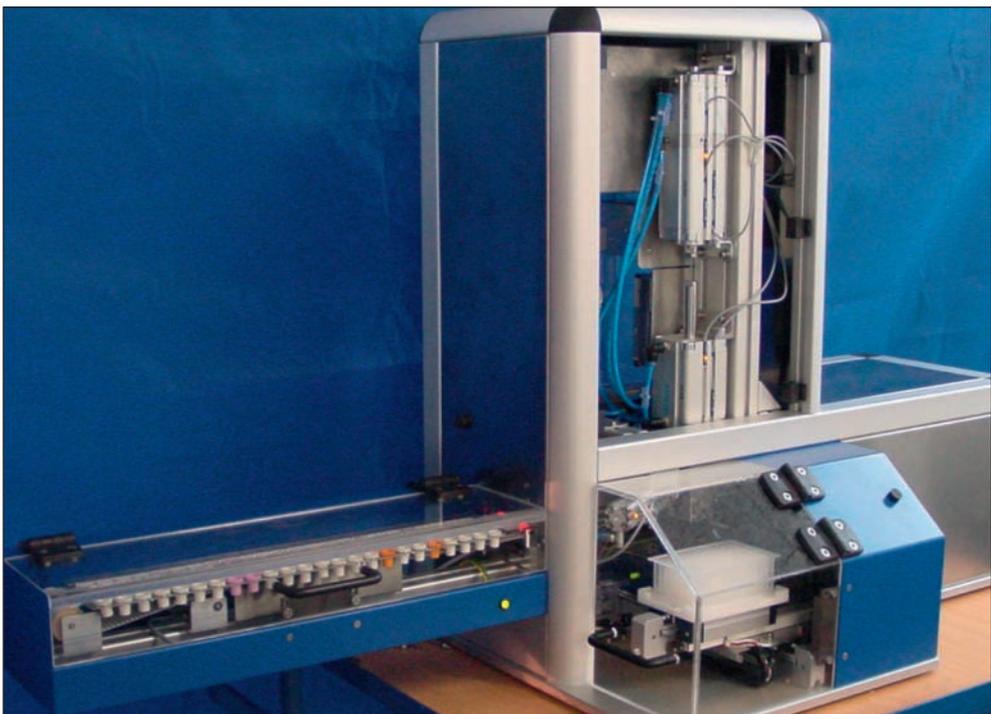


Abb. 3 Automatische Hochdurchsatz-Extraktion der Fa. IDnostics AG von Gewebeproben aus TFS Probenbehältern mit einer Kapazität von 400 Proben pro Stunde

sich immer mehr abzeichnenden RT-PCR-Untersuchung der Proben auf BVDV-RNA ist vor der eigentlichen Analyse eine Isolation der RNA erforderlich. Aus Kostengründen scheint eine individuelle Analytik der Einzelproben nicht vertretbar und wegen der niedrigen Prävalenz von 1 % oder weniger auch nicht sinnvoll. Da die große Mehrzahl der Proben ohnehin ein negatives Ergebnis liefert und wegen der deutlich höheren Sensitivität der RT-PCR-Untersuchung werden die Proben für die Untersuchung auf virale BVDV-RNA gepoolt. Die gängigen PCR-Kits für BVDV sind für Pools aus 12 bis 20 Proben zugelassen. Für die Untersuchung von 100 Proben muss im Durchschnitt nur ein Pool aufgelöst werden.

Das Poolen der Proben erfolgt entweder vor oder nach der Isolation der RNA. Da schon die Kosten für einen Kit zur RNA-Isolation aus Gewebe relativ hoch sind, wird von den meisten Untersuchern eine Poolung der Gewebelysate vor der RNA-Isolation präferiert. Als Alternative werden auch sogenannte „quick and dirty“-Methoden vorgeschlagen, bei denen die RNA nicht isoliert wird, sondern das Lysat direkt gepoolt und analysiert wird. Allerdings scheint dieses Vorgehen nicht unproblematisch zu sein.

Im Hinblick auf die Zuverlässigkeit der RNA-Analytik und den anschließenden Aufwand beim Auflösen von Pools wäre eine individuelle RNA-Isolation attraktiv. Darüber hinaus sollte unbedingt danach getrachtet werden, die im Rahmen der BVDV-Eradikation anfallenden Gewebeproben auch für weitergehende DNA-analytische Untersuchungen verfügbar zu haben (BREM 2004). Deshalb wäre eine gleichzeitige Isolation von RNA und DNA (KAPUSTIN et al. 2006) aus individuellen Proben überaus wünschenswert. Technisch ist dies in einem Zweischrittverfahren möglich: Im ersten Schritt werden die Nukleinsäuren aus den Proben isoliert, im zweiten Schritt dann RNA und DNA getrennt. Einen dafür verwendbaren Kit zu vertretbaren Kosten entwickelt die Fa. nexttec in Leverkusen.

Wegen der bei landesweiten Eradikationsprogrammen jährlich in die Millionen gehenden Anzahl der Isolationen ist eine Roboter-Lösung auch den Kitvarianten vorzuziehen. Mit Hilfe eines parallel arbeitenden Isolationsroboters (Abb. 4) können z. B. im vollautomatisierten 24-Stunden-Betrieb bis zu 7 Millionen DNA/RNA-Isolationen pro Jahr abgearbeitet werden.

6. Analyse der Ohrstanzproben auf BVDV

Die mit Hilfe des TypiFix®-Systems extrahierten und aufbereiteten Ohrgewebeproben können sowohl mittels ELISA auf BVDV-Antigen oder mittels RT-PCR oder verwandter Verfahren auf BVDV-Virusgenom untersucht werden.

6.1 ELISA-Analysen

ELISA-Untersuchungen sind robust, einfacher, schneller und kostengünstiger durchzuführen, aber selbst bei Untersuchung des membranständigen E^{ms}-Antigens nicht hundertprozentig zuverlässig. In Einzelfällen treten falsch negative und auch falsch positive Ergebnisse auf. Insbesondere ELISAs, die auf den Nachweis des p90-Antigens gerichtet sind, werden zudem durch maternale Antikörper, die die Kälber mit dem Kolostrum aufgenommen haben, verfälscht. Die gleichzeitige Untersuchung auf das Vorhandensein dieser Antikörper erlaubt zwar eine Verifizierung der Ergebnisse, aber wenn in zu vielen Fällen Antikörper nachgewiesen werden, ist die Aussagekraft des Tests wenig hilfreich.



Abb. 4 HEDIS Hochdurchsatz-DNA/RNA-Isolierungsroboter der Fa. Agrobiogen GmbH zur DNA/RNA-Isolation aus Ohrgewebeproben mit einer Kapazität von bis zu 20000 Isolation pro 24 Stunden

6.2 RT-PCR-Analysen

Ein direkter Nachweis des BVDV ist durch den molekulargenetischen Nachweis des BVD-Virusgenoms möglich (HOFFMANN et al. 2008). Der Nachweis des BVD-Virusgenoms an Stelle von BVDV-Antigenen hat eine Reihe von Vorteilen:

- PCR-Analysen sind um Größenordnungen sensitiver;
- keine Verfälschung durch maternale Antikörper;
- Spezifizierung der BVD-Viren grundsätzlich möglich.

7. Tierverkehr während laufender BVDV-Eradikationsprogramme

Handel und Transport von Tieren während laufender Tierseuchenbekämpfungs-/Eradikationskampagnen stellen das größte Risiko für (Re-)Infektionen dar. Unerkannte Virusträger können auf diesem Weg bereits freie Bestände reinfizieren und zu massiven Krankheitsgeschehen in diesen Betrieben führen. Gleichwohl können Handel und Transport nicht einfach gänzlich

unterbunden werden. Deshalb sind gerade im Rahmen von BVDV-Bekämpfungsprogrammen Lösungen notwendig, die ohne das Risiko einer Reinfektion den Verkehr mit nachweislich negativen Tieren ermöglichen. Die konsequente Untersuchung von neugeborenen/sehr jungen Kälbern auf ihren PI-Status ermöglicht es, solche Reinfektionen durch Transporte zuverlässig zu unterbinden!

Das früheste Verkaufsalter eines Kalbes ist üblicherweise nicht vor einem Alter von 1 bis 2 Wochen. Die meisten Kälber, die den Betrieb verlassen, werden mit einem Alter von 6 bis 8 Wochen gehandelt. Noch kritischer sind die Transporte, bei denen ältere Kälber und (auch gravide) Kalbinnen oder Kühe auf Gemeinschaftsweiden, in Aufzuchtbetriebe oder auf Almen verbracht werden und dort mit Tieren aus anderen Betrieben in Kontakt kommen, bevor sie nach einer gewissen Zeit wieder in den Ursprungsbetrieb zurückgebracht werden. Dieses Zusammenbringen von Tieren aus mehreren oder vielen verschiedenen Betrieben in die gleiche Umgebung war und ist die Hauptursache für die Reinfektion von bereits sanierten Betrieben. Ein einziges PI-Tier reicht aus, um eine Vielzahl von Neuinfektionen auszulösen. Diese bleiben auf der Alm oder Gemeinschaftsweide in der Regel unbemerkt. Erst wenn die Tiere in ihre Ausgangsbetriebe zurückkommen und es dort zu Abkalbungen kommt, wird das neu entfachte Seuchengeschehen offenkundig.

Regelungen, die einen Verkauf von PI-Tieren unterbinden, müssen so stringent sein (gesetzliche Vorgaben, Restriktionen über Viehverkehrsordnung, Geldstrafen), dass es für einen Tierhalter nicht mehr attraktiv ist, seiner Motivation für einen vorzeitigen Verkauf BVDV-infizierter Tiere nachzugeben. Diese Motivation resultiert einerseits aus dem Wunsch, infizierte Tiere möglichst schnell aus dem Bestand zu bringen, und andererseits aus dem deutlich höheren Verkaufspreis speziell männlicher Kälber an Mastbetriebe.

Ein BVDV-freier Rinderhandel ist in Populationen, in denen alle Kälber mittels Ohrstanzprobe untersucht werden, möglich, wenn die Befunde konsequent in die Rinderdatenbank (und den Rinderpass) integriert werden. Bei negativem Befund der Ohrstanzprobe erhält das Tier einen Rinderpass mit dem Vermerk „BVDV-NPI“ (nicht mit BVDV persistent infiziert). Diese Tiere können Zeit ihres Lebens ohne Einschränkung transportiert werden, da ein Tier, das als nicht persistent infiziert diagnostiziert wurde, diesen Status behält. Eine spätere Infektion mit der Folge des Entstehens eines PI-Status ist nicht möglich, es kann lediglich zu transienten BVDV-Infektionen, die schnell wieder abklingen, kommen. Ein in der Ohrstanzprobe positives Kalb gilt als persistent mit BVDV infiziert und unterliegt einem Verbringungs- und Handelsverbot, das durch einen entsprechenden Eintrag im Rinderpass „BVDV-PI“ und in der Datenbank manifestiert wird. Bei diesen PI-Tieren wird eine Nachuntersuchung (zweite Ohrstanzprobe plus Blutprobe) durchgeführt. Bestätigt diese Untersuchung den PI-Befund, wird dieser in der Datenbank bestätigt, das Tier kann nur noch zur Schlachtung oder zur Tierkörperbeseitigungsanstalt transportiert werden. Erweist sich das Tier in der Nachuntersuchung als nicht positiv (kein PI-Tier) erhält es einen entsprechenden Vermerk in der Datenbank und einen Rinderpass mit dem Vermerk „BVDV-NPI“ und kann frei gehandelt werden.

Literatur

- BREM, G.: Verfahren zur Entnahme und Erstaufbereitung von Gewebeprobe für die molekulargenetische Diagnostik im Rahmen der Identifikationsmarkierung von Tieren. PCT-Anmeldung PCT/EP98/03075 (1998)
- BREM, G.: Verfahren und Möglichkeiten der Herkunftssicherung bei Lebensmitteln: Genotypisierung von Nutztierpopulationen als innovativer Beitrag zur Lebensmittelsicherheit. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 111, 273–276 (2004)

- BREM, G.: Technologische Entwicklungen für die Beprobung von Nutztierpopulationen zum landesweiten Einsatz molekularbiologischer Analysen. *Züchtungskunde* 78, 401–414 (2006)
- HOFFMANN, B., GALL, A., SCHIRMEIER, H., und BEER, M.: Nukleinsäure-basierte diagnostische Untersuchungen zum Nachweis von Pestiviren. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 95*, Nr. 350, 103–123 (2008)
- HOLMQUIST, G., KÜHNE, S., BALLAGI, A., WOLF, G., HORNER, S., BREM, G., VALENTE, N., MANSO, A., and SCHROEDER, C.: Testing mini ear notch tissue samples, a reliable and economic way for the detection of persistently BVDV infected cattle. *Second European Symposium on BVDV Control, Porto, Portugal, 20.–22. 10. 2004. Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias, Suppl. 128*, 56–66 (2004)
- KAPUSTIN, D. V., YAGUDAeva, E. Y., ZUBOV, V. P., MUyDINOV, M. R., YAROSHEVSKAJA, E. M., PLOBNER, L., LEISER, R.-M., and BREM, G.: New polymer-coated materials for one-step separation of nucleic acids. In: WOODS, C. R. (Ed.): *Frontiers in DNA Research*; pp. 113–136. Hauppauge, NY: Nova Biomedical Books 2006
- KÜHNE, S., HOLMQUIST, G., BALLAGI, B., WOLF, G., HORNER, S., BREM, G., SHOBERG, R., GOETZ, C., und SCHROEDER, C.: Untersuchung von Ohrstanzproben im modifizierten HerdCheck Antigen-Elisa – eine zuverlässige und ökonomische Methode zur Detektion von PI-Tieren. *23. Arbeits- und Fortbildungstagung des AVID-Virologie, Banz 15.–17. 9. 2004* (2004)
- KÜHNE, S., SCHROEDER, C., HOLMQUIST, G., WOLF, G., BREM, G., and BALLAGI, A.: Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle – testing tissue samples derived from ear tagging using an e capture ELISA. *J. Vet. Med. B* 6, 272–277 (2005a)
- KÜHNE, S., SCHROEDER, C., HOLMQUIST, G., WOLF, G., HORNER, S., BREM, G., and BALLAGI, A.: Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle – Testing tissue samples derived from ear tagging using an E^{ms} capture ELISA. *J. Vet. Med. Series B*, 52, 272–277 (2005b)
- OETTL, J., SCHÖPF, K., MATT, M., DÜNSER, M., WOLF, G., und BREM, G.: Landesweite BVD-Sanierung durch populationsweite Beprobung in Tirol. *Nova Acta Leopoldina. NF Bd. 95*, Nr. 350, 179–181 (2008)
- SCHROEDER, C., NIEPER, H., OBRITZHAUSER, W., OBRITZHAUSER, G., BREM, G., VEIT, C., KÜHNE, S., HILBE, M., und EHRENSPERGER, F.: Weitergehende Untersuchungen zum Nachweis von BVDV-Antigen aus Ohrstanzproben. *5. Internationales Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 9.–11. März 2005, Tagungsband* (2005)
- TAVELLA, A., ZAMBOTTO, P., STIFTER, E., FUGATTI, A., LOMBARDO, D., RABINI, M., ROBATSCHER, E., und BREM, G.: Rückblick über die Umsetzung eines flächendeckenden BVD-Bekämpfungsprogramms mittels Ohrgewebeprobe in der Autonomen Provinz Bozen-Südtirol. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 95*, Nr. 350, 153–177 (2008)
- THÜR, B., ZLINSZKY, K., and EHRENSPERGER, F.: Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. *J. Vet. Med. B* 43, 163–166 (1996)
- WOLF, G.: Klinische und wirtschaftliche Folgen einer BVDV-Herdeninfektion. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 95*, Nr. 350, 69–71 (2008)

Prof. Dr. Gottfried BREM
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
A-1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 25077600
Fax: +43 1 25077690
E-Mail: gottfried.brem@vu-wien.ac.at

Der immunhistochemische Nachweis von BVD-Virusinfektionen an Hautbiopsien

Monika HILBE, Kati ZLINSZKY und Felix EHRENSPERGER (Zürich)

Mit 4 Abbildungen

Zusammenfassung

BVD-Virusinfektionen sind weltweit verbreitet. Diese Viruserkrankung verursacht hohe wirtschaftliche Kosten in der Rinderzucht und wird deshalb in verschiedenen Ländern bekämpft. Persistent infizierte Tiere, wie sie nach intrauteriner Infektion entstehen, stellen eine Ansteckungsgefahr für die übrigen Herdentiere dar. Eine geeignete Nachweismethode persistenter BVDV-Infektionen ist die Immunhistologie, die sowohl am lebenden wie auch am toten Tier angewendet werden kann. Die Immunhistologie mittels käuflicher monoklonaler Antikörper und Detektionskits ist einfach zu handhaben, sehr sensitiv und spezifisch. Für die Diagnose am lebenden Tier eignet sich die Hautbiopsie, am toten Tier sind Organe wie Schilddrüse, Zunge und Gehirn besonders geeignet.

Abstract

BVD-virus infections occur worldwide. This virally induced illness causes high economic losses in cattle reproduction and therefore eradication programs are implemented in various countries. Persistently infected animals are a source of infection for other herd mates. One adequate method for diagnosing persistently infected animals in alive and death animals is the immunohistology. The immunohistology using commercially available monoclonal antibodies and detection kits is easy to perform, highly sensitive and specific. For the diagnosis in living animals a skin biopsy is appropriate, in death animals thyroid gland, tongue and brain are particularly suitable organs.

1. Einleitung

Das BVD-Virus ist ein RNA-Virus, welches zu der Familie der Flaviviridae und zum Genus der Pestiviren gehört. Dieses Virus kann eine ganze Reihe von verschiedenartigen Krankheitsbildern hervorrufen, wie z. B. Durchfall oder Lungenentzündungen. Wird ein trächtiges Rind infiziert, zeigt dieses höchstens eine transiente leichte Erkrankung mit Fieber und grippalen Symptomen. Für den Rinderföten hängt der Ausgang vom Trächtigkeitsstadium und vom Virusstamm ab. Erfolgt die diaplazentare Infektion des Rinderföten vor dem 40. Trächtigkeitsstag, kommt es zur Resorption der Frucht und zum Umrindern des Muttertieres. Vom 40. bis zum 120. Trächtigkeitsstag kann es zur persistenten Infektion des Rinderföten oder zum Abort bzw. zur Totgeburt kommen. Das Virus kann ebenfalls Missbildungen, wie Kleinhirnhypoplasien, Aborte oder Totgeburten verursachen, besonders dann, wenn die Infektion vom 90. bis zum 150. Tag erfolgt. Im letzten Drittel der Trächtigkeit kann es zum Abort, zur Totgeburt oder zur Geburt eines normalen Kalbes kommen (NETTLETON und ENTRICAN 1995, WEISS et al. 1994). Bei älteren Tieren kann eine akute Infektion unter anderem Durchfall und respiratorische Probleme verursachen (NETTLETON und ENTRICAN 1995).

Es sind zwei Virusstämme (Biotypen) beim BVD-Virus bekannt: das nicht-zytopathogene und das zytopathogene. Zu einer persistenten Infektion kommt es ausschließlich durch

die Infektion mit einem nicht-zytopathogenem Virusstamm. Zwei Genotypen, BVDV-1 und BVDV-2, sind beim BVDV beschrieben. Beim Genotyp BVDV-1 sind mindestens 10 genetisch unterschiedliche Gruppen in der Schweiz nachgewiesen worden (PETERHANS et al. 2003, NETTLETON und ENTRICAN 1995, STALDER et al. 2005, WEISS et al. 1994).

Superinfektion von persistent infizierten Tieren mit einem homologen zytopathogenen Virusstamm kann zur sogenannten *Mucosal Disease* führen. Typische Läsionen bei der *Mucosal Disease* sind Schleimhauterosionen in der Maulhöhle, im Ösophagus und am Pansenpfeiler, und es kommt zur Depletion der Peyerschen Platten (NETTLETON und ENTRICAN 1995, WEISS et al. 1994). Superinfektionen mit einem heterologem Virusstamm führen zur Antikörperbildung.

Um ein persistent infiziertes Tier zu identifizieren, kann man mehrere Methoden verwenden. Eine dieser Methode ist die Immunhistologie (THÜR et al. 1996a,b).

2. Material und Methode

Die Immunhistologie kann am schockgefrorenen oder formalin(4%)-fixierten Material vorgenommen werden. Für die Methode am schockgefrorenen Material verwendet man beim lebenden Tier eine Hautbiopsie. Vornehmlich Zunge und Schilddrüse eignen sich als Organe zum Schockgefrieren beim toten Tier.

Die schockgefrorenen Organe ($-160\text{ }^{\circ}\text{C}$; flüssiger Stickstoff) werden mittels einem Kryostat geschnitten ($5\text{--}8\text{ }\mu\text{m}$) und auf positiv geladenen Objektträgern aufgezogen. Anschließend werden die Schnitte mittels H_2O_2 für 10 min bei Raumtemperatur (RT) behandelt (3 % H_2O_2 mit 0,2 % Natriumazid in H_2O ; 100 μl pro Schnitt), um die endogene Peroxidase zu blockieren. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgt bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 h. Beide verwendeten monoklonalen Antikörper Ca3/34-C42 (Spezifität: E2/gp55 und E^{ms} /gp48. Dr. Bommeli AG, CH-3097 Bern-Liebefeld, Switzerland; NBWU 102) und C16 (Spezifität: NS2-3/nsp125/80. Dr. Bommeli AG, CH-3097 Bern-Liebefeld, Switzerland; NBMU 322) werden 1 : 100 verdünnt (100 μl pro Schnitt). Nachfolgend wird der Anti-mouse EnVision® Kit (Dako Cytomation, K4001, Zug, Schweiz) für 30 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Dieser Kit ist biotinfrei und basiert auf einem Dextran-Polymer-Rückgrat, welches mit einer Vielzahl von Enzymmolekülen (z. B. HRP oder AP) und einem sekundärem Antikörper gekoppelt ist. Die Meerrettichperoxidaseenzymmoleküle werden anschließend mit dem AEC-Substrat (100 μl pro Schnitt) sichtbar gemacht (AEC [Amino-Ethyl-Carbazole], 00-2007 Substrate Kit, Zymed Laboratories, CA 94080 San Francisco, USA) und unter mikroskopischer Kontrolle entwickelt. Nach jedem Schritt werden die Schnitte gründlich mit PBS gewaschen (pH 8). Die Schnitte werden zuletzt mit Kaisers Glyzeringelatine (Merck, 1.09242.0100, Schweiz) mit einem Deckglas abgedeckt.

Bei formalinfixiertem Material werden Leerschnitte auf positiv geladenen Objektträgern aufgezogen und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht getrocknet. Alle größeren Organe können verwendet werden, doch eignet sich das Gehirn (Ammonshorn oder Großhirnrinde) besonders gut, da es kaum Hintergrundreaktionen verursacht und der Antigengehalt in Neuronen relativ hoch ist.

Die Schnitte werden entparaffiniert (Xylol und absteigende Alkoholreihe) und dann mit Hämalaun für 2 bis 4 min gegengefärbt. Anschließend müssen die Schnitte mit 0,1 % Pronase verdaut werden, um das Antigen freizusetzen (10 min bei RT; DAKO Cytomation, Pronase, S 2013, Zug, Switzerland). Nachträglich wird die endogene Peroxidase blockiert, wie bei den Kryostatschnitten beschrieben. Folgende zwei monoklonale Antikörper werden für die Par-

affinschnitte verwendet: C42 (Spezifität: gp48. Prof. MOENNIG, Institute of Virology, Hannover, Germany) in einer Verdünnung von 1 : 400, und 15C5 (Spezifität: gp48. E. DUBOVI, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University, USA) in einer Verdünnung von 1 : 10 000. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei RT. Die nachfolgenden Schritte sind identisch wie bei den Kryostatschnitten.

3. Resultate und Diskussion

In persistent mit BVDV infizierten Tieren findet man das Virus im gesamten Körper verteilt. Das BVD-Virus hat z. B. einen Tropismus für glatte Muskulatur (Gefäßwände), lymphatische Organe bzw. Zellen, Neuronen (Gehirn allgemein), epitheliale Zellen (z. B. Epidermis der Haut, vor allem Basalzellschicht und Haarfollikel), Knochenzellen usw. (Abb. 1–4). Die Auswahl der Organe für die Routinediagnostik richtet sich nach praktischen Kriterien wie Schneidbarkeit, Antigenmenge und niedrige Hintergrundreaktion. Thyroidea und Zunge haben sich bei postmortalen Untersuchungen besonders bewährt. Für *Intra-vitam*-Untersuchungen verwenden wir Hautbiopsien. Bei Föten ist die Untersuchung des Gehirns am Paraffinschnitt empfehlenswert.

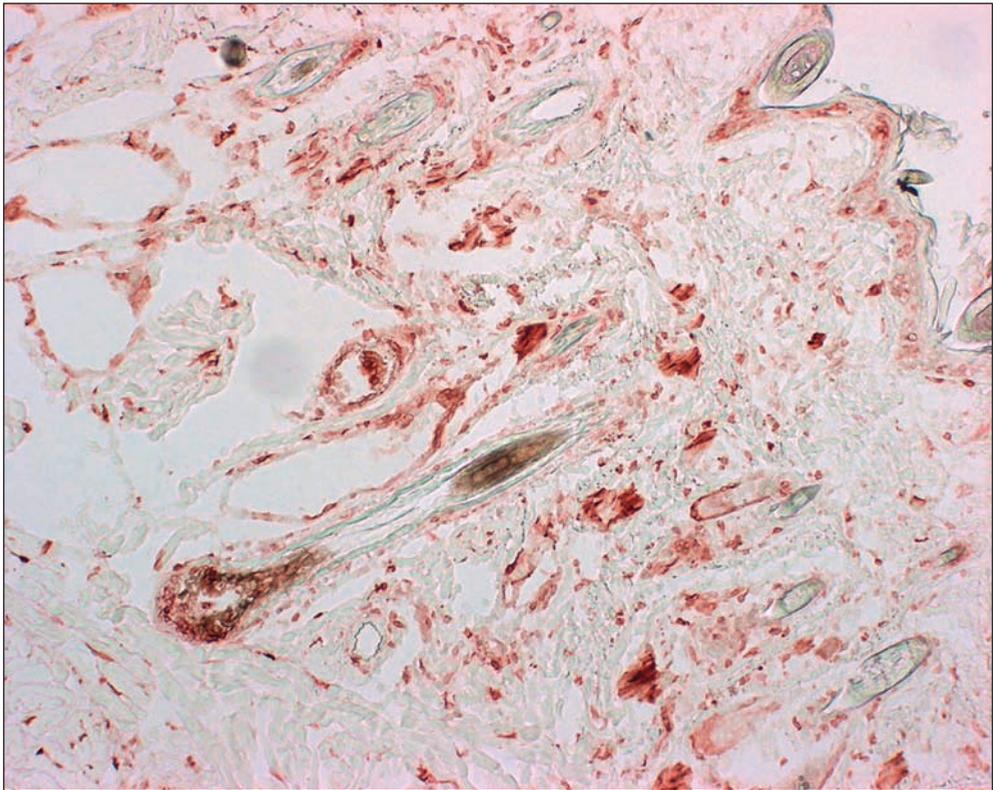


Abb. 1 BVD-positive Hautbiopsie, Ca3, Kryostatschnitt, EnVision-Methode®, 10×

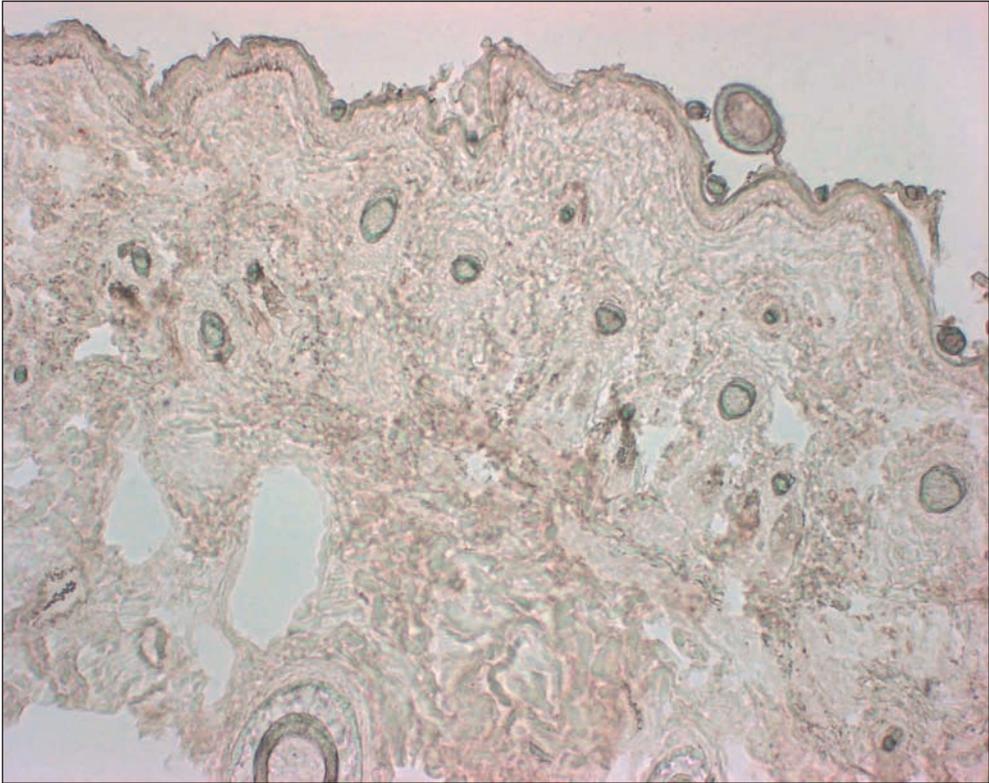


Abb. 2 BVD-negative Hautbiopsie, Kryostatschnitt, EnVision-Methode®, 10×

Die EnVision®-Methode ist einfach anzuwenden, da es sich um eine Zwei-Schritt-Methode handelt. Anhand von Kryostatschnitten erhält man das Resultat noch am gleichen Tag. Bei Paraffinschnitten ist diese Methode auch geeignet, aber langwieriger, da die Schnitte über Nacht getrocknet und anschließend erneut über Nacht inkubiert werden müssen. Da diese Methode biotinfrei ist, hat man ebenfalls keine Probleme mit unspezifischen Hintergrundanfärbungen, was das Ablesen stark erleichtert.

Mittels der Immunhistologie kann man persistent infizierte BVD-Tiere schnell und spezifisch erkennen. Der Test ist sensitiv und wird nicht von den kolostralen Antikörpern maskiert, die in den ersten drei Monaten beim Kalb vorhanden sind (BRODERSEN 2004, eigene Beobachtungen). Es scheint, dass man transient infizierte Tiere mittels Immunhistologie nicht erkennt, was epidemiologisch aber kaum ins Gewicht fällt. Diese Methode ist ebenfalls nicht für eine große Probenanzahl geeignet, da sie vor allem bei der Schnittherstellung relativ arbeitsintensiv ist.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Immunhistologie eine schnelle, sensitive und spezifische Methode ist, um persistent infizierte BVD-Tiere zu erkennen und als Gefahr für die Herde zu eliminieren.

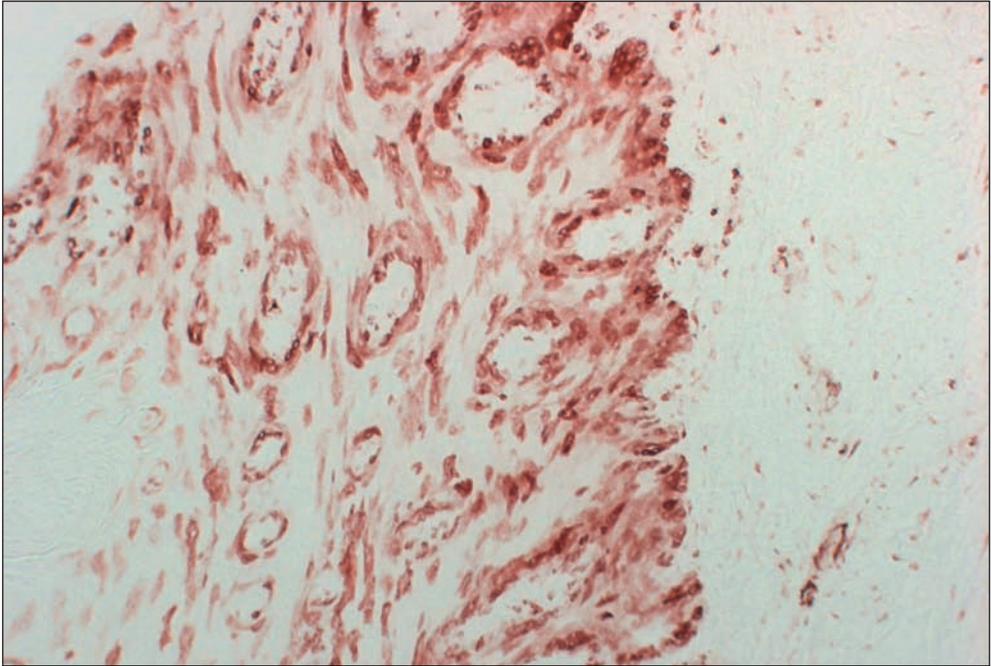


Abb. 3 BVD-positive Zunge, C16, Kryostatschnitt, EnVision-Methode®, 20×

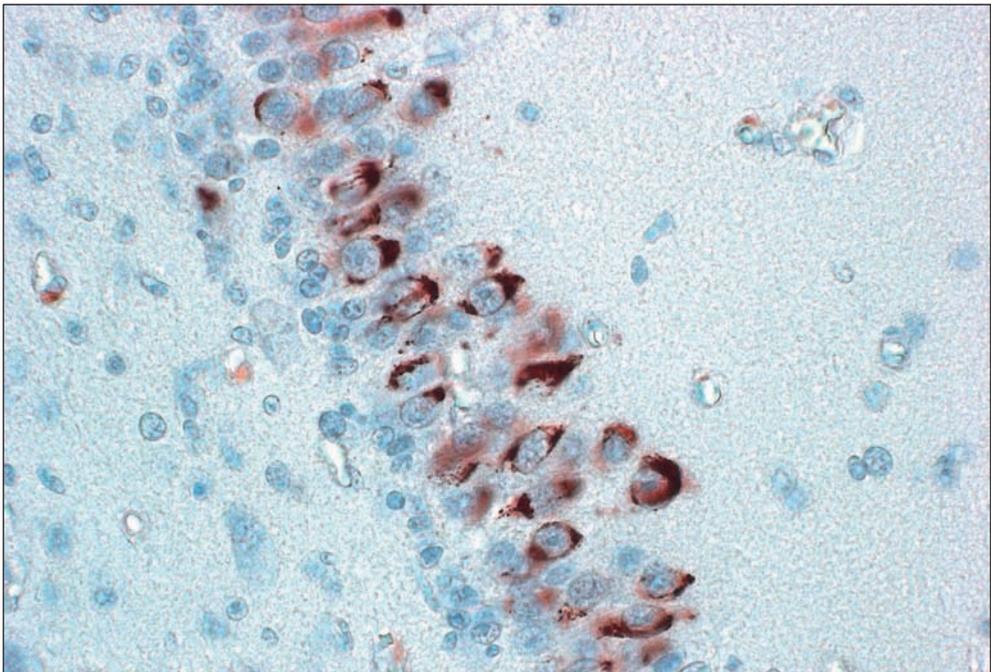


Abb. 4 BVD-positives Gehirn, 15c5, Paraffinschnitt, EnVision-Methode®, 40×

Literatur

- BRODERSEN, B. W.: Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. Clin. Food Anim.* 20, 85–93 (2004)
- NETTLETON, P. F., and ENTRICAN, G.: Ruminant pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151, 615–642 (1995)
- THÜR, B., ZLINSZKY, K., and EHRENSPERGER, F.: Immunhistologie als zuverlässige und effiziente Methode für die Diagnose von BVDV-Infektionen. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 138, 476–482 (1996a)
- THÜR, B., ZLINSZKY, K., and EHRENSPERGER, F.: Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in skin biopsies: a reliable and fast diagnostic tool. *J. Vet. Med. B* 43, 163–166 (1996b)
- PETERHANS, E., JUNGI, T. W., and SCHWEIZER, M.: BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31, 107–111 (2003)
- STALDER, H. P., MEIER, P., PFAFFEN, C., WAGECK-CANAL, C., RÜFENACHT, J., SCHALLER, P., BACHOFEN, C., MARTI, S., VOGT, H. R., and PETERHANS, E.: Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 72, 37–41 (2005)
- WEISS, M., HERTIG, C., VOGT, H.-R., und PETERHANS, E.: Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease: eine Übersicht. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 136, 173–185 (1994)

Dr. Monika HILBE
Institut für Veterinärpathologie
Vetsuisse Fakultät, Zürich
Winterthurerstraße 268
CH-8057 Zürich
Schweiz
Tel.: +41 44 6358556
Fax: +41 44 6358934
E-Mail: hilbe@vetpath.uzh.ch

Nukleinsäure-basierte diagnostische Untersuchungen zum Nachweis von Pestiviren

Bernd HOFFMANN, Astrid GALL, Horst SCHIRRMEIER und Martin BEER
(Greifswald/Insel Riems)

Mit 7 Abbildungen und 2 Tabellen

Zusammenfassung

Der Diagnose von Infektionskrankheiten kommt insbesondere bei Tierseuchen eine besondere Bedeutung zu. Nur durch eine sichere und schnelle Diagnostik können erste Bekämpfungsmaßnahmen zielgerichtet eingeleitet oder Eradikationsprogramme sinnvoll umgesetzt werden. Hierbei sind für den Erregernachweis zunehmend innovative Techniken im Einsatz. Einen besonderen Schwerpunkt bildet dabei der molekularbiologische Nachweis des Erregergenoms, insbesondere mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dieses extrem sensitive Verfahren erlaubt den schnellen Nachweis selbst kleinster Genomengen aus verschiedensten Probenmaterialien, ist jedoch kontaminationsanfällig und beinhaltet keine wirksame Spezifitätskontrolle oder einfache Quantifizierungsmöglichkeit. Seit einiger Zeit wird daher ein weiterentwickeltes PCR-Verfahren, die sogenannte *Real-time-PCR* oder quantitative PCR, für die Detektion von Tierseuchenerregern eingesetzt. Bei der *Real-time-PCR* werden die durch eine klassische PCR-Reaktion gebildeten Produkte mit Hilfe einer fluoreszenzmarkierten Sonde nachgewiesen. Die Zahl der Amplifikate ist bei diesem Verfahren proportional zum Zeitpunkt des Auftretens eines bestimmten Fluoreszenzsignal-Schwellenwertes in der Reaktion. Die Reaktionsröhrchen müssen bei der *Real-time-PCR* nicht mehr zur Auswertung geöffnet werden, was das Kontaminationsrisiko erheblich senkt, und zudem erlaubt die Methode eine direkte Quantifizierung der Kopienzahlen eines Erregergenoms im Probenmaterial. Die Bindung von markierten Sonden dient zudem als interne Spezifitätskontrolle der PCR-Reaktion. Verschiedene SONDENSYSTEME und die Auswertung von mehreren Fluoreszenzkanälen gestatten außerdem die Kombination einer spezifischen Reaktion (Erregernachweis) mit Kontrollreaktionen (Multiplex-*real-time-PCR*). Für den schnellen und sicheren Nachweis von Pestivirusinfektionen gibt es eine zunehmende Zahl von *Real-time-RT-PCR*-Protokollen. Eigene Methodenentwicklungen sowie Erfahrungen mit unterschiedlichen Probenmaterialien, aber auch Untersuchung Verwendung von Poolproben und Proben aus der sogenannten „diagnostischen Lücke“ werden vorgestellt und diskutiert.

Abstract

For the confirmation and eradication of epizootic diseases, fast, sensitive, specific and reliable assays play a crucial role. For the direct detection of the different pathogens, novel molecular methods based on amplification of parts of the genome are more and more used. The most common method since several years is polymerase chain reaction (PCR). PCR technique allows the fast and highly sensitive detection of specific DNAs or RNAs. However, conventional PCRs are problematic concerning the risk of contamination, and control of specificity as well as quantification of genome copies in the samples are difficult. Therefore, an enhanced PCR technology, the so-called real-time PCR becomes widely accepted for the detection of infectious diseases. In real-time PCR, the amplicons are detected using specific probes labeled with fluorescence colors. Therefore, PCR tubes need not to be opened, effectively reducing the risk of cross-contamination. In addition, real-time PCR allows exact quantification of genome copy numbers, since the change in fluorescence signaling is linked to the number of genome copies in the tested sample. The binding of the specific probe also ensures exclusion of false positive signals due to unspecific amplifications. With the combination of different fluorescence channels, several amplicons can be detected simultaneously and multiplex protocols, including internal controls, can be used. Here we present data about new real-time RT-PCRs for the detection of pestiviruses, especially bovine viral diarrhoea virus. Newly developed protocols, experiences with different sample materials as well as the investigation of pooled samples and samples within the “diagnostic gap” will be demonstrated and discussed.

1. Die quantitative *Real-time*-Polymerasekettenreaktion

1.1 Einleitung

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1986/1987 als Technik zur *In-vitro*-Amplifizierung eines spezifischen DNA-Fragmentes (MULLIS et al. 1986, MULLIS und FALOONA 1987) durch ein hitzestabiles Enzym, wie z. B. die *Taq*-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (CHIEN et al. 1976, SAIKI et al. 1988), eingeführt. Sie ist seitdem zu einer der wichtigsten Methoden in der Diagnostik und Forschung geworden. Die konventionelle PCR mit der sich anschließenden Darstellung der Amplifikate über eine Agarosegelelektrophorese ist mit einem verhältnismäßig großen Arbeits-, Material- und Zeitaufwand verbunden. Außerdem ist das Risiko von Kreuzkontaminationen und falsch-positiven Ergebnissen erheblich (MCKILLIP und DRAKE 2004). Ferner handelt es sich bei der Detektion über Agarosegele um eine Endpunktanalyse, weil hier nur die Bandenstärke, die abhängig sein kann von der Effizienz der Amplifizierung, berücksichtigt wird (MCKILLIP und DRAKE 2004).

Daher wurde in der Folgezeit an der Entwicklung von Detektionssystemen gearbeitet, die eine Analyse der Amplifikatbildung in „real-time“ (dt. Echtzeit) über Fluoreszenzsignale, die direkt mit der Amplifizierung des Zielgens in Zusammenhang stehen, erlauben. Wenn die Amplifizierung und die Detektion gleichzeitig ablaufen, ist diese Methode schneller – erlaubt also einen höheren Probendurchsatz – und birgt ein geringeres Kontaminationsrisiko als die konventionelle PCR (NAZARENKO et al. 1997, SCHWEIGER et al. 2000, BLACK et al. 2002).

Die Detektion bei der *Real-time*-PCR erfolgte zunächst mit interkalierenden fluoreszierenden Farbstoffen, später wurden sequenzspezifische Sonden (engl. *probe*) entwickelt, die einen Zuwachs an Spezifität gegenüber der konventionellen PCR ermöglichten (BUSTIN 2000). Die Grundlage dafür bildete das von CARDULLO et al. (1988) beschriebene Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET, Abb. 1). Der FRET-Effekt tritt auf, wenn zwei Fluorochrome, deren Anregungs- und Emissionsspektren überlappen, in eine räumliche Nähe von unter etwa 70 Å gebracht werden (SELVIN und HEARST 1994). Ein Fluorochrom F1 wird durch eine bestimmte Anregungswellenlänge A1 zur Emission der Energie mit der Emissionswellenlänge E1 angeregt. Wenn E1 der Anregungswellenlänge A2 des Fluorochroms F2 entspricht, wird die Energie auf dieses übertragen und in Form der Emissionswellenlänge E2 abgegeben. Wenn F1 und F2 räumlich getrennt werden, findet diese Energieübertragung nicht mehr statt. Die Bezeichnung der verwendeten Fluorochrome richtet sich nach der gemessenen Wellenlänge: Wird E1 gemessen, so ist F1 der Reporterfarbstoff und F2 der *Quencher* (engl. *to quench*, unterdrücken). Die Emissionswellenlänge des *Quenchers* wird entweder nicht detektiert, oder es handelt sich um nicht-fluoreszierende *Quencher* (sogenannte „dark quencher“), die die Energie in Form von Wärme abgeben. Bei Messung von E2 wird F1 als Donor und F2 als Akzeptor bezeichnet.

Parallel entwickelte sich die Technologie zur Detektion der Fluoreszenzsignale weiter. Heute gibt es *Real-time*-PCR-Systeme verschiedener Anbieter (z. B. Applied Biosystems, Bio-Rad, Corbett Research, Roche, Stratagene), die Thermocycler, Lichtquelle (Licht emittierende Dioden, sogenannte LEDs, Laser oder Halogenlampe, je nach Modell), Detektionsmodul sowie Datenverarbeitung in einem System kombinieren (ISHIGURO et al. 1995, WITTEWER et al. 1997b). Es wurden Geräte für die simultane Detektion mehrerer Wellenlängen mit entsprechender Filteranzahl (maximal 6) entwickelt, die eine Koamplifizierung und -detektion mehrerer Zielsequenzen (engl. *multiplexing*) ermöglichen. Die neuesten Systeme erlauben

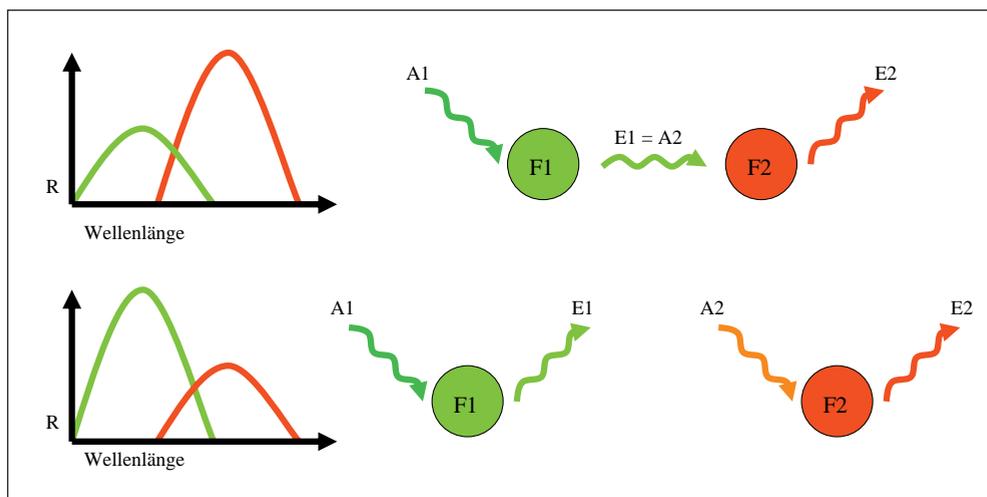


Abb. 1 Das FRET-Prinzip. F1 und F2 sind die beiden beteiligten Fluorochrome, die auch als Reporter/Donor und *Quencher*/Akzeptor bezeichnet werden. Sie haben die Anregungswellenlängen A1 und A2 sowie die Emissionswellenlängen E1 und E2. In den Diagrammen ist die Emission (als Fluoreszenzstärke R) gegen die Wellenlänge aufgetragen.

eine Messung von Wellenlängen zwischen 350 und 750 nm. Außerdem können bis zu 384 Proben bei vollständiger Automatisierung parallel analysiert werden, womit die Technik für Analysen von Proben im Hochdurchsatz geeignet ist. Weitere Vorteile der *Real-time-PCR* gegenüber der konventionellen PCR sind die in der Regel größere Sensitivität, die auf der Amplifizierung sehr kurzer Fragmente basiert (TOOULI et al. 2000), und die Möglichkeit der Quantifizierung der eingesetzten Nukleinsäuremengen (HEID et al. 1996, BUSTIN 2000, LIVAK und SCHMITTGEN 2001, FRONHOFFS et al. 2002).

Die genannten Gründe erklären den immer breiteren Einsatz der *Real-time-PCR* sowohl für diagnostische als auch für wissenschaftliche Zwecke. Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist die schnelle Diagnostik von Pathogenen mit einem hohen Probendurchsatz, wie sie z. B. beim Screening von Blutproben oder Zellkulturen auf Retroviren nötig ist (DE WIT et al. 2000, DROSTEN et al. 2001). Auch in der veterinärmedizinischen Diagnostik sind diverse *Real-time-PCR*-Protokolle beschrieben worden (MCGOLDRICK et al. 1998, COOK et al. 2002, HUGHES et al. 2004). Weiterhin wird die *Real-time-PCR* zur Quantifizierung von Nukleinsäuremengen, z. B. zur Bestimmung der Virusgenomlast im Rahmen von Pathogenesestudien bzw. für prognostische Aussagen (PAS et al. 2000, RYAN et al. 2003, BRUNBORG et al. 2004, OLVERA et al. 2004, TOWNER et al. 2004) oder zur Messung der Genexpression für verschiedene Zytokine verwendet (STORDEUR et al. 2002). Außerdem können mit dem Ziel der allein Diskriminierung Punktmutationen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, *SNPs*) mittels *Real-time-PCR* detektiert werden (GIESENDORF et al. 1998, TYAGI et al. 1998, THELWELL et al. 2000, PICKERING et al. 2002).

1.2 Detektionssysteme

In doppelsträngige DNA unspezifisch interkalierende Farbstoffe wie *Ethidiumbromid* (HIGUCHI et al. 1992, 1993), *YO-PRO-1* (ISHIGURO et al. 1995) und das in den meisten Fällen

eingesetzte SYBR®Green I (Molecular Probes Inc., WITTWER et al. 1997a, b) waren die ersten eingesetzten Systeme zur Detektion der Amplifikatbildung bei einer PCR in „real-time“. Der Einsatz interkalierender Farbstoffe in der *Real-time*-PCR ist nützlich für einmalige Anwendungen, da die Farbstoffe günstig und universell verwendbar sind, und außerdem sinnvoll für das Testen verschiedener Primer für die Optimierung einer PCR-Reaktion. Als weitere Detektionssysteme, die zwar spezifischer sind als interkalierende Farbstoffe, aber keinen Zuwachs an Spezifität gegenüber der konventionellen PCR ermöglichen, werden modifizierte Primer angeboten. Kommerziell erhältlich sind zur Zeit das *Amplifluor™ Universal Detection System* (Chemicon® international) und die *LUX™ Fluorogenic Primer* (Light Upon eXtension, Invitrogen).

Die auf dem FRET-Prinzip basierenden sequenzspezifischen Sonden werden als zusätzliche hybridisierende Oligonukleotide neben den beiden Primern in der *Real-time*-PCR eingesetzt, wodurch ein Zuwachs an Spezifität gegenüber der konventionellen PCR und den bisher beschriebenen Detektionssystemen gegeben ist (BUSTIN 2000). Es gibt die *FRET- oder Hybridisierungssonden* („HybProbe“, Roche Diagnostics GmbH), die für die Verwendung mit dem *LightCycler®* (Roche) konzipiert wurden (WITTWER et al. 1997a, b), sowie *minor groove binder (MGB)-Sonden* (MGB Eclipse™ Probes, Epoch Bioscience; QuantiProbe™, Qiagen) (KUMAR et al. 1998, KUTYAVIN et al. 2000, AFONINA et al. 2002), *molecular beacons* (TYAGI und KRAMER 1996, GIESENDORF et al. 1998, TYAGI et al. 1998, VET et al. 1999), *Scorpions™* (DxS Ltd., WHITCOMBE et al. 1999, THELWELL et al. 2000) und das „primer-probe energy transfer system“ (PriProET, RASMUSSEN et al. 2003).

Da die genannten Systeme keine entscheidenden Vorteile aufweisen, das Design der Sonden jedoch Schwierigkeiten bereiten kann, werden in der Regel sogenannte *TaqMan®-Sonden* (Applied Biosystems/Genentech) eingesetzt, deren Funktionsprinzip hier näher erläutert wird. Bereits 1991 wurde von HOLLAND et al. (1991) beschrieben, dass Sonden, die am 5'-Ende radioaktiv markiert waren, durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase hydrolysiert werden. LEE et al. (1993) entwickelten daraufhin Sonden, die am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff und am 3'-Ende mit einem *Quencher* modifiziert waren (Applied Biosystems). In beiden Fällen waren die simultane Amplifizierung des Zielgens und Generierung eines Zielgen-spezifischen Signals möglich. Die Auswertung erfolgte jedoch noch im Anschluss an die PCR. Die *TaqMan®-Sonden* basieren auf dieser Technologie und kommen seit 1995 zum Einsatz (LIVAK et al. 1995, GIBSON et al. 1996, HEID et al. 1996). Sie sind am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff und am 3'-Ende mit einem *Quencher* markiert (Abb. 2). Während der Denaturierungs- und Annealing-Phase kommt es zum FRET-Effekt. In der Elongationsphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase hydrolysiert, der FRET-Effekt aufgehoben und die Reporterfluoreszenz emittiert. Es sind außerdem *TaqMan®-Sonden* erhältlich, die mit einem MGB modifiziert sind (*TaqMan® MGB Probes*, Applied Biosystems).

1.3 Datenanalyse und Quantifizierung

Die Auswertung der *Real-time*-PCR erfolgt Software-gestützt über die Messung und graphische Darstellung der emittierten Fluoreszenz der Fluorochrome, die proportional ist zur entstehenden Amplifikatmenge. In jedem Zyklus wird die Fluoreszenzstärke R gemessen, die für die native Fluoreszenz der Fluorochrome steht. Wird diese um den Fluoreszenzwert der Basislinie korrigiert, so erhält man den Fluoreszenzwert dR . Wenn R mit der Fluoreszenz eines

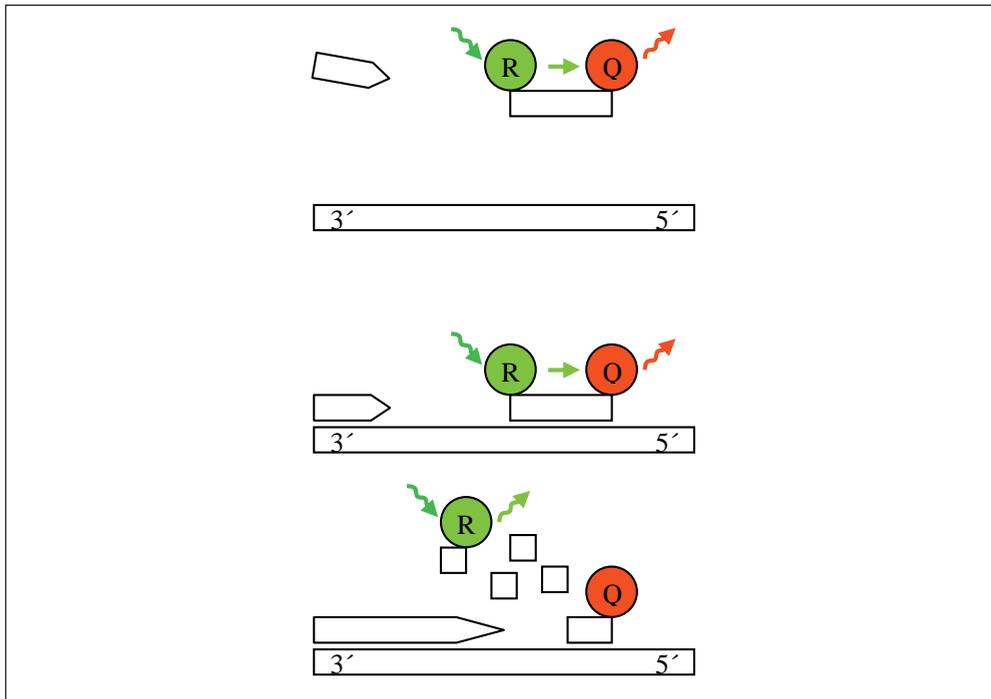
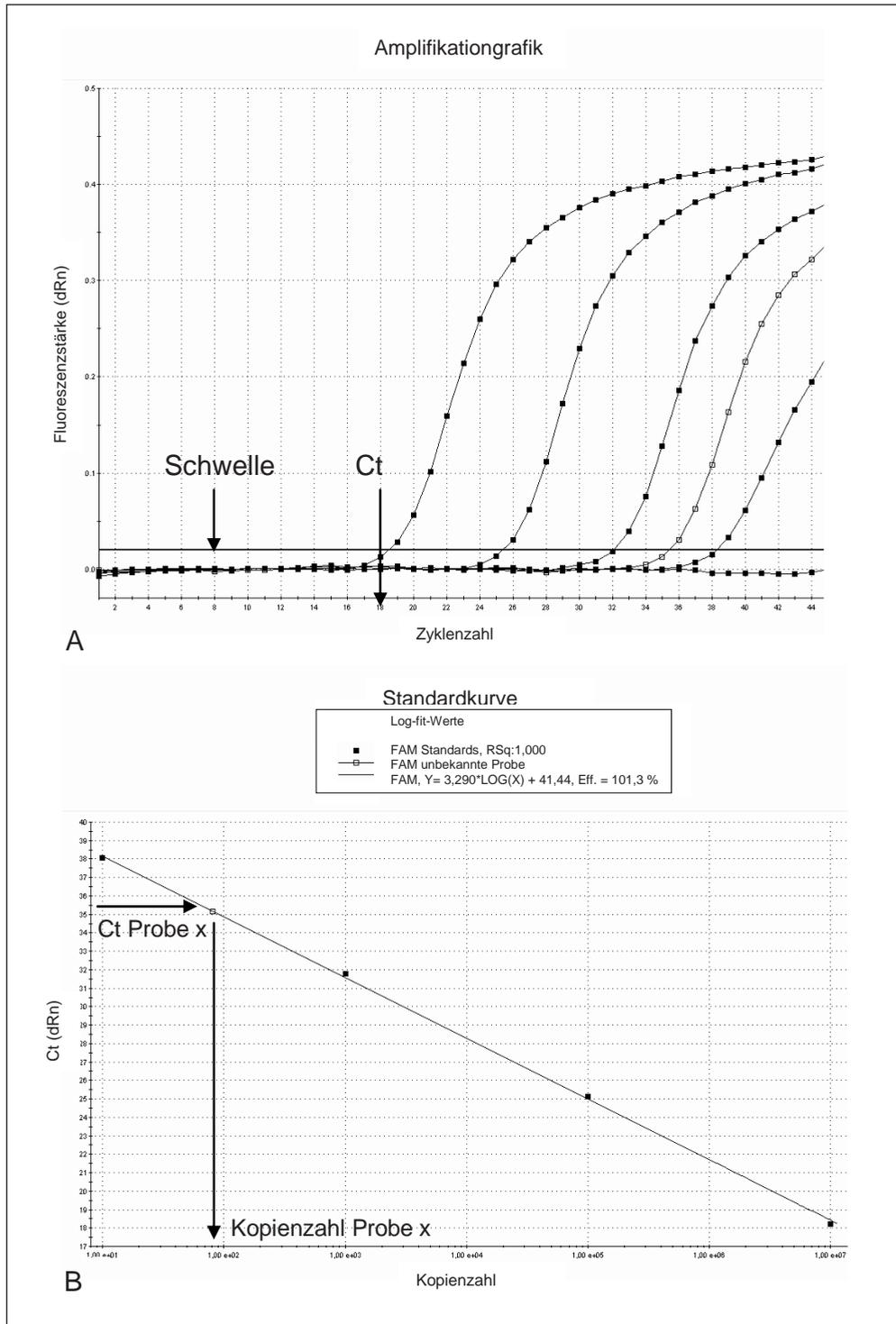


Abb. 2 Funktionsprinzip der TaqMan®-Sonden. Es ist nur der reverse Strang sowie der *Forward*-Primer (Pfeil) gezeigt. (A) zeigt die Denaturierungsphase, (B) die Annealing- und (C) die Elongationsphase. Die Sonden tragen einen Reporterfarbstoff „R“ sowie einen Quencher „Q“.

Referenzfarbstoffes (z. B. 5-Carboxy-X-Rhodamin, ROX) abgeglichen (normalisiert) wird, erhält man R_n . Falls sowohl um die Basislinie als auch um die Fluoreszenz des Referenzfarbstoffes korrigiert wird, wird der Fluoreszenzwert dR_n dargestellt. Die Ergebnisse werden in Form von Amplifikationsgrafiken (engl. *amplification plots*), bei denen auf der x-Achse der Zyklus und auf der y-Achse die Fluoreszenzstärke (als R, R_n , dR, dR_n) aufgetragen ist, graphisch dargestellt (Abb. 3).

Der Referenzfarbstoff wird eingesetzt, um Unterschiede in der Fluoreszenz, die nicht mit der Amplifizierung zusammenhängen (z. B. durch nicht identische Volumina des Mastermixes oder unterschiedliche Lichtbrechung), auszugleichen bzw. zu normalisieren. Die Basislinie wird in der Regel Software-gestützt für jede Probe berechnet und stellt den Bereich dar, in dem noch kein Anstieg der Fluoreszenzstärke durch entstehende Amplifikate zu verzeichnen ist. Da das *quenching* der verwendeten Sonden nicht vollständig ist, wird auch hier eine gewisse Hintergrundfluoreszenz gemessen. Außerdem wird ein Fluoreszenzschwellenwert (engl. *threshold*) berechnet, der über der Hintergrundfluoreszenz in der linearen Phase des Amplifikationsgraphen liegen sollte, die der log-linearen Phase der PCR entspricht. In man-



Tab. 1 Datenanalyse und absolute Quantifizierung

Farbstoff	Well Type	Ct (dRn)	Anzahl (Kopien)
FAM	Standard	18,23	1,00 E + 07
FAM	Standard	25,15	1,00 E + 05
FAM	Standard	31,79	1,00 E + 03
FAM	Standard	38,05	1,00 E + 01
FAM	unbekannt	35,17	8,04 E + 01
FAM	NTC	kein Ct	kein Ct

chen Fällen, z. B. bei großen Mengen an spezifischen Nukleinsäuren (Template), kann eine manuelle Korrektur der Basislinie sowie des Fluoreszenzschwellenwertes nötig sein. Der Ct-Wert (engl. *threshold cycle*) markiert den Zyklus, bei dem der Amplifikationsgraph einer positiven Probe den Fluoreszenzschwellenwert kreuzt. Er steht in direktem Zusammenhang mit der Ausgangsmenge der Zielsequenz und bildet so die Grundlage der Quantifizierung. Der Ct-Wert ist umso kleiner, je mehr Zielsequenz in der Probe vorhanden ist (HEID et al. 1996).

Bei der *absoluten Quantifizierung*, die z. B. zur Bestimmung von Virusgenomlasten genutzt wird, wird die absolute Menge der Zielsequenz in einer unbekannt Probe – meistens ausgedrückt als Kopienzahl pro Reaktion – bestimmt. Dazu werden mehrere Standards mit bekannten Mengen der Zielsequenz in separaten Reaktionen mitgeführt (externe Standards). Als DNA-Standards für eine *Real-time-PCR* werden gewöhnlich linearisierte Plasmide mit klonierter Zielsequenz verwendet. Für eine *Real-time-RT-PCR* bieten sich als RNA-Standards *In-vitro*-Transkripte auf der Basis von Plasmiden an (BUSTIN 2000, FRONHOFFS et al. 2002). Alternativ können genomische DNA/RNA oder auch PCR-Produkte im Falle der Quantifizierung von DNA genutzt werden. Für die Standards wird der jeweilig erhaltene Ct-Wert (auf der y-Achse) gegen die initiale Menge der Zielsequenz (als Kopienzahl auf der logarithmischen x-Achse) aufgetragen, wodurch eine Standardkurve entsteht (HEID et al. 1996). Der Ct-Wert einer unbekannt Probe wird mit der Standardkurve verglichen, so dass die absolute initiale Kopienzahl bestimmt werden kann (Abb. 3). Dabei sollte die unbekannt Probe in den Bereich fallen, der mit der Standardkurve abgedeckt wird (BUSTIN 2000). Die Voraussetzung für eine exakte Quantifizierung ist die korrekte Bestimmung der Kopienzahl der Zielsequenz in den Standards, die über eine Umrechnung mittels des Molekulargewichtes nach der photometrischen Bestimmung der Absorption A_{260nm} erfolgt. Außerdem müssen für die Standards und die Proben die identischen Oligonukleotide zur Amplifizierung und Detektion verwendet werden, die Sequenzen beider müssen möglichst ähnlich sein, und eine äquivalente Effizienz der Amplifizierung sollte gegeben sein (NIESTERS 2004). Optimal ist eine PCR-Effizienz von 100 %, die sich auch in einer Steigung der Standardkurve von $-3,322$ widerspiegelt. In diesem

Abb. 3 Datenanalyse und absolute Quantifizierung. (A): Amplifikationsgrafik. (B): dazugehörige Standardkurve (vgl. Darstellung der Ergebnisse in Tab. 1). Bei der Amplifikationsgrafik ist die normalisierte und Basislinien-korrigierte Fluoreszenzstärke (dRn) gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Die schwarze Linie stellt den Fluoreszenzschwellenwert (engl. *threshold*) dar. Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationsgraph und Fluoreszenzschwellenwert, projiziert auf die x-Achse, markiert den Ct-Wert (engl. *threshold cycle*). Für die Standardkurve wird die Zyklenzahl gegen die initiale Menge der Zielsequenz (als Kopienzahl auf der logarithmischen x-Achse) aufgetragen. Es wurden 4 Standards (gefüllte Kästchen), eine unbekannt Probe (nicht gefüllte Kästchen) und eine negative Kontrolle, bei der kein Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen war, eingesetzt.

Fall wird die Amplifikatmenge pro Zyklus exakt verdoppelt. Der optimale Wert für den Korrelationskoeffizienten RS_q , der die Qualität der Standards beschreibt, beträgt 1.

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit der *relativen Quantifizierung*, bei der davon ausgegangen wird, dass Veränderungen in der Menge der mRNA (engl. *messenger RNA*, Boten-RNA) den Veränderungen in der Menge des Proteins entsprechen. Die Menge der Zielsequenz in der Probe wird normalisiert auf ein Referenzgen und dann in Relation zu einer Referenzprobe (Kalibrator) gesetzt. Es werden also zwei Zustände miteinander verglichen, z. B. Zytokinprofile zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten. Die Berechnungen erfolgen entweder über Standardkurven (beschrieben in HEID et al. 1996) oder über die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (komparative Methode) nach LIVAK und SCHMITTGEN (2001).

1.4 Multiplex-Real-time-PCR und interne Kontrollen

Der Begriff „Multiplex-PCR“ steht für die simultane Amplifizierung von zwei oder mehreren Zielsequenzen durch unterschiedliche Primerpaare in einer Reaktion. CHAMBERLAIN et al. (1988) verwendeten sechs Primerpaare für die konventionelle PCR, differenzierten die unterschiedlich großen Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese und beschrieben damit erstmalig eine Multiplex-PCR. Die „Multiplex-*real-time*-PCR“ wird durch die Verwendung unterschiedlich markierter Sonden zur Differenzierung der Amplifikate realisiert (MACKAY et al. 2002). Anfangs war die Koamplifizierung und -detektion mehrerer Zielsequenzen (engl. *multiplexing*) in der *Real-time*-PCR aufgrund der verfügbaren Reporterfarbstoffe und *Quencher* sowie der Gerätetechnologie noch stark eingeschränkt. Mittlerweile kann durch die Entwicklung von zahlreichen Reporterfarbstoffen und nicht-fluoreszierenden *Quenchern* sowie den Einsatz von Halogenlampen und LEDs ein breites Wellenlängenspektrum genutzt werden (KREUZER et al. 2001). Da die Emissionsspektren der Reporterfarbstoffe sich möglichst nicht überlagern dürfen, ist die Anzahl der Zielsequenzen, die sich simultan detektieren lassen, jedoch begrenzt. Problematisch bei einer Multiplex-PCR ist außerdem die Inhibition der Amplifizierung derjenigen Zielsequenz, die in der geringeren Menge vorhanden ist (HOFMANN 2003, PERSSON et al. 2005). Die Vorteile der Multiplex-*real-time*-PCR liegen in einem geringeren Arbeits-, Material- und Zeitaufwand und in der Einsparung von Probenmaterial. Es können sowohl mehrere Zielsequenzen als auch eine Zielsequenz und ein/mehrere *house-keeping genes* zur relativen Quantifizierung oder eine interne Kontrolle koamplifiziert werden. In den letzten Jahren sind diverse Multiplex-*real-time*-PCR-Protokolle zur Koamplifizierung und -detektion von bis zu vier Zielsequenzen etabliert worden (VET et al. 1999, PERSSON et al. 2005).

Die PCR kann durch eine Reihe von Faktoren biologischen (z. B. Lysozym, Hämoglobin) und chemischen Ursprungs (z. B. Ethylendiamintetraacetat, EDTA) inhibiert werden. Man unterscheidet die totale Inhibition, bei der falsch-negative Resultate zustande kommen, und die partielle Inhibition, die sich in einem Verlust an Sensitivität widerspiegelt. Die Inhibitoren beeinflussen die Lyse des Probenmaterials, die Isolierung der Nukleinsäure und die Aktivität des Enzymsystems; ferner kann es zur Degradation der Nukleinsäure kommen (ROSSEN et al. 1992, WILSON 1997).

Interne Kontrollen (engl. *internal control*, *IC*) werden verwendet, um die Funktionalität und Effizienz der Zell- bzw. Virionenlyse, der RNA-/DNA-Isolierung und der (RT-)PCR in jeder einzelnen Probe zu überprüfen. Sie dienen somit zum Ausschluss falsch-negativer Resultate und wurden hierzu auch in der konventionellen (RT-)PCR eingesetzt (CONE et al.

1994, KOX et al. 1994, ROSENSTRAUS et al. 1998). Bei der *Real-time*(RT-)PCR sind interne Kontrollen ferner wichtig als Basis zur Quantifizierung unbekannter Nukleinsäuremengen, da hier eine vergleichbare Effizienz der Isolierung der Nukleinsäure und der (RT-)PCR in den einzelnen Proben gewährleistet sein muss. Es können *housekeeping genes* bzw. *single copy genes* als interne RNA- bzw. DNA-Kontrollen genutzt werden (GIBSON et al. 1996, OLEKSIWICZ et al. 2001, KORIMBOCUS et al. 2002, HÜSSY et al. 2003, KIM und DUBOVI 2003, HUGHES et al. 2004). Sie haben den Vorteil, dass der gesamte Prozess, inklusive der Lyse des Probenmaterials und der Integrität der Nukleinsäure, verifiziert wird. Nachteilig ist, dass ihre Konzentration, insbesondere in zellfreien Proben, wie Plasma oder Serum, nicht bekannt ist, was unter ungünstigen Bedingungen zu einer Inhibition der Amplifizierung der Zielsequenz führen kann. Alternativ zu diesen intern in den Probenmaterialien vorkommenden Nukleinsäuren können externe Nukleinsäuren als interne Kontrollen verwendet werden. Je nachdem, wann sie zugesetzt werden, kann der Prozess ab der Lyse (DROSTEN et al. 2001, HOFMANN 2003) oder der Nukleinsäureisolierung (HOFMANN et al. 2005) bzw. nur die (RT-)PCR (KOX et al. 1994) überprüft werden. Einerseits können dabei natürlich vorkommende Viren oder Nukleinsäuren (virale Nukleinsäure oder mRNA) eingesetzt werden. Wenn z. B. ein nicht verwandtes Virus (CLELAND et al. 1999, NIESTERS 2004) zugesetzt wird, kann auch die Lyse der Virionen überprüft werden. Nachteilig ist, dass diese Art einer IC infektiös ist. Probleme bei der Lagerung sowie der Verwendung in Routinelaboren, die nicht der Sicherheitsstufe L2 entsprechen, können auftreten. Andererseits werden Viruschimären bzw. artifizielle Nukleinsäuren verwendet. HOFMANN (2003) konstruierte eine – ebenfalls infektiöse – Viruschimäre. Diese dient auch der Überprüfung der Virionlyse und hat außerdem den Vorteil gegenüber einem natürlich vorkommenden Virus, dass sie universell einsetzbar ist. Bei entsprechender Konstruktion und Amplifizierung können auch artifizielle Nukleinsäuren (*in-vitro*-transkribierte RNA, Plasmid-DNA) universell verwendet werden, wobei sie ferner den Vorteil aufweisen, dass sie nicht infektiös sind (HEATH et al. 2003, WESTCOTT et al. 2003, HOFMANN et al. 2005). Eine Überprüfung der Virionen- oder Zellyse ist damit jedoch nicht möglich. Um auch diese kontrollieren zu können, verwendeten DROSTEN et al. (2001) in Phagen verpackte *in-vitro*-transkribierte RNA als IC.

Die IC kann entweder in einem separaten Reaktionsansatz getrennt von der Zielsequenz (Single-Assay) oder mit dieser zusammen im Multiplex-Assay amplifiziert und detektiert werden. Zur Koamplifizierung im Multiplex-Assay wird entweder ein homologes oder ein heterologes System angewendet. Beim homologen System werden dabei die gleichen Primer für die Zielsequenz und die IC, aber unterschiedlich markierte Sonden zur Differenzierung verwendet (DROSTEN et al. 2001). Damit ist die größtmögliche Nähe zur Amplifizierung der Zielsequenz („mimic IC“) gegeben. Für die Optimierung des Multiplex-Assays kann die Größe des amplifizierten Fragmentes der IC variiert werden. Nachteilig ist, dass dann für jedes Zielgen die IC sowie die detektierende Sonde neu konstruiert werden müssen. Das heterologe System besteht aus komplett eigenen Primern und Sonden für die IC (STÖCHER et al. 2002, HOFMANN 2003, HOFFMANN et al. 2005). Die Optimierung des Multiplex-Assays kann sowohl über die Größe des amplifizierten Fragmentes der IC als auch über die Limitierung der Primerkonzentration für die IC erfolgen. Ein weiterer Vorteil des heterologen Systems ist, dass es universell verwendet werden kann.

2. Nachweis von Pestiviren mittels *Real-time*-RT-PCR

2.1 Molekulare Diagnostik von Pestiviren

Das Genus Pestivirus innerhalb der Familie Flaviviridae beinhaltet das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe Typ 1 und 2 (BVDV-1 und BVDV-2), das Virus der Klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus*, CSFV), das *Border-Disease-Virus* (BDV) sowie atypische Pestiviren (FAUQUET et al. 2005). Innerhalb dieser Species gibt es verschiedene Genotypen und Subtypen, wobei beim BVDV-1 mehr als elf Subtypen beschrieben sind (VILCEK et al. 2001, BECHER et al. 2003). Pestiviren sind kleine unbehüllte Viren mit einem ca. 12,5 kb einzelsträngigen RNA-Genom von positiver Polarität. Das Genom kodiert für einen langen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der von nicht-translatierten Regionen (*non translated region*, NTR) flankiert wird (COLLETT et al. 1988).

Insbesondere die 5'NTR wird zur molekularen Diagnostik sowohl für die konventionelle RT-PCR als auch für die *Real-time*-RT-PCR genutzt (HERTIG et al. 1991, VILCEK et al. 1994, HAMEL et al. 1995, RADWAN et al. 1995, SANDVIK et al. 1997, HYNDMAN et al. 1998, KIM und DUBOVI 2003, MCGOLDRICK et al. 1998, DREW et al. 1999, LETELLIER et al. 1999, PFEFFER et al. 2000, BHUDEVI und WEINSTOCK 2001, 2003, WEINSTOCK et al. 2001, HEATH et al. 2003, RISATTI et al. 2003). Seit 2001 gibt es verschiedene *Real-time*-RT-PCR-Systeme zum Nachweis von BVDV (BHUDEVI und WEINSTOCK 2001, MAHLUM et al. 2002, LETELLIER und KERKHOFS 2003, GAEDE et al. 2005, BAXI et al. 2006, HOFFMANN et al. 2006). Das TaqMan®-nested-RT-PCR-System von HEATH et al. (2003) beinhaltet ein homologes internes Kontrollsystem, welches nicht auf andere Protokolle übertragen werden kann. Der kritische Schritt der Isolierung der RNA wird nicht kontrolliert und darüber hinaus ausschließlich BVDV-1 detektiert.

Hier wird ein *Real-time*-RT-PCR-System (Panpesti-System 1.1) beschrieben, das Pestiviren und dabei insbesondere BVDV-1 sowie BVDV-2 detektiert. Ein heterologes internes Kontrollsystem, das universell in verschiedenen Protokollen eingesetzt werden kann und auch die RNA-Extraktion überprüft, wurde entwickelt und in das Panpesti-System 1.1 integriert. Die Duplex-*real-time*-RT-PCR zum Nachweis von BVDV und interner Kontrolle wurde umfangreich validiert und steht nun für die Detektion und Quantifizierung von BVDV in diagnostischen Proben zur Verfügung.

2.2 Das *Real-time*-RT-PCR-Panpesti-System 1.1 zum Nachweis von BVDV

Mit den Funktionen *Pileup* und *Pretty* des *Wisconsin Package* (*Genetics Computer Group*, GCG) wurde ein Alignment und eine Konsensus-Sequenz von 603 Pestivirussequenzen (WOLFMEYER et al. 1997, AVALOS-RAMIREZ et al. 2001, BEER et al. 2002, SCHIRRMIEYER et al. 2004) – 433 BVDV-1-, 57 BVDV-2-, 78 CSFV- und 33 BDV-Stämmen sowie zwei atypischen Pestiviren, „Giraffe“ und „D32/00_HoBi“ – erstellt. Primer und Sonde zur Detektion von BVDV wurden darauf basierend entwickelt, wobei die Software *Beacon Designer 2.06* (*PremierBiosoft International*) ergänzend verwendet wurde. Ferner wurden Oligonukleotide bereits publizierter Protokolle (VILCEK et al. 1994, GAEDE et al. 2005) getestet. Das Panpesti-System 1.1 verwendet den *Forward*-Primer BVD190-F (HOFFMANN et al. 2006), den *Reverse*-Primer V326 (VILCEK et al. 1994) und die mit FAM markierte TaqMan®-Sonde TQ-Pesti (GAEDE et al. 2005) (Tab. 2). Es wird ein ca. 200 bp großes Fragment der 5'NTR ampli-

fiziert und detektiert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprofil für die *One-step-real-time-RT-PCR* finden sich bei HOFFMANN et al. (2006).

2.3 Entwicklung eines universellen heterologen internen Kontrollsystems

Mittels PCR mit den Primern EGFP-15-F und EGFP-10-R (HOFFMANN et al. 2006) und dem Vektor pEGFP-1 (BD Biosciences Clontech, acc. no. U55761) als Template wurde ein 712 bp großes Fragment des EGFP-Gens amplifiziert, das dann in den Vektor pGEM[®]-TEasy (Promega) kloniert wurde. Das resultierende Plasmid mit der Bezeichnung pGEM-EGFP2-rev (3729 bp) wurde als interne DNA-Kontrolle (IC-DNA) eingesetzt (Abb. 4). Nach Linearisierung und *In-vitro*-Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase (Riboprobe[®]System-SP6/T7, Promega) wurde das Transkript SP6-EGFP2 (814 nt) erhalten, welches als interne RNA-Kontrolle (IC-RNA) verwendet wurde.

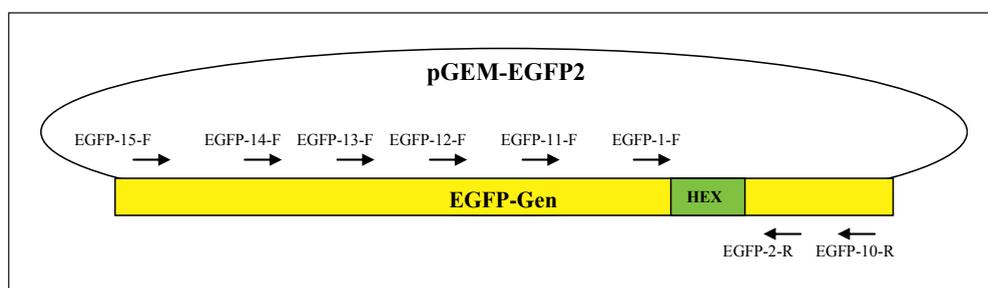


Abb. 4 Lokalisation der EGFP-spezifischen Oligonukleotide im Plasmid „pGEM-EGFP2-rev“. Es handelt sich um sechs *Forward*-Primer, zwei *Reverse*-Primer und die TaqMan[®]-Sonde EGFP-HEX (HOFFMANN et al. 2006). Dieses Plasmid wird als interne DNA-Kontrolle (IC-DNA) eingesetzt. Das nach Linearisierung darauf basierend mit der SP6-RNA-Polymerase hergestellte Transkript „SP6-EGFP2“ dient als interne RNA-Kontrolle (IC-RNA).

Die IC-RNA wurde auf 2×10^5 Kopien/ μ l eingestellt und in einem speziellen „RNA safe buffer“ (RSB, 50 μ M Carrier polyA-RNA [Amersham Biosciences], 0,2 μ M Tween 20 und 0,2 μ M Natriumazid) gelagert. In diesem Puffer wurde eine hohe Stabilität der IC-RNA erreicht: Bis zu 40 Gefrier-/Tauzyklen (-20 °C) und eine Lagerung bei 37 °C bis zu 12 Tagen waren ohne negativen Einfluss auf die Eignung der *in-vitro*-transkribierten RNA für die nachfolgende *Real-time-RT-PCR* möglich (Abb. 5). Die Ct-Werte lagen zwischen 25,08 (ein Gefrier-/Tauzyklus) und 25,65 (40 Gefrier-/Tauzyklen). Bei der Lagerung bei 37 °C wurde eine leichte Erhöhung der Ct-Werte von 26,1 (3 Tage) auf 27,49 (12 Tage) beobachtet, die vermutlich eine geringfügige Beschädigung der IC-RNA widerspiegelt.

Die IC wird verwendet, um die Effizienz der RNA-Extraktion, der RT und der PCR in jeder einzelnen Probe zu überprüfen. Zur Kontrolle der RNA-Extraktion werden 10^6 Kopien IC-RNA (5μ l \acute{a} 2×10^5 Kopien/ μ l) dem Lysisbuffer zugesetzt und in 50 μ l koeluiert. 5 μ l der eluierten RNA (mit ca. 10^5 Kopien IC-RNA) werden als Template in der nachfolgenden *Real-time-RT-PCR* eingesetzt. Die Amplifizierung der IC (zugesetzt zum Mastermix als IC-DNA oder IC-RNA) mittels der EGFP-spezifischen *Real-time-RT-PCR* kann mit 12 verschiedenen Primerkombinationen geschehen, wobei die Detektion über die mit HEX markierte TaqMan[®]-Sonde EGFP-HEX erfolgt (Abb. 4). Aus den sechs *Forward*-Primern und den zwei

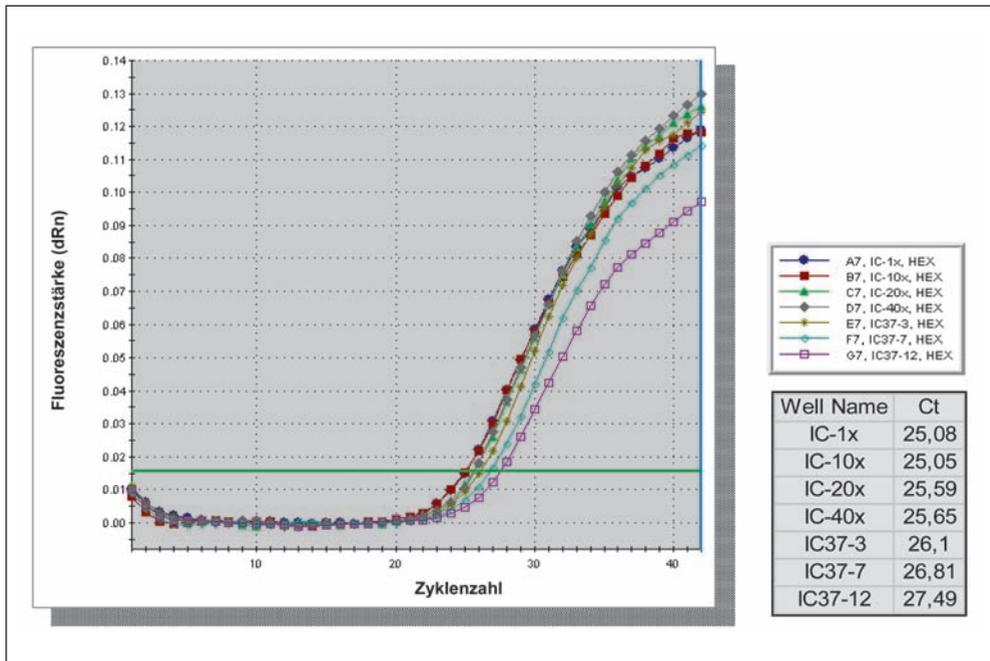


Abb. 5 Stabilität der IC-RNA bei verschiedenen Lagerungsbedingungen. Eine identische Menge IC-RNA wurde zum einen Gefrier-/Tauzyklen unterzogen (IC-1x, IC-10x, IC-20x, IC-40x) und zum anderen bei 37 °C inkubiert (IC37-3, IC37-7, IC37-12). Nach einer *Real-time*-RT-PCR in Triplikaten mit dem EGFP-Mix 4 sind hier die gemittelten Ergebnisse dargestellt.

Reverse-Primern wurden Primer-Sonden-Mixe (EGFP-Mixe 1 bis 12, HOFFMANN et al. 2006) hergestellt, mit denen Fragmente unterschiedlicher Größe von 132 bp bis 712 bp amplifiziert und detektiert werden. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese verifiziert (nicht gezeigt). Bei Verwendung einer identischen Menge IC-RNA wurden bei zunehmender Größe des Amplikons höhere Ct-Werte festgestellt, da die Amplifizierung längerer Fragmente weniger effizient ist (Abb. 6).

Mit dem hier dargestellten heterologen internen Kontrollsystem kann für die Koamplifizierung der IC mit dem Zielgen im Duplex-Assay ein Fragment mit einer Größe (d. h. ein EGFP-Mix) ausgewählt werden, das bei konstanter Amplifizierung der IC mit Ct-Werten von ca. 27 eine maximale Sensitivität für das Zielgen gewährleistet. Die Abbildung 7 zeigt das beispielhaft für die Entwicklung einer Duplex-*real-time*-RT-PCR zum Nachweis von BVDV und IC. Es wurde eine \log_{10} -Verdünnungsreihe von BVDV-2-RNA (Stamm 890) im Single-Assay (oben, Panpesti-System 1.1, ca. 200 bp) sowie im Multiplex-Assay mit verschiedenen EGFP-Mixen, die ein 487, 374, 277 oder 177 bp großes Fragment der IC amplifizieren, eingesetzt. Bei Koamplifizierung eines 487 bp großen Fragmentes der IC mit dem EGFP-Mix 8 (EGFP-13-F, EGFP-10-R und EGFP-HEX, Tab. 1) wurde eine identische Sensitivität für BVDV im Single-Assay und im Duplex-Assay nachgewiesen. Die Koamplifizierung von kürzeren Fragmenten minderte die Sensitivität für das Zielgen um bis zu zwei \log_{10} -Stufen. Insbesondere bei den größeren Fragmenten wurde eine kompetitive Hemmung der Koamplifizierung der IC beobachtet, die bei den Verdünnungsstufen mit hohem Gehalt an BVDV-2-RNA auftrat.

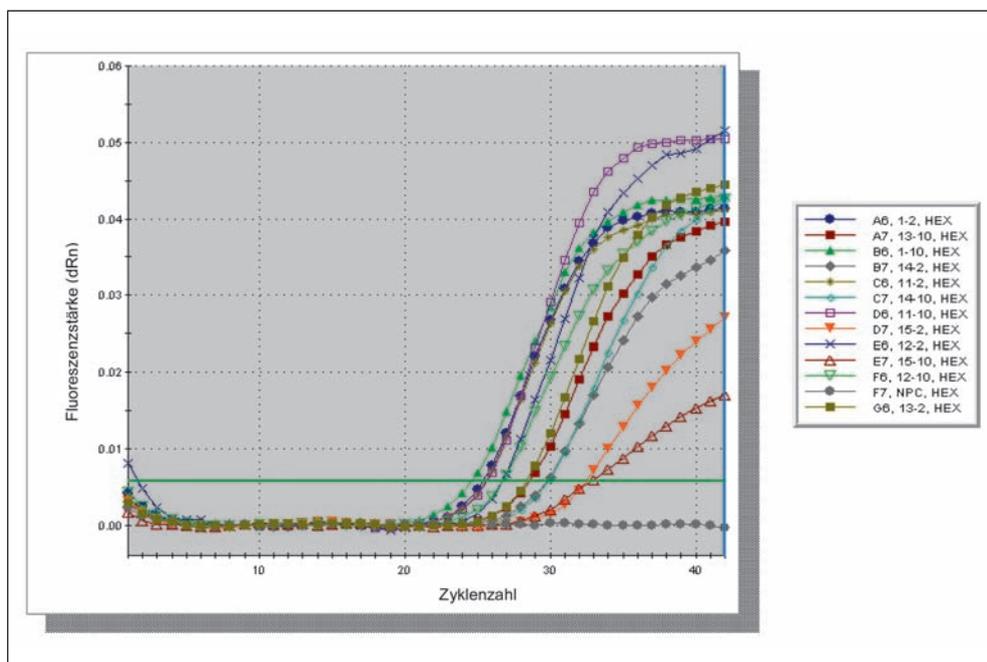
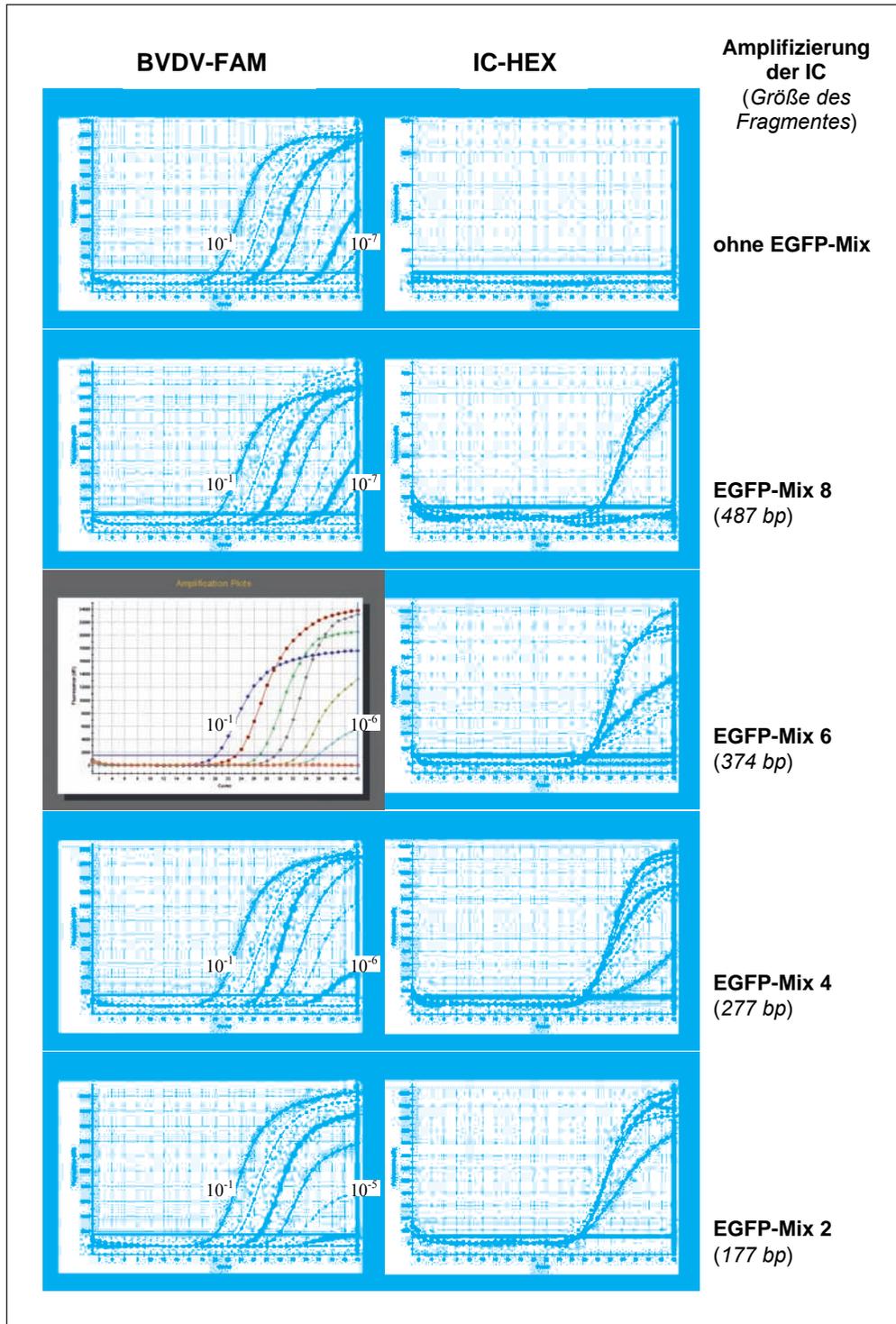


Abb. 6 Amplifizierung und Detektion einer identischen Menge IC-RNA mittels verschiedener EGFP-Mixe. Die Lokalisation der in der Legende aufgeführten Primerkombinationen ist aus Abb. 1 ersichtlich.

2.4 Validierung der Duplex-real-time-RT-PCR zum Nachweis von BVDV und interner Kontrolle

Zunächst wurden die analytische Sensitivität und Spezifität des Panpesti-Systems 1.1 überprüft. Durch Amplifizierung einer \log_{10} -Verdünnungsreihe der *in-vitro*-transkribierten positiven Kontroll-RNA „T7-PC3alf“ (PC-RNA, HOFFMANN et al. 2005) zeigte sich eine analytische Sensitivität von 10 Kopien PC-RNA/Reaktion. Dabei wurde Linearität über einen dynamischen Bereich von 7 \log_{10} -Stufen (10^7 bis 10 Kopien PC-RNA/Reaktion) mit einer PCR-Effizienz von 101,2% nachgewiesen (nicht gezeigt). Im Rahmen der Überprüfung der analytischen Spezifität wurde RNA von 84 verschiedenen Pestiviren (20 BVDV-1, 17 BVDV-2, 36 CSFV der Genotypen 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1 und 3.4, 9 BDV der Genotypen 1, 2 und 3 sowie zwei atypische Pestiviren, „Giraffe“ und „D32/00_HoBi“) analysiert. Es wurde festgestellt, dass das Panpesti-System 1.1 hochsensitiv für die Detektion von BVDV- und CSFV-Stämmen ist und darüber hinaus alle getesteten BDV-Genotypen und die beiden atypischen Pestiviren detektiert werden (nicht gezeigt).

Die Duplex-*real-time*-RT-PCR zum simultanen Nachweis von BVDV und interner Kontrolle kombiniert das Panpesti-System 1.1 mit dem heterologen internen Kontrollsystem, wobei der EGFP-Mix 8 eingesetzt wurde (Tab. 2). Folglich wird ein ca. 200 bp großes Pestivirus-spezifisches PCR-Produkt und ein mit 487 bp deutlich größeres Fragment der IC amplifiziert. Im Duplex-Assay ist die Menge der EGFP-spezifischen Primer auf 5 pmol/Reaktion (gegenüber 20 pmol/Reaktion Pestivirus-spezifische Primer) reduziert, und außerdem wird nur eine limitierte Menge der IC-RNA (ca. 10^5 Kopien IC-RNA/Reaktion) eingesetzt. Un-



ter diesen Bedingungen konnte anhand der Amplifizierung einer \log_{10} -Verdünnungsreihe von BVDV-2-RNA (Stamm CS8644) im Single-Assay (Amplifizierung von BVDV-2-RNA) und Duplex-Assay (Amplifizierung von BVDV-2-RNA und IC-RNA) eine identische Sensitivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Die Sensitivität der Duplex-*real-time*-RT-PCR zum Nachweis von BVDV und interner Kontrolle wurde mit dem „Goldstandard“ der Virusisolierung in Zellkulturen verglichen (nicht gezeigt). Die Verwendung von \log_{10} -Verdünnungsreihen von BVDV, CSFV, BDV des Genotyps 3 und dem atypischen Pestivirus „D32/00_HoBi“ zeigte eine äquivalente oder höhere Sensitivität der *Real-time*-RT-PCR. Bei BDV des Genotyps 1 und 2 sowie dem atypischen Pestivirus „Giraffe“ war die Virusisolierung jedoch ein bis zwei \log_{10} -Stufen sensitiver.

Tab. 2 Primer und Sonden

Oligonukleotid	Sequenz 5'–3'	Position*	Referenz
Panpesti-System 1.1			
BVD190-F	GRA GTC GTC ART GGT TCG AC	187–207	HOFFMANN et al. 2006
V326	CAT GTA CCG TGT ACC TCA ACT	395–375	VILCEK et al. 1994
TQ-Pesti	FAM-TGC YAY GTG GAC GAG GGC ATG C-TAMRA	231–252	GAEDE et al. 2005
internes Kontrollsystem (EGFP-Mix 8)			
EGFP-13-F	CCA CAT GAA GCA GCA CGA C	327–344	HOFFMANN et al. 2006
EGFP-10-R	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	813–794	HOFFMANN et al. 2006
EGFP-HEX	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1	703–724	HOFFMANN et al. 2006

* basierend auf dem BVDV-1-Stamm NADL (acc. no. M31182) und dem Vektor pEGFP-1 (acc. no. U55761)

Zur Bestimmung der diagnostischen Spezifität und Spezifität der Duplex-*real-time*-RT-PCR wurde RNA aus 110 definiert BVDV-negativen und 149 BVDV-positiven Seren eingesetzt. Es wurden weder falsch negative noch falsch positive Ergebnisse beobachtet (nicht gezeigt).

3. Diskussion

Die *Real-time*-(RT)-PCR ist eine leistungsfähige Methode zum Nachweis von Virusnukleinsäuren, die entscheidende Vorteile gegenüber der konventionellen (RT)-PCR aufweist. Zu den wesentlichen Verbesserungen gehören eine erhöhte Sensitivität und Spezifität, ein vermindertes Kontaminationsrisiko, die Möglichkeit zur Quantifizierung von Nukleinsäuremengen und ein erhöhter Probendurchsatz, der sich auch mittels Automatisierung realisieren lässt (Übersicht in MACKAY et al. 2002, 2004, WITTEWITZ et al. 2001). Neuere *Real-time*-PCR-Systeme

Abb. 7 Sensitivität des Panpesti-Systems 1.1 für BVDV (*links*) in Abhängigkeit von der Koamplifizierung der IC und der Größe des koamplifizierten Fragmentes (*rechts*). *Oben*: Single-Assay ohne Koamplifizierung der IC. *Darunter*: Koamplifizierung der IC im Duplex-Assay mit unterschiedlichen EGFP-Mixen, die ein Fragment abnehmender Größe erzeugen und detektieren. Es wurde jeweils eine \log_{10} -Verdünnungsreihe von BVDV-2-RNA (Stamm 890) als Template eingesetzt.

besitzen bis zu sechs Filter für die simultane Detektion unterschiedlicher Wellenlängen, so dass eine Koamplifizierung und -detektion mehrerer Zielsequenzen oder von Zielsequenz und interner Kontrolle (*multiplexing*) möglich ist. Die Koamplifizierung einer internen Kontrolle verringert den Arbeits-, Material- und Kostenaufwand und erhöht die Aussagesicherheit des Resultates erheblich.

Nur in dem von HEATH et al. (2003) beschriebenen TaqMan[®]-nested-RT-PCR-System für BVDV-1 ist ein – homologes – internes Kontrollsystem enthalten. Bei bisher beschriebenen RT-PCR-Protokollen für BVDV waren Probleme mit der Effizienz der Detektion aller publizierten BVDV-Sequenzen vorhanden (BHUDEVI und WEINSTOCK 2001, HEATH et al. 2003, LETELLIER und KERHOFS 2003). Da die für BVDV verfügbaren Gensequenzen eine hohe Heterogenität aufweisen, war die Auswahl von Primern und Sonden in der 5'NTR, mit denen nur BVDV detektiert wird, nicht möglich. Daher wurde ein *Real-time*-RT-PCR System (Panpesti-System 1.1) entwickelt, das Pestiviren und dabei insbesondere BVDV nachweist. Rinder sind ausschließlich mit BVDV infizierbar, so dass die geringe Spezifität kein Problem darstellt und positive Ergebnisse auf eine BVDV-Infektion schließen lassen. Bei diagnostischen Proben von Schafen oder Schweinen muss sich eine weitere Absicherung der Ergebnisse mit Bestimmung der Viruspezies innerhalb des Genus Pestivirus anschließen.

Es wurde ein internes Kontrollsystem, basierend auf dem EGFP-Gen, etabliert. Mittels 12 verschiedener Primerkombinationen können Produkte einer Größe zwischen 132 bp und 712 bp ausgehend von dem gleichen Template (IC-DNA oder IC-RNA) amplifiziert werden. Dieses heterologe System wurde ausgewählt, damit es universell in verschiedenen Protokollen angewendet werden kann. Es ist u. a. in *Real-time*-RT-PCR-Protokolle für andere RNA-Viren, wie für das CSFV (HOFFMANN et al. 2005), das *Rabbit-Haemorrhagic-Disease-Virus* (GALL und SCHIRRMIEER 2006), das Virus der Aviären Influenza und das Virus der Maul- und Klauenseuche (bisher nicht veröffentlicht), sowie für DNA-Viren, wie das Virus der Afrikanischen Schweinepest und das Bovine Herpesvirus 1 (bisher nicht veröffentlicht), integriert worden. Durch Einsatz von geringen Mengen der IC, Verwendung einer limitierten Konzentration der EGFP-spezifischen Primer und letztlich die Auswahl einer geeigneten Länge des amplifizierten Fragmentes der IC kann der Duplex-Assay mit Hinblick auf die maximale Sensitivität für das Zielgen optimiert werden. Es wird eine definierte Menge der IC-DNA oder IC-RNA eingesetzt, so dass neben dem Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse auch suboptimale Nukleinsäureisolierungen und partielle Inhibitionen der RT oder PCR erkannt werden. Die Lagerung der IC-RNA in dem speziell entwickelten „RNA safe buffer“ bei –20 °C und die dabei nachgewiesene Stabilität ermöglichen den Einsatz in Routinelaboren. Ein Nachteil des beschriebenen Systems ist jedoch, dass die Zell- und Virionenlyse nicht überprüft werden kann.

Für eine Duplex-*real-time*-RT-PCR zum Nachweis von BVDV und interner Kontrolle wurde das interne Kontrollsystem, mit dem in diesem Falle ein 487 bp großes Fragment der IC koamplifiziert und detektiert wird, in das Panpesti-System 1.1 integriert. Im Rahmen der Validierung wurde eine analytische Sensitivität von 10 Kopien PC-RNA/Reaktion festgestellt und außerdem gezeigt, dass der Single-Assay und der Multiplex-Assay die gleiche Sensitivität besitzen. Die Überprüfung der analytischen Spezifität ergab, dass das Protokoll hochsensitiv ist für BVDV und CSFV, aber auch BDV und atypische Pestiviren detektiert werden können. Die Sensitivität war der des „Goldstandards“ der Virusisolierung vergleichbar oder lag darüber; nur beim BDV der Genotypen 1 und 2 sowie dem atypischen Pestivirus „Giraffe“ war sie geringer. Die weniger effiziente Detektion dieser Viren erklärt sich vermutlich mit ei-

ner fehlerhaften Basenpaarung im *Forward*-Primer, die drei Nukleotide vom 3'-Ende entfernt ist. Nachdem insgesamt 259 definiert BVDV-negative und -positive Serumproben korrekt detektiert worden sind, wurde die validierte Duplex-*real-time*-RT-PCR für die Untersuchung von Serum, Plasma, Leukozyten und Ohrstanzproben persistent infizierter Kälber eingesetzt (nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode ist außerhalb der sogenannten „diagnostischen Lücke“ ein Poolen von bis zu 100 Serumproben ohne Bedenken möglich. Es erscheint denkbar, dass die „diagnostische Lücke“ durch die Untersuchung von Ohrstanzproben (in Pools von 10 Proben) geschlossen werden kann. Zusammenfassend wurde eine *Real-time*-RT-PCR zum Nachweis von Pestiviren etabliert und umfangreich validiert, die ein heterologes internes Kontrollsystem beinhaltet, das auch auf andere Protokolle übertragen werden kann.

Literatur

- AFONINA, I. A., REED, M. W., LUSBY, E., SHISHKINA, I. G., and BELOUSOV, Y. S.: Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques* 32, 940–949 (2002)
- AVALOS-RAMIREZ, R., ORLICH, M., THIEL, H. J., and BECHER, P.: Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286, 456–465 (2001)
- BAXI, M., McRAE, D., BAXI, S., GREISER-WILKE, I., VILCEK, S., AMOAKO, K., and DEREGT, D.: An one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 116, 37–44 (2006)
- BECHER, P., AVALOS, R. R., ORLICH, M., CEDILLO, R. S., KÖNIG, M., SCHWEIZER, M., STALDER, H., SCHIRRMAYER, H., and THIEL, H. J.: Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96–104 (2003)
- BEER, M., WOLF, G., and KAADEN, O. R.: Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of German BVDV type II isolates. *J. Vet. Med. B* 49, 43–47 (2002)
- BHUDEVI, B., and WEINSTOCK, D.: Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 83, 1–10 (2001)
- BHUDEVI, B., and WEINSTOCK, D.: Detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real-time RT-PCR (Taqman). *J. Virol. Methods* 109, 25–30 (2003)
- BLACK, E. M., LOWINGS, J. P., SMITH, J., HEATON, P. R., and McELHINNEY, L. M.: A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J. Virol. Methods* 105, 25–35 (2002)
- BRUNBORG, I. M., MOLDAL, T., and JONASSEN, C. M.: Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J. Virol. Methods* 122, 171–178 (2004)
- BUSTIN, S. A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193 (2000)
- CARDULLO, R. A., AGRAWAL, S., FLORES, C., ZAMECNIK, P. C., and WOLF, D. E.: Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8790–8794 (1988)
- CHAMBERLAIN, J. S., GIBBS, R. A., RANIER, J. E., NGUYEN, P. N., and CASKEY, C. T.: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141–11156 (1988)
- CHIEN, A., EDGAR, D. B., and TRELA, J. M.: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127, 1550–1557 (1976)
- CLELAND, A., NETTLETON, P., JARVIS, L., and SIMMONDS, P.: Use of bovine viral diarrhoea virus as an internal control for amplification of hepatitis C virus. *Vox Sang.* 76, 170–174 (1999)
- COLLETT, M. S., LARSON, R., GOLD, C., STRICK, D., ANDERSON, D. K., and PURCHIO, A. F.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 165, 191–199 (1988)
- CONE, R. W., HOBSON, A. C., and HUANG, M. L.: Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 30, 3185–3189 (1994)
- COOK, R. F., COOK, S. J., LI, F. L., MONTELABRO, R. C., and ISSEL, C. J.: Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anaemia virus (EIAV). *J. Virol. Methods* 105, 171–179 (2002)

- DE WIT, C., FAUTZ, C., and XU, Y.: Real-time quantitative PCR for retrovirus-like particle quantification in CHO cell culture. *Biologicals* 28, 137–148 (2000)
- DREW, T. W., YAPP, F., and PATON, D. J.: The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 64, 145–154 (1999)
- DROSTEN, C., SEIFRIED, E., and ROTH, W. K.: TaqMan 5' nuclease human immunodeficiency virus type 1 PCR assay with phage-packaged competitive internal control for high-throughput blood donor screening. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4302–4308 (2001)
- FAUQUET, M., MAYO, A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., and BALL, L. A.: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*. London: Elsevier 2005
- FRONHOFFS, S., TOTZKE, G., STIER, S., WERNERT, N., ROTHE, M., BRUNING, T., KOCH, B., SACHINIDIS, A., VETTER, H., and KO, Y.: A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 16, 99–110 (2002)
- GAEDE, W., REITING, R., SCHIRRMIEIER, H., DEPNER, K. R., and BEER, M.: Detection and species-specific differentiation of pestiviruses using real-time RT-PCR. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.* 118, 113–120 (2005)
- GALL, A., and SCHIRRMIEIER, H.: Persistence of rabbit haemorrhagic disease virus genome in vaccinated rabbits after experimental infection. *J. Vet. Med. B* 53/8, 358–362 (2006)
- GIBSON, U. E., HEID, C. A., and WILLIAMS, P. M.: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6, 995–1001 (1996)
- GIESENDORF, B. A. J., VET, J. A. M., TYAGI, S., MENSINK, E. J. M. G., TRIYBELS, F. J. M., and BLOM, H. J.: Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis. *Clin. Chem.* 44, 482–486 (1998)
- HAMEL, A. L., WASLYSHEN, M. D., and NAYAR, G. P.: Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33, 287–291 (1995)
- HEATH, G. S., KING, D. P., TURNER, J. L., WAKELEY, P. R., and BANKS, M.: Use of an internal standard in a TaqMan nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 96, 357–366 (2003)
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., and WILLIAMS, P. M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994 (1996)
- HERTIG, C., PAULI, U., ZANONI, R., and PETERHANS, E.: Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 26, 65–76 (1991)
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S., and GRIFFITH, R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N. Y.)* 10, 413–417 (1992)
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., and WATSON, R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y.)* 11, 1026–1030 (1993)
- HOFFMANN, B., BEER, M., SCHELP, C., SCHIRRMIEIER, H., and DEPNER, K.: Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J. Virol. Methods* 130, 36–44 (2005)
- HOFFMANN, B., DEPNER, K., SCHIRRMIEIER, H., and BEER, M.: A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J. Virol. Methods* 136, 200–209 (2006)
- HOFMANN, M. A.: Construction of an infectious chimeric classical swine fever virus containing the 5'UTR of bovine viral diarrhoea virus, and its application as a universal internal positive control in real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 114, 77–90 (2003)
- HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R., and GELFAND, D. H.: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7276–7280 (1991)
- HÜSSY, D., STAUBER, N., LEUTENEGGER, C. M., RIEDER, S., and ACKERMANN, M.: Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 123–128 (2001)
- HUGHES, G. J., SMITH, J. S., HANLON, C. A., and RUPPRECHT, C. E.: Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. *J. Clin. Microbiol.* 42, 299–306 (2004)
- HYNDMAN, L., VILCEK, S., CONNER, J., and NETTLETON, P. F.: A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *J. Virol. Methods* 71, 69–76 (1998)
- ISHIGURO, T., SAITOH, J., YAWATA, H., YAMAGISHI, H., IWASAKI, S., and MITOMA, Y.: Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal. Biochem.* 229, 207–213 (1995)
- KIM, S. G., and DUBOVI, E. J.: A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. *Biologicals* 31, 103–106 (2003)

- KORIMBOCUS, J., COATES, D., BAKER, I., and BOONHAM, N.: Improved detection of sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *J. Virol. Methods* *103*, 109–120 (2002)
- KOX, L. F., RHIENTHONG, D., MIRANDA, A. M., UDOMSANTISUK, N., ELLIS, K., VAN LEEUWEN, J., VAN HEUSDEN, S., KUIJPER, S., and KOLK, A. H.: A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* *32*, 672–678 (1994)
- KREUZER, K.-A., BOHN, A., LUPBERGER, J., SOLASSOL, J., LE COUTRE, P., and SCHMIDT, C. A.: Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(5'-dimethylaminophenylazo) benzoic acid as a dark quencher dye. *Clin. Chem.* *47*, 486–490 (2001)
- KUMAR, S., REED, M. W., GAMPHER, H. B. Jr., GORN, V. V., LUKHTANOV, E. A., FOTI, M., WEST, J., MEYER, R. B. Jr., and SCHWEITZER, B. I.: Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* *26*, 831–838 (1998)
- KUTYAVIN, I. V., AFONINA, I. A., MILLS, A., GORN, V. V., LUKHTANOV, E. A., BELOUSOV, E. S., SINGER, M. J., WALBURGER, D. K., LOKHOV, S. G., GALL, A. A., DEMPCY, R., REED, M. W., MEYER, R. B., and HEDGPETH, J.: 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* *28*, 655–661 (2000)
- LEE, L. G., CONNELL, C. R., and BLOCH, W.: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* *21*, 3761–3766 (1993)
- LETELLIER, C., and KERKHOFS, P.: Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods* *114*, 21–27 (2003)
- LETELLIER, C., KERKHOFS, P., WELLEMAN, G., and VANOPDENBOSCH, E.: Detection and genotyping of bovine diarrhoea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet. Microbiol.* *64*, 155–167 (1999)
- LIVAK, K. J., FLOOD, S. J., MARMARO, J., GIUSTI, W., and DEETZ, K.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* *4*, 357–362 (1995)
- LIVAK, K. J., and SCHMITTGEN, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402–408 (2001)
- MACKAY, I. M.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* *10*, 190–212 (2004). Review
- MACKAY, I. M., ARDEN, K. E., and NITSCHKE, A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1292–1305 (2002). Review
- MAHLUM, C. E., HAUGERUD, S., SHIVERS, J. L., ROSSOW, K. D., GOYAL, S. M., COLLINS, J. E., and FAABERG, K. S.: Detection of bovine viral diarrhoea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* *14*, 120–125 (2002)
- MCGOLDRICK, A., LOWINGS, J. P., IBATA, G., SANDS, J. J., BELAK, S., and PATON, D. J.: A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *J. Virol. Methods* *72*, 125–135 (1998)
- MCKILLIP, J. L., and DRAKE, M.: Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J. Food Prot.* *67*, 823–832 (2004)
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., and ERLICH, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *51 Pt 1*, 263–273 (1986)
- MULLIS, K. B., and FALOONA, F. A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* *155*, 335–350 (1987)
- NAZARENKO, I. A., BHATNAGAR, S. K., and HOHMAN, R. J.: A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2516–2521 (1997)
- NIESTERS, H. G.: Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin. Microbiol. Infect.* *10*, 5–11 (2004)
- OLEKSIEWICZ, M. B., DONALDSON, A. I., and ALEXANDERSEN, S.: Development of a novel real-time RT-PCR assay for quantitation of foot-and-mouth disease virus in diverse porcine tissues. *J. Virol. Methods* *92*, 23–35 (2001)
- OLVERA, A., SIBILA, M., CALSAMIGLIA, M., SEGALÉS, J., and DOMINGO, M.: Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J. Virol. Methods* *117*, 75–80 (2004)
- PAS, S. D., FRIES, E., DE MAN, R. A., OSTERHAUS, A. D., and NIESTERS, H. G.: Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J. Clin. Microbiol.* *38*, 2897–2901 (2000)
- PERSSON, K., HAMBY, K., and UGOZZOLI, L. A.: Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction—Overcoming its limitations. *Anal. Biochem.* *344*, 33–42 (2005)

- PFEFFER, M., FREYBURG, M. V., KAADEN, O. R., and BEER, M.: A universal 'one-tube' RT-PCR protocol for amplifying isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Res. Commun.* 24, 491–503 (2000)
- PICKERING, J., BAMFORD, A., GODBOLE, V., BRIGGS, J., SCOZZAFAVA, G., ROE, P., WHEELER, C., GHOUBE, F., and CUSS, S.: Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 30, 1–7 (2002)
- RADWAN, G. S., BROCK, K. V., HOGAN, J. S., and SMITH, K. L.: Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* 44, 77–91 (1995)
- RASMUSSEN, T. B., UTTENTHAL, A., STRICKER, K. DE, BELAK, S., and STORGAARD, T.: Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 148, 2005–2021 (2003)
- RISATTI, G. R., CALLAHAN, J. D., NELSON, W. M., and BORCA, M. V.: Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 500–505 (2003)
- ROSENSTRAUS, M., WANG, Z., CHANG, S. Y., DEBONVILLE, D., and SPADORO, J. P.: An internal control for routine diagnostic PCR: Design, properties, and effect on clinical performance. *J. Clin. Microbiol.* 36, 191–197 (1998)
- ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K., and RASMUSSEN, O. F.: Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 37–45 (1992)
- RYAN, G., KLEIN, D., KNAPP, E., HOSIE, M. J., GRIMES, T., MABRUK, M. J., JARRETT, O., and CALLANAN, J. J.: Dynamics of viral and proviral loads of feline immunodeficiency virus within the feline central nervous system during the acute phase following intravenous infection. *J. Virol.* 77, 7477–7485 (2003)
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., and ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491 (1988)
- SANDVIK, T., PATON, D. J., and LOWINGS, P. J.: Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions. *J. Virol. Methods* 64, 43–56 (1997)
- SCHIRRMIEER, H., STREBELOW, G., DEPNER, K., HOFFMANN, B., and BEER, M.: Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 85, 3647–3652 (2004)
- SCHWEIGER, B., ZADOW, I., HECKLER, R., TIMM, H., and PAULI, G.: Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1552–1558 (2000)
- SELVIN, P. R., and HEARST, J. E.: Luminescence energy transfer using a terbium chelate: Improvements on fluorescence energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10024–10028 (1994)
- STÖCHER, M., LEB, V., HOLZL, G., and BERG, J.: A simple approach to the generation of heterologous competitive internal controls for real-time PCR assays on the LightCycler. *J. Clin. Virol.* 25, 47–53 (2002)
- STORDEUR, P., POULIN, L. F., CRACIUN, L., ZHOU, L., SCHANDENE, L., DE LAVAREILLE, A., GORIELY, S., and GOLDMAN, M.: Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J. Immunol. Methods* 259, 55–64 (2002)
- THELWELL, N., MILLINGTON, S., SOLINAS, A., BOOTH, J., and BROWN, T.: Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752–3761 (2000)
- TOULSI, C. D., TURNER, D. R., GRIST, S. A., and MORLEY, A. A.: The effect of cycle number and target size on polymerase chain reaction amplification of polymorphic repetitive sequences. *Anal. Biochem.* 280, 324–326 (2000)
- TOWNER, J. S., ROLLIN, P. E., BAUSCH, D. G., SANCHEZ, A., CRARY, S. M., VINCENT, M., LEE, W. F., SPIROPOULOU, C. F., KSIAZEK, T. G., LUKWIYA, M., KADUCU, F., DOWNING, R., and NICHOL, S. T.: Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J. Virol.* 78, 4330–4341 (2004)
- TYAGI, S., BRATU, D. P., and KRAMER, F. R.: Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnol.* 16, 49–53 (1998)
- TYAGI, S., and KRAMER, F. R.: Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol.* 14, 303–308 (1996)
- VET, J. A., MAJITHIA, A. R., MARRAS, S. A., TYAGI, S., DUBE, S., POIESZ, B. J., and KRAMER, F. R.: Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6394–6399 (1999)
- VILCEK, S., HERRING, A. J., HERRING, J. A., NETTLETON, P. F., LOWINGS, J. P., and PATON, D. J.: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136, 309–323 (1994)
- VILCEK, S., PATON, D. J., DURKOVIC, B., STROJNY, L., IBATA, G., MOUSSA, A., LOITSCH, A., ROSSMANITH, W., VEGA, S., SCICLUNA, M. T., and PAIFI, V.: Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146, 99–115 (2001)

- WEINSTOCK, D., BHUDEV, B., and CASTRO, A. E.: Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *J. Clin. Microbiol.* 39, 343–346 (2001)
- WESTCOTT, D. G., KING, D. P., DREW, T. W., NOWOTNY, N., KINDERMANN, J., HANNANT, D., BELAK, S., and PATON, D. J.: Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet. Res.* 34, 165–176 (2003)
- WHITCOMBE, D., THEAKER, J., GUY, S. P., BROWN, T., and LITTLE, S.: Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnol.* 17, 804–807 (1999)
- WILSON, I. G.: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751 (1997)
- WITTWER, C. T., HERRMANN, M. G., GUNDRY, C. N., and ELENITIBA-JOHNSON, K. S.: Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25, 430–442 (2001). Review
- WITTWER, C. T., HERRMANN, M. G., MOSS, A. A., and RASMUSSEN, R. P.: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130–138 (1997a)
- WITTWER, C. T., RIRIE, K. M., ANDREW, R. V., DAVID, D. A., GUNDRY, R. A., and BALLIS, U. J.: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22, 176–181 (1997b)
- WOLFMAYER, A., WOLF, G., BEER, M., STRUBE, W., HEHNEN, H., SCHMEER, N., and KAADEN, O. R.: Genomic (5' UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch. Virol.* 142, 2049–2057 (1997)

PD Dr. Martin BEER
Institut für Virusdiagnostik
Friedrich-Loeffler-Institut
Boddenblick 5a
17493 Greifswald – Insel Riems
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 38351 7200
Fax: +49 38351 7151275
E-Mail: Martin.Beer@fli.bund.de

Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina Jahrbuch 2006

Leopoldina (Reihe 3), Jahrgang 52

Herausgegeben von Volker TER MEULEN (Würzburg – Halle/Saale)
(2007, 484 Seiten, 53 Abbildungen, 12 Tabellen, 30,00 Euro,
ISBN: 978-3-8047-2448-8)

Das Jahrbuch berichtet über die wissenschaftlichen und wissenschaftspolitischen Aktivitäten der Leopoldina im Jahre 2006. Der Band enthält, neben Angaben zu Präsidium, Senatoren und Mitgliedern, Berichte über die Tagungen, Symposien und Meetings „Autoimmunity“, „Der Knochen als Archiv“, „Life Strategies of Microorganisms in the Environment and in Host Organisms“, „The Synapse: Structure and Function“, „Signal Mechanisms in Somite and Limb Development“, „Thematic Mapping in Geosciences – Applications using New Technologies and Media“, „Strategies in Tissue Engineering“, „BVD – eine (un)heimliche Rinderseuche“, „Cardiovascular Healing – Focus on Inflammation“, „Urinary Tract Infection“, „Pancreatic Cancer– Advances and Challenges“, „Embryonic and Somatic Stem Cells – Regenerative Systems for Cell and Tissue Repair“, „Geomagnetic Field Variations: Space-Time Structure, Processes, and Effects on System Earth“, „Zur Rolle der Veterinärmedizin in Forschung und Gesellschaft“, „Reproduktionsmedizin in Klinik und Forschung: Der Status des Embryos“, „Pharmakotherapie beim kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation“, „Dual Use and Code of Conduct“ und die Beteiligung an der Langen Nacht der Wissenschaften. Zusammenfassungen über die monatlichen Sitzungen der Akademie, die Berichte über die Aktivitäten des Präsidiums und des Leopoldina-Förderprogramms sowie Mitteilungen aus Archiv, Bibliothek und Redaktion der Akademie ergänzen die Jahresübersicht.

In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

IV. Programmatische Eradikation

Rechtlicher Rahmen für das BVD-Programm in Österreich

Johann DAMOSER (Wien)

Zusammenfassung

Die österreichische BVD-Verordnung basiert auf verschiedenen Länderprogrammen, die auf unterschiedlichen wissenschaftlichen Ansätzen beruhen und nun in der Verordnung zusammengeführt wurden. Rechtliche Basis der BVD-Verordnung ist das Tiergesundheitsgesetz.

Abstract

The Austrian BVD ordinance is based on the programs of different federal states which, in turn, reflect different scientific approaches and have now been brought together in the ordinance. The legal basis of the BVD ordinance is the law on animal health.

Grundlage für die österreichische BVD-Verordnung, welche seit 1. August 2004 in Kraft ist, sind freiwillige Ausmerzprogramme der Länder, welche im Vorfeld durchgeführt wurden. Diese Länderprogramme hatten unterschiedliche wissenschaftliche Ansätze, welche in der gegenständlichen Verordnung zusammengeführt wurden, wobei die bereits erzielten Bekämpfungsergebnisse der Länder soweit als möglich berücksichtigt wurden.

Rechtliche Basis der BVD-Verordnung ist das Tiergesundheitsgesetz und nicht das Tierseuchengesetz, da die durch diese Erkrankung hervorgerufenen wirtschaftlichen Schäden für die österreichische Landwirtschaft zwar durchaus vorhanden, in der Regel aber auch für den betroffenen Betrieb nicht existenzbedrohend sind. Auch handelt es sich beim Erreger der BVD nicht um einen Zoonose-Erreger.

Im Zuge der BVD-Bekämpfung wurden gegenüber den bereits seit Jahren laufenden amtlichen Überwachungsprogrammen für IBR/IPV, Bang oder Rinderleukose erstmals neue Wege beschritten. Insbesondere die Einbeziehung von Milchproben ins Überwachungsprogramm, die Befassung akkreditierter Untersuchungsstellen mit der amtlichen Untersuchung der Proben, aber auch die nun erstmals vorgesehene Entnahme von amtlichen Proben durch den Landwirt stellen wesentliche Änderungen dar.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass BVD weder in Vorschriften der Europäischen Gemeinschaft noch im Kodex des Internationalen Tierseuchenamts (OIE) Berücksichtigung findet. Dies bedeutet, dass im Rahmen des internationalen Tierhandels das Prinzip des freien Warenverkehrs zu beachten ist, da sonst mit Vertragsverletzungsverfahren gerechnet werden muss. Spezifische Regelungen des Tierverkehrs sind somit nur innerhalb Österreichs zulässig, das innergemeinschaftliche Verbringen oder der Import von Rindern dürfen durch die Bestimmungen nicht behindert werden.

Ziel des österreichischen BVD-Programms ist die Schaffung BVD-virusfreier Rinderbestände durch Ausmerzung persistent infizierter Tiere. Dazu dienen die Grunduntersuchungen aller österreichischen Rinderbestände, welche Rinder zur Nachzucht halten, sowie die jährlichen Kontrolluntersuchungen zur Herdenüberwachung.

Die Grunduntersuchungen können durch Untersuchung von Tankmilchproben, der Jungkuhgruppe, des Jungtierfensters oder des gesamten Bestandes erfolgen. Die Mindestdauer der Untersuchungen beträgt ein Jahr, Bestandsuntersuchungen sind mit einem negativen Jungtierfenster abzuschließen. Bei Tankmilch, Jungkuhgruppe und Jungtierfenster sind mindestens drei Untersuchungen im Abstand von mindestens fünf und höchstens 14 Monaten durchzuführen. Ein Wechsel auf Tankmilchproben ist jederzeit möglich. Nach Abschluss der Grunduntersuchung gilt der betreffende Bestand als amtlich anerkannt BVD-virusfrei. Ein Bestand bleibt amtlich anerkannt BVD-virusfrei, solange die Kontrolluntersuchung über Tankmilch, Jungkuhgruppe oder Jungtierfenster keinen Hinweis auf eine Infektion zeigt und alle Bestimmungen der Verordnung, insbesondere im Hinblick auf die Verpflichtungen beim Inverkehrbringen von Tieren sowie betreffend Anzeigepflicht, eingehalten wurden.

Geben Grund- oder Kontrolluntersuchung Hinweise auf Anwesenheit des Erregers, ist eine Untersuchung des Bestandes durchzuführen. Dabei sind noch nicht untersuchte Tiere in geschlossene Stallungen zu verbringen und alle während eines Jahres nachgeborenen Kälber innerhalb von 8 Wochen nach der Geburt zu untersuchen. Wird kein Virusausscheider festgestellt, endet die Nachuntersuchung frühestens nach einem Jahr mit Nachweis eines negativen Jungtierfensters.

Wird bei der Bestandsuntersuchung ein persistent infiziertes Tier gefunden, ist dieses Tier längstens innerhalb von 14 Tagen auszumerzen. Die Jahresfrist für die Nachuntersuchung beginnt nach Abschluss der Bestandsuntersuchung und Ausmerzung des letzten PI.

Rinder aus Beständen, welche der Verordnung unterliegen, dürfen nur in Verkehr gebracht werden, wenn eine Einzeltieruntersuchung durchgeführt wurde, welche beweist, dass das Tier nicht persistent infiziert ist. Diese Untersuchung kann entfallen, wenn die letzte Kontrolluntersuchung oder die Grunduntersuchung nicht mehr als drei Monate zurückliegt und ein negatives Ergebnis zeigte. Trächtige Rinder müssen zusätzlich antikörperfrei sein, ausgenommen Tiere in den ersten zwei Jahren nach in Kraft treten der Verordnung, wenn der Nachweis der Antikörper bereits vor der Belegung erfolgte.

Keine Untersuchung benötigen Tiere, welche direkt in eine österreichische Schlachttanlage zur unmittelbaren Schlachtung verbracht werden oder welche ohne Kontakt mit innerösterreichisch verbrachten Rindern direkt auf österreichische Weiden, in reine Mastbestände, in andere Mitgliedstaaten der EU oder in Drittstaaten verbracht werden. Diese Ausnahme gilt jedoch nicht für Bestände in Nachuntersuchung.

Darüber hinaus besteht für Regionen mit günstiger epidemiologischer Entwicklung die Möglichkeit, eine Ausnahme von der verpflichtenden Einzeltieruntersuchung zu beantragen. Eine solche Ausnahme gilt jedoch nur innerhalb des kundgemachten Gebiets für bereits amtlich anerkannt BVD-virusfreie Bestände und ist jeweils auf ein Jahr befristet. Anstelle des Verzichts auf die Einzeltieruntersuchung kann in solchen Gebieten ab Juli 2006 auch die Untersuchung von Ohrgewebesproben durchgeführt werden. Ist die Ohrgewebesprobe positiv, gilt das betreffende Tier als PI, ist sie negativ, gilt das betreffende Tier als BVD-untersucht. Die Verpflichtung zur Durchführung der jährlichen Kontrolluntersuchung wird von dieser Regelung nicht berührt.

Beim innerösterreichischen Verbringen ist das Mitführen einer Gesundheitsbescheinigung, welche die Freiheit des betreffenden Rindes von BVD-Virus, bei trächtigen Tieren auch die Freiheit von BVD-Antikörpern, bestätigt, obligat. Dabei werden auch entsprechende Prüfberichte anerkannt. Der Tierbesitzer ist verpflichtet, diese Gesundheitsbescheinigung mindestens fünf Jahre aufzubewahren. Diese Frist gilt auch für Abgabebestätigungen von PI-Tieren. Weiterhin ist die Impfung gegen BVD untersagt, außer in den Fällen, in denen die Tiere direkt in andere Mitgliedstaaten oder Drittstaaten verbracht werden.

Dr. Johann DAMOSER
Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend
Abteilung IV/5
Radetzkystraße 2
A-1030 Wien
Österreich

Strahlenanwendung und Strahlenforschung in Deutschland

Perspektiven bis zum Jahr 2020

Leopoldina-Symposium

am 13. und 14. April 2007 in Leipzig

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 96, Nr. 355

Herausgegeben von Thomas HERRMANN (Dresden) und Friedrich KAMPRAD (Leipzig)

(2008, 194 Seiten, 29 Abbildungen, 7 Tabellen, 24,95 Euro, ISBN: 978-3-8047-2466-2)

Seit der Entdeckung von Radioaktivität und ionisierender Strahlung am Ende des 19. Jahrhunderts hat die Nutzung dieser physikalischen Phänomene Eingang in zahlreiche Anwendungsbereiche der Medizin, der naturwissenschaftlichen Forschung und der Technik gefunden. Dennoch stößt Strahlenanwendung in der Gesellschaft auf emotionale Ablehnung und eine irrationale Strahlenangst. Der Akzeptanzmangel bewirkte in den vergangenen Jahren einen kontinuierlichen Abbau von Forschungseinrichtungen, die sich mit der Anwendung von ionisierender Strahlung in Medizin, Umwelt und Wissenschaft beschäftigen. Der Band diskutiert Entwicklungstendenzen der Strahlenanwendung bis zum Jahr 2020 und versucht, die sich daraus ergebenden Anforderungen an die Strahlenforschung zu definieren. Dabei werden neben Fragen der Strahlenbiologie, der Strahlenphysik, des Strahlenschutzes sowie medizinischer und technischer Strahlenanwendungen auch die Probleme der unfallbedingten oder beabsichtigten missbräuchlichen Radionuklidfreisetzungen mit Strahlengefährdung der Bevölkerung sowie die Notwendigkeit der Erarbeitung effektiver präventiver Strategien behandelt. Ungeachtet des zu erwartenden Wandels der Methodenvielfalt bis zum Jahr 2020 zeigen die Beiträge, dass Strahlenanwendung auch weiterhin im bisherigen Umfang stattfinden wird und eine kontinuierliche Begleitung durch adäquate Strahlenforschung erforderlich bleibt.

In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Bekämpfung der BVDV-Infektion in Niederösterreich: Das Ziel ist in Sicht

Wigbert ROSSMANITH¹, Roman JANACEK¹, Regina TRAMPLER¹ und
Elfriede WILHELM²

Zusammenfassung

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) ist ein in Österreich weit verbreitetes pathogenes Agens, das der Rinderwirtschaft große finanzielle Verluste verursacht. Im Jahr 1997 wurde in Niederösterreich deshalb ein freiwilliges BVDV-Bekämpfungsprogramm ohne Schutzimpfung nach schwedischem Vorbild begonnen. Dabei werden die Herden durch serologische Untersuchungen der Tankmilch oder durch die serologische Untersuchung von Gruppen jüngerer Rinder in infizierte und nicht infizierte Bestände unterteilt. Die infizierten Bestände werden systematisch untersucht, um persistent infizierte (PI) Rinder zu identifizieren, die durch Schlachtung auszumerzen sind. Das Ziel dabei ist es, die infizierten Herden BVDV-frei zu machen. Die Landwirte werden geschult, Regeln zu beachten, damit ihre nicht infizierten Bestände BVDV-frei bleiben. Aufgrund des guten Fortschrittes des freiwilligen BVDV-Bekämpfungsprogrammes wurde eine BVDV-Verordnung erlassen. Seit August 2004 ist die BVDV-Bekämpfung in Österreich für alle Rinderhalter verpflichtend.

Im Jahr 1998 wurden in 7,5% der teilnehmenden Bestände persistent infizierte Rinder gefunden. Dieser Anteil konnte bis 2005 auf 1,9% vermindert werden. Von den 4294 Herdbuch-Zuchtbetrieben, die am freiwilligen Programm teilnahmen, besuchten 2455 regelmäßig die Rinderversteigerungen. Nach einem Beschluss des Marktveranstalters dürfen dort seit Beginn 2000 nur mehr BVDV-freie Rinder, die – falls trächtig aufgetrieben – auch Antikörper-negativ sein müssen, vermarktet werden. Alle regelmäßig vermarktenden Herdbuch-Züchter, deren Bestände infiziert waren, mussten eine Sanierung durchführen. Im Jahr 2005 waren daher nur mehr 9 (0,36%) der regelmäßig vermarktenden Bestände im Sanierungsprozess. Im Jahr 2005 wurden in 248 (1,65%) der 15000 Bestände mit 459000 Rindern 511 (0,11%) persistent infizierte Rinder gefunden. In der ersten Hälfte des Jahres 2006 wurden nur noch 163 persistent infizierte Rinder gefunden. Zum Vergleichszeitraum des Jahres 2005 (285 PI) ist der Rückgang bemerkenswert. Im Juni 2006 hatten 8730 Bestände einen amtlich anerkannt BVDV-freien Status erreicht. Das Ziel, BVDV vollständig auszurotten, kann in weiteren drei Jahren erreicht werden.

Abstract

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is a widespread pathogen in Austria, which causes substantial losses for the cattle industry. Since 1997 a voluntary control and eradication program without vaccination was introduced in Lower Austria according to the Swedish model. In principle, cattle herds are identified as infected or not infected by using herd level antibody tests on bulk milk and on serological testing of groups of young animals. Not infected herds are monitored with herd level tests by using repeated sampling. Virus clearance in infected herds is achieved by identification and slaughtering of persistently infected (PI) animals. Farmers are educated to follow rules related to biosecurity of herds. Due to successful voluntary BVDV eradication in Austria, a federal law was agreed on in committing all herd owners to follow BVDV eradication. Since August 2004, the BVDV eradication scheme is compulsory in Austria.

In 1998, persistently infected animals were identified in 7.5% affiliated herds of herdbook breeders in Lower Austria. This percentage was reduced to 1.9% in 2005. Out of a total of 4,294 herdbook breeders in Lower Austria 2,455 continuously attend to auctions. Since 2000 antibody positive dams from infected herds cannot be offered at

1 Abteilung Veterinärangelegenheiten, Amt der Niederösterreichischen Landesregierung, Landhausplatz 1, 3109 St. Pölten, Österreich.

2 Niederösterreichischer Tiergesundheitsdienst, Schillerring 13, 3130 Herzogenburg, Österreich.

auctions. The herdbook breeders, active on markets, had to clear up their herds. Hence, in 2005 only nine infected herds (0.36 %) are still under clearance. Furthermore, in 2005 only 511 (0.11 %) persistently infected animals were identified in 248 herds (1.65 %) out of a total of 15,000 cattle herds with 459,000 animals, in Lower Austria. In the first half year of 2006, only 163 persistently infected animals were detected, a remarkable decrease compared to 2005 (285 PI). In June 2006 a number of 8,730 herds have reached a certified BVDV free status. The aim, a total eradication of BVDV infected herds is achievable in another three years only.

1. Einleitung

Die Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) wurde erstmals von (OLAFSON et al. 1946) beschrieben. Die wirtschaftlichen Schäden ergeben sich aus pränatalen Infektionen (HOUE and PALFI 1993), die Aborte, Unfruchtbarkeit, Missbildungen der Kälber und vor allem das Entstehen persistent infizierter, immuntoleranter Kälber, die nicht selten an *Mucosal Disease* verenden, hervorrufen (BROWNLIE et al. 1984, ROEDER und DREW 1984). In infizierten Herden treten Durchfälle und respiratorische Krankheitserscheinungen vermehrt auf (BAKER 1995).

In Österreich wurden BVDV-Impfstoffe sehr selten verwendet. Diese Vorsichtsmaßnahme hat sich als richtig erwiesen, da über BVDV-kontaminierte Lebendvakzinen (KREEFT et al. 1990) und schwere Ausbrüche von BVDV-Typ-2-Infektionen berichtet wurde (LINDBERG and ALENIUS 1999). Keinesfalls ist mit einer Schutzimpfung gegen BVDV eine Eradikation des Erregers möglich. Die Impfung müsste somit auf unbestimmte Dauer fortgesetzt werden, was aus wirtschaftlichen Gründen in Niederösterreich nicht vorstellbar ist.

Die Erkenntnisse über das Verhalten von BVDV gegenüber dem Wirt und im Bestand wurden für die Etablierung eines systematischen Ausmerzprogramms genutzt (ALENIUS et al. 1997). Diese Vorgangsweise ist für die Bekämpfung anderer Virusinfektionen vorbildhaft.

In Schweden und Norwegen wurde 1993, in Finnland und Dänemark 1994 mit BVDV-Eradikationsprogrammen ohne Impfung begonnen, die bereits große Fortschritte erzielt haben (SANDVIK 2004).

Der zentrale Punkt eines BVDV-Bekämpfungsprogrammes ist es, geborene und ungeborene persistent infizierte Rinder, die die Hauptrolle in der Virusübertragung spielen, zu erkennen und aus den Beständen zu eliminieren sowie die Neuinfektion von Beständen durch Unterbinden des Verkehrs mit geborenen oder ungeborenen persistent infizierten Rindern zwischen den Beständen zu verhindern (RADOSTITS und LITTLEJOHN 1988). Da ein persistent infiziertes Rind den Bestand effizient durchseucht, sind Antikörper-positive Rinder des Bestandes im Alter von 6 bis 9 Monaten ein starkes Indiz dafür, dass ein persistent infiziertes Rind im Bestand ist (HOUE 1992), oder erst vor maximal 9 Monaten von dort abgegangen ist. Ohne persistent infiziertes Rind im Bestand kommt es zu keinen weiteren Infektionen und Serokonversionen, da mit BVDV transient infizierte Rinder benachbarte Rinder unter Praxisbedingungen nicht anstecken können (NISKANEN et al 2002). Die Strategie des BVDV, sich dem erfolgreich arbeitenden Immunsystem eines infizierten Muttertieres durch die Infektion des Fötus zu entziehen, indem es sich für 6 bis 8 Monate versteckt (PETERHANS et al. 2004), dabei gleichzeitig ein unreifes Immunsystem so schädigen kann, dass daraus eine Immuntoleranz resultiert, die wiederum für die Erregerausbreitung nach der Geburt sorgt, macht es notwendig, Untersuchungen zur Herdenklassifizierung über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr durchzuführen. Mit den Untersuchungen zur Herdenklassifizierung können nicht infizierte und infizierte Herden identifiziert werden. Der weitere Schutz und die

Überwachung der nicht infizierten Herden sind mindestens so wichtig wie die Sanierung der infizierten Herden (ALENIUS et al. 1997).

Die Untersuchung von Sammelmilchproben auf BVDV-Antikörper ist eine äußerst kostengünstige Methode zur Klassifizierung der Bestände und kann, wenn schon mehrere Jahre kein persistent infiziertes Rind mehr in der Herde war, zur Überwachung der Bestände angewandt werden (NISKANEN 1993).

Dieser Beitrag soll die Vorteile des skandinavischen BVDV-Bekämpfungsmodells zeigen und über den sehr guten Fortschritt in Niederösterreich berichten.

2. Material und Methode

2.1 Teilnehmende Bestände

Seit 1997, dem Beginn des freiwilligen BVD-Bekämpfungsprogramms in Niederösterreich, nehmen 4294 Herdbuch-Züchter teil. Im August 2005, ein Jahr nach in Kraft treten der BVD-Verordnung, waren alle der rund 15 000 Rinderhalter in das BVD-Bekämpfungsprogramm aufgenommen.

2.2 Grund- und Kontrolluntersuchung zur Herdenklassifizierung

Die in der BVD-Verordnung vorgeschriebene Untersuchungsmethode (Anonym 2004) entspricht dem freiwilligen Untersuchungsprogramm, das 1997 in Niederösterreich eingeführt wurde. Durch drei, über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr durchzuführende Antikörperuntersuchungen mit unverdächtigem Ergebnis von Tankmilch-, Jungkuh-, oder Jungtierproben (sogenanntes Jungtierfenster) kann ein Bestand mit abgeschlossener Grunduntersuchung als amtlich anerkannt BVD-virusfreier Bestand klassifiziert werden. Nach Abschluss der Grunduntersuchung sind in den Beständen mindestens einmal jährlich Kontrolluntersuchungen zur Herdenüberwachung durch Antikörperuntersuchungen durchzuführen.

2.3 Bestandsuntersuchung zur Herdensanierung

Ergibt eine Antikörperuntersuchung der Tankmilch der Grund- oder Kontrolluntersuchung ein Ergebnis, das auf ein aktuelles BVD-Geschehen hinweist, ist der Verdacht durch eine weitere Antikörperuntersuchung (Jungkuhproben, Jungtierfenster) abzuklären und – falls notwendig – eine Bestandsuntersuchung einzuleiten. Die Bestandsuntersuchung ist auch sofort durchzuführen, wenn z. B. ein persistent infiziertes Rind bereits gefunden wurde. Die Bestandsuntersuchung mit dem Ziel, alle im Bestand vorhandenen persistent infizierten Rinder zu erkennen, hat die Untersuchung aller Rinder eines Bestandes zu umfassen. Ein Rind gilt dabei als nicht persistent infiziert, wenn in seiner Blutprobe, die nicht vor der vollendeten vierten Lebenswoche gezogen wurde, BVD-Antigen, BVD-Virus oder BVD-spezifische Nukleinsäuren nicht nachweisbar ist/sind. Die Untersuchung auf BVD-Antigen, BVD-Virus oder BVD-spezifische Nukleinsäuren kann entfallen, wenn in der Blutprobe des betreffenden Rindes, die in diesem Fall nicht vor dem vollendeten sechsten Lebensmonat gezogen wurde, deutliche Mengen von BVDV-spezifischen IgG nachgewiesen werden können, die auf ein immunkompetentes Rind schließen lassen. Die Nachuntersuchungen, die an die Bestandsuntersuchung anzuschließen

sind, mit der nachgeborene persistent infizierte Rinder gefunden werden sollen, umfassen die Untersuchungen aller Rinder des Bestandes, die in einem Zeitraum von zwölf Monaten nach einer Bestandsuntersuchung bzw. nach der Ausmerzung des letzten persistent infizierten Rindes geboren wurden. Nach Abschluss der Nachuntersuchungen, frühestens ein Jahr nach Entfernung des letzten persistent infizierten Rindes, ist die Untersuchung eines Jungtierfensers anzuschließen. Alle Blutproben der Rinder, die nach der Entfernung des letzten persistent infizierten Rindes geboren wurden, müssen Antikörper-negativ sein.

2.4 Pflichten der Tierbesitzer für das Inverkehrbringen von Rindern

Beim Verbringen von Rindern in und aus Beständen, die der BVD-Verordnung unterliegen, sind die Besitzer der Bestände verpflichtet, je nach Klassifizierung des jeweiligen Bestandes Untersuchungen vor dem beabsichtigten Verbringen durchführen zu lassen (Anonym 2004).

2.5 Proben, Labormethoden

Aus den Beständen werden die Blutproben durch Amtstierärzte sowie durch besonders geschulte, nachweislich qualifizierte Tierärzte und die Milchproben durch Kontrollassistenten des Landeskontrollverbandes entnommen und an das Labor eingesandt. Die 11,5 ml Polypropylenröhrchen für Milchproben enthalten 16 µl ProClin™ (Supelco, Bellafonte, USA) als Konservierungsmittel. Für Blutproben werden 10 ml Kalium-EDTA-Röhrchen verwendet.

Spezifische Antikörper gegen das BVDV in Blut- und Milchproben werden seit Beginn des Programms mit einem indirekten ELISA (Svanovir™, Svanova, Biotech, Uppsala, Schweden) nachgewiesen. Die Untersuchung der EDTA-Blutproben auf BVDV-Antigen der Rinder ab einem Alter von vier Wochen oder vor der Aufnahme der Biestmilch erfolgt seit August 2004 mit ELISA (HerdCheck BVDV Ag/Serum, IDEXX Scandinavia, Österbybruck, Schweden). Von Beginn 1997 an bis August 2004 wurde der Ag ELISA aus Leukozytenpräparationen durchgeführt (HerdCheck BVDV Ag/Leukocyten, IDEXX Scandinavia, Österbybruck, Schweden). Ab dem Jahr 2000 wurde die Leukozytenpräparation modifiziert (ROSSMANITH et al. 2001). Derzeit wird dieses ELISA-System nur noch zur Bestätigung der positiven Reaktionen des HerdCheck BVDV Ag/Serum ELISA eingesetzt.

Alle Ergebnisse des Ag-ELISA werden mit RT-PCR überprüft (VILCEK et al. 1994, ROSSMANITH et al. 2001). Zur Kontrolle der RNA-Extraktion und Amplifikation der cDNA wird jeder Blutplasmaprobe eine definierte Menge der RNA des MS2-Phagen zugesetzt (PYRA et al. 1994).

2.6 Elektronisches BVD-Informationsnetzwerk

Die Verwaltung der für die BVD-Bekämpfung und -Überwachung relevanten Daten, wie Alter, Abstammung, Herkunft, Standort und Ohrmarke, der Rinder sowie deren Untersuchungsergebnisse erfolgt mit einer Datenbank-Applikation. Diese Software besteht aus einer Web- und einer Laborapplikation.

- *Webapplikation:* Die Webapplikation ermöglicht die Anzeige einzelner bzw. aller Rinder eines Bestandes, deren Daten und deren BVD-Untersuchungsergebnisse. Die berechtigten Benutzer können Klassifizierungen der Bestände in der Webapplikation vornehmen. Wei-

ter kann das Inverkehrbringen von Rindern durch eine Schnittstelle zur Rinderdatenbank der Agrarmarkt Austria (AMA) überwacht werden.

- *Laborapplikation:* Die Laborapplikation dient zur Erfassung und Verwaltung der Proben sowie der Zuordnung ihrer Messergebnisse. Gleichfalls können damit Prüfberichte (Laborbefunde) konform der internationalen Norm EN/ISO 17025 erstellt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Bewertung der diagnostischen Methoden – Nachweis von BVDV-spezifischen Antikörpern mit indirektem ELISA

Seit mehr als neun Jahren wird der indirekte ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen BVDV erfolgreich eingesetzt. Die Diagnostik einer BVDV-Infektion kann wegen der zahlreichen genomischen und antigenetischen Varianten des BVDV Schwierigkeiten verursachen. Der indirekte ELISA kann die spezifischen Antikörper nachweisen, auch wenn sie von mit BVD-1 genomisch wenig verwandten BVDV induziert wurden. Schon vor der Einführung des verpflichtenden Eradikationsprogramms in Österreich wurde die genetische Variabilität des BVDV in Österreich untersucht. In den Jahren 1997 und 1998 wurden insgesamt 48 BVDV-positive Feldisolate sequenziert und als BVD-1-Spezies klassifiziert (VILCEK et al. 2001, KOLEŠÁROVÀ et al. 2004). In der Steiermark wurden zwischen 1998 und 2000 weitere 71 BVDV-Feldisolate gesammelt und 70 als BVD-1- und ein Isolat als BVD-2-Spezies typisiert (VILCEK et al. 2003). Neben den in Österreich vorkommenden BVDV-Typen 1 und 2 sowie dem *Border-Disease-Virus* kann auch das atypische Pestivirus Isolat D32/100 „HoBi“, das in Österreich noch nicht isoliert wurde, mit dem indirekten ELISA durch den Antikörpernachweis erfasst werden (KAMPA et al. 2004). Die Panpestivirus-Primer 324/326 (VILCEK et al. 1994) sind hingegen nicht geeignet, dieses atypische Pestivirus mit PCR nachzuweisen (SCHIRRMIEIER et al. 2004).

Die Ergebnisse des indirekten ELISAs lassen Interpretationen zu, die für die BVDV-Diagnostik des Einzeltieres und eines Bestandes wertvoll sind.

Können mit dem indirekten ELISA keine Antikörper gegen BVDV nachgewiesen werden, hat das getestete Rind keine Infektion mit BVDV durchgemacht, oder es ist selbst persistent infiziert und hat die maternalen Antikörper abgebaut. Der Abbau ist bei den meisten persistent infizierten Rindern im Alter von zehn Wochen abgeschlossen (PALFI 1993). Nur in Ausnahmefällen sind bei persistent infizierten Rindern bis zum vierten Lebensmonat geringe Titer maternaler Antikörper nachweisbar. Werden maternale Antikörper auf nicht persistent infizierte Kälber übertragen, bleiben diese bis zum sechsten Lebensmonat, geringe Titer bis zum achten Lebensmonat, detektierbar.

Antikörper-negative trächtige Rinder, die nach dem 150. Trächtigkeitstag getestet wurden, bringen, wenn sie selbst nicht persistent infiziert sind, auch keine persistent infizierten Rinder zur Welt. Die Rinder, die vor der Belegung Antikörper gegen BVDV durch eine Infektion ausgebildet haben, sind im höchsten Ausmaß vor einer neuen Infektion ihrer Frucht geschützt.

Rinder, die nach einer Infektion Antikörper gegen BVDV ausgebildet haben, gelten als immunkompetent und sind unter Praxisbedingungen selbst nicht persistent infiziert. Bei diesen Rindern erübrigt sich eine Untersuchung auf BVDV-Antigen.

Werden bei Bestandsuntersuchungen Antikörper-negative belegfähige und trächtige Rinder angetroffen, ist mit einer längeren Anwesenheit des BVDV im Bestand zu rechnen. Sind

jedoch im Gegensatz dazu alle Rinder des Bestandes Antikörper-positiv, ist der Verbleib von BVDV im Bestand begrenzt. Dem Landwirt kann somit durch das Ergebnis der Antikörperuntersuchung bei Bestandsuntersuchungen prognostiziert werden, in welchem Zeitrahmen eine Bestandsanierung durchführbar ist.

Die Möglichkeit, Bestände durch Tankmilchproben billig zu untersuchen und zu klassifizieren, ist ein großer Vorteil des indirekten ELISA-Tests (NISKANEN 1993). Die Untersuchungsergebnisse werden dem Landwirt zur Kenntnis gebracht und tragen zur Motivation bei, seine Herde vor Neuinfektionen zu schützen oder weiterführende Untersuchungen zu beginnen. Der Anteil der laktierenden Kühe am Gesamtbestand beträgt in niederösterreichischen Jungvieh aufziehenden Milchviehbetrieben rund 40–50 %.

Neuinfektionen von seronegativen Beständen sind für den Fall, dass eine laktierende Kuh infiziert wurde, mit der Untersuchung der Tankmilch bereits 14 Tage nach der Infektion feststellbar. Durch die Untersuchung auf BVDV-Antigen eines nachgeborenen möglicherweise persistent infizierten Kalbes, gelingt dies frühestens sechs bis sieben Monate nach der Infektion seines Muttertieres.

Nur in vereinzelten Fällen wurde von kleinen Beständen berichtet, dass der indirekte ELISA niedrige BVDV-Antikörperergebnisse lieferte, obwohl in der Herde eine persistent virämische Kuh war. Der Eintrag ihrer stark virushaltigen Milch in die Tankmilch begünstigte die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen, die möglicherweise die Analyse der Antikörper gegen BVDV negativ beeinflussen (OBRITZHAUSER et al. 2002). Die Tankmilchproben wurden durch die Milch der persistent virämischen Kuh jedoch nicht negativ. Eine Herabsetzung des Grenzwertes, ab wann eine Tankmilchprobe als verdächtig gilt, kann dieses Problem lösen.

Bei Verwendung von Milch als Probenmatrix muss die Probe konserviert werden. Schon eine geringe Verschiebung des pH-Wertes durch eine mit freiem Auge nicht erkennbare Säuerung der Milch, stört die Antigen-Antikörper-Reaktion des indirekten ELISA-Tests.

Werden mehrere Rinder von unterschiedlichem Alter auf Antikörper gegen BVDV untersucht, ist das Alter des jüngsten Rindes, das noch Antikörper positiv ist, ein Indikator, wie lange die Anwesenheit eines persistent infizierten Rindes zurückliegt, da aktiv erworbene Antikörper lebenslang nachweisbar bleiben und ohne die Anwesenheit eines persistent infizierten Rindes keine Serokonversionen in einer Herde stattfinden (HOUE 1992). Diese Tatsache wird bei Bestandsuntersuchungen und Nachuntersuchungen genutzt, die durch ein Jungtierfenster abzuschließen sind. Alle Rinder, die nach Ausmerzung des letzten persistent infizierten Rindes geboren wurden, müssen nach Abbau ihrer kolostralen Antikörper, Antikörper-negativ sein.

Auf die Fülle von Informationen, die die Untersuchung auf Antikörper gegen BVDV bietet, kann in einem Eradikationsprogramm nicht verzichtet werden.

3.2 Bewertung der diagnostischen Methoden – Nachweis von BVDV-Antigen

In den ersten zwei Jahren des freiwilligen Bekämpfungsprogramms in Niederösterreich wurde ausschließlich ein kommerziell erhältlicher Antigennachweis verwendet. Der Nachteil dieses Produktes bestand in der zum Teil mangelhaften Sensitivität, persistent infizierte Rinder nachzuweisen. Bei Bestandsuntersuchungen fielen immer wieder Serokonversionen auf, die, wie sich später herausstellte, von nicht erkannten, persistent infizierten Rindern, verursacht wurden. Darüber berichteten auch andere Autoren (SHANNON et al. 1997, ZIMMER et al.

1997). Maternale Antikörper, die mit dem Testsystem interferieren und die Virustiter in den mit kolostralen Antikörper ausgestatteten Kälbern verringern, wurden für die mangelhafte Sensitivität der damals verwendeten Ag-ELISA Testsysteme verantwortlich gemacht. Diese nicht erkannten persistent infizierten Rinder sind auch die wahrscheinlichste Ursache, dass über ein länger dauerndes Zirkulieren von BVDV in Beständen ohne die Anwesenheit von persistent infizierten Rindern vereinzelt berichtet wurde (BARBER et al. 1985, MOERMANN et al. 1994, MOEN et al. 2005). Eine andere Möglichkeit wäre, dass im Bestand zwar ungebohrne persistent infizierte Rinder waren, die jedoch verworfen wurden, und sich empfängliche Rinder an stark virushaltigem Abortmaterial oder an Lochien ansteckten.

Durch eine Modifikation der Leukozytenpräparation, statt der gleichen Menge Blut und Ammoniumchloridlösung wurde die vierfache Menge Ammoniumchloridlösung verwendet, konnte die Sensitivität des Ag-ELISA-Tests verbessert werden (ROSSMANITH et al. 2001). Ab 1998 wurden alle Ergebnisse des Ag-ELISA mit RT-PCR überprüft. Mit der verbesserten Leukozytenpräparation des Ag-ELISA konnte der Anteil der Proben, die im Ag-ELISA ein negatives oder zweifelhaftes Ergebnis und in der RT-PCR ein positives Ergebnis erzielten, von 4,71 auf 0,82% gesenkt werden.

Anhand von 4630 Weidetieren aus 732 Beständen, die auf Gemeinschaftsweiden aufgetrieben wurden, konnte in den Jahren 1999–2002 gezeigt werden, dass durch den sicheren Nachweis der persistent infizierten Rinder vor dem Weideauftrieb eine Ausbreitung von BVDV auf Gemeinschaftsweiden verhindert werden kann, auch wenn die aufgetriebenen Rinder zum Teil aus infizierten Betrieben stammen und die Anwesenheit eines transient infizierten Rindes beim Weideauftrieb nicht auszuschließen ist (DEINHOFFER et al. 2004). Ein Zirkulieren von BVDV, ohne die Anwesenheit eines persistent infizierten Rindes, konnte auf Gemeinschaftsweiden in Niederösterreich niemals beobachtet werden. Es wurden jeweils 10% der Rinder, die im Frühjahr beim Weideauftrieb Antikörper-negativ waren, im Herbst beim Weideabtrieb erneut auf Antikörper getestet.

Zu Beginn des Jahres 2000 wurde eine neue Konfiguration des HerdCheck BVDV Ag/Leukozyten-ELISA von der Firma IDEXX eingeführt und im niederösterreichischen Bekämpfungsprogramm verwendet. Es konnten annähernd 100% gleiche Resultate mit diesem neuen Ag-ELISA und der RT-PCR erzielt werden.

Seit 2004 ist der HerdCheck BVDV Ag/Serum-ELISA der Firma IDEXX in Verwendung. Dieser Ag-ELISA zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus. Sowohl positive als auch negative Ergebnisse des Ag/Serum-ELISA werden mit RT-PCR überprüft. Es wird versucht, jedes positive Ergebnis des Ag/Serum-ELISA mit dem Ag/Leukozyten-ELISA zu bestätigen, da nach den Erfahrungen der letzten Jahre dieser ELISA fast keine transienten Virämiker erfasst, die nicht ausgemerzt werden sollen.

Im Jahr 2005 wurden 59 626 Proben auf BVDV-Antigen und BVD-spezifische Nukleinsäuren untersucht. 511 Rinder wurden aufgrund einer einmal oder wiederholt durchgeführten Untersuchung als persistent virämisch eingestuft. Die endgültige Entscheidung, ob ein Rind als persistent virämisch anzusehen ist und ausgemerzt oder einer Wiederholungsuntersuchung unterzogen werden muss, liegt beim Amtstierarzt, der nach der BVD-Verordnung die epidemiologische Situation des Bestandes dabei zu berücksichtigen hat. Die Untersuchungsstelle empfiehlt die Durchführung einer Wiederholungsuntersuchung laut BVD-Verordnung frühestens 3 Wochen nach der ersten Untersuchung, wenn mit den 3 verwendeten Nachweismethoden ein übereinstimmendes positives Ergebnis nicht erzielt werden kann. Von den 59 626 Proben aus Niederösterreich war das bei 91 Proben der Fall.

Davon waren 52 Proben bei der ersten Untersuchung im Ag/Serum-ELISA positiv und in den anderen 2 Testverfahren negativ. 6 Proben wurden einer Wiederholungsuntersuchung unterzogen. Bei allen konnte eine Serokonversion festgestellt werden, so dass auszuschließen ist, dass die Probe von einem persistent infizierten Rind stammte. Bei weiteren 35 Proben war bei der ersten Untersuchung der Ag/Serum-ELISA und die RT-PCR positiv, hingegen der Ag/Leukozyten-ELISA negativ oder fraglich. 29 der 35 Proben wurden wiederholt. Bei 13 wurde eine Serokonversion nachgewiesen. 9 Proben waren bei der Wiederholungsuntersuchung in allen 3 Testsystemen, also auch im Ag/Leukozyten-ELISA, positiv. 7 Proben blieben im Ag/Leukozyten-ELISA negativ oder fraglich, und ihre positive Reaktion in der RT-PCR und im Ag/Serum-ELISA blieb bestehen. Bei 3 weiteren der 91 Proben mit inkongruenten Testergebnissen war nur die RT-PCR positiv, die anderen Testsysteme negativ. Bei allen 3 Proben konnte im Zuge der Wiederholungsuntersuchung eine Serokonversion nachgewiesen werden. Nur eine der 91 Proben war im Ag/Leukozyten-ELISA sowie in der RT-PCR positiv und im Ag/Serum-ELISA negativ. Diese Probe wurde leider nicht wiederholt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der Ag/Serum-ELISA wegen seiner Sensitivität ein für Eradikationsprogramme sehr nützliches Nachweisverfahren ist. Anhand von 19 bei 35 Wiederholungsuntersuchungen nachgewiesenen Serokonversionen wird klar, dass der Ag/Serum-ELISA auch transiente BVDV-Infektionen erfasst. Wird dieser ELISA ohne Bestätigung durch den Ag/Leukozyten-ELISA oder ohne die Durchführung einer Wiederholungsuntersuchung eingesetzt, ist eine Unterscheidung zwischen persistenten und transienten Virämikern schwierig.

Es ist unbedingt notwendig, sowohl bei der Erst- als auch bei der Wiederholungsuntersuchung die BVDV-spezifischen Antikörper in den Proben zu bestimmen. Mit dem Nachweis einer Serokonversion steht fest, dass die Probe von einem transient infizierten Rind stammte.

4. Auswirkungen der BVD-Bekämpfung auf die Rinderbestände

Nach den ersten Untersuchungen im Jahr 1997 waren 55,7% der Tankmilchproben aus Herdbuch-Zuchtbetrieben aus Niederösterreich verdächtig. In diesen Betrieben musste auf die Untersuchung jüngerer Tiergruppen zurückgegriffen werden, um letztlich zu entscheiden, ob mit der Anwesenheit eines persistent infizierten Rindes in diesen Betrieben zu rechnen ist. Die Untersuchung des Jungtierfensters ergab 23,2% verdächtige Betriebe; und in einem Drittel dieser Betriebe, das sind rund 7,5%, wurden ein oder mehrere persistent infizierte Rinder gefunden (ROSSMANITH und DEINHOFER 1998).

Im Jahr 2005 ist dieser Anteil in jetzt 4294 noch existierenden Herdbuch-Zuchtbetrieben auf 1,9% gesunken. Noch besser ist die Situation in den Betrieben, die regelmäßig Viehversteigerungen und Viehmärkte beschicken. Im Jahr 1999 beschloss der Vorstand des NÖ-Rinderzuchtverbandes, dass aus infizierten Beständen auf Viehmärkte nur mehr nicht trächtige Rinder aufgetrieben werden dürfen. Dieser freiwillig gefasste Vorstandsbeschluss zwang die regelmäßig auftreibenden Betriebe, ihre Betriebsanierung voranzutreiben. Unter den 2455 regelmäßig vermarktenden Betrieben gab es nur noch 9 Betriebe, die 2005 ein persistent infiziertes Rind aufwiesen (0,36%). Der geringe Anteil an infizierten Beständen in diesen 2455 Betrieben ist ein starker Indikator, dass ein BVD-Bekämpfungsprogramm auch in einzelnen Beständen erfolgreich verlaufen kann, obwohl die restlichen Bestände noch nicht teilnehmen.

Die Voraussetzung dafür ist, dass der Kontakt mit persistent infizierten Rindern auf Gemeinschaftsweiden (ROSSMANITH et al. 2005), Hausweiden, Viehtransporten und der Zukauf von geborenen und ungeborenen persistent infizierten Rindern verhindert wird. Das Aufrechterhalten eines BVD-freien Bestandes ist nicht so aufwendig und teuer, wie von Landwirten in anderen Ländern erwartet wird (GUNN et al. 2005).

Der Verseuchungsgrad der Herdbuch-Zuchtbetriebe war zu Beginn deutlich höher als der der Landeszuchtbetriebe, die zum Großteil erst seit 2004 mit dem Inkrafttreten der landesweiten BVD-Verordnung teilnehmen. Der Anteil der Landeszuchtbetriebe, in welchen 2005 ein persistent infiziertes Rind festgestellt wurde, beträgt 1,45 %. In vier Bezirken Niederösterreichs mit erheblicher Dichte an Rinderhaltern konnte der Anteil der Bestände, die 2005 ein persistent infiziertes Rind aufwiesen, auf weniger als 1 % reduziert werden. In weiteren vier Bezirken mit intensiver Rinderhaltung liegt der Anteil der Bestände mit persistent infizierten Rindern zwischen 1–2 %. In der Summe befinden sich in diesen acht Bezirken 74 % der Rinderbestände, in denen 70 % der niederösterreichischen Rinder gehalten werden. Nur in drei weiteren Bezirken, mit 18 % der Bestände und 16 % der Rinder von Niederösterreich, liegt der Anteil der infizierten Bestände zwischen 2,6–2,9 %. In den restlichen Bezirken mit extensiver Rinderhaltung liegt der Anteil der infizierten Bestände zwischen 0 und 1,8 %. Im Jahr 2005 wurden in 248 (1,65 %) von rund 15 000 niederösterreichischen Beständen 511 persistent infizierte Rinder festgestellt. Der Anteil der persistent infizierten Rinder an der gesamten Rinderpopulation betrug 1,1 Promille. Bis Mitte Juni 2006 wurden 163 persistent infizierte Rinder gefunden. Dies ist ein bemerkenswerter Rückgang der festgestellten persistent infizierten Rinder zum Vergleichszeitraum des Jahres 2005 (285 PI). Mit Ende des Jahres 2005 waren 7931 Bestände amtlich anerkannt BVDV-frei. Bis Mitte Juni 2006 haben bereits 8730 Bestände diesen Status erreicht.

Sehr gute Erfolge der BVD-Bekämpfung werden aus den skandinavischen Ländern berichtet. In Schweden existieren nur noch 205 (0,9 %) Bestände, in denen eine Bestands-sanierung durchgeführt wird. Zu Beginn des Programms waren hingegen 40 % der Bestände mit BVDV infiziert (HULT und LINDBERG 2005). In Finnland trat seit 2003 kein persistent infiziertes Rind mehr auf (RIKULA et al. 2005).

Durch periodisch wiederholte billige serologische Stichprobenuntersuchungen mittels Tankmilch, einer Jungkuhgruppe oder eines sogenannten Jungtierfensters können Bestände kostengünstig klassifiziert und überwacht werden. Die Kosten des gesamten Programms betragen in Niederösterreich 1,5 Euro pro Rind im Jahr. Sehr gute Resultate einer Kosten-Nutzenanalyse werden auch aus Norwegen berichtet (VALLE et al. 2005). Das Ziel, BVDV in Niederösterreich vollständig auszurotten, kann realistisch mit Ende des Jahres 2008 erreicht werden.

Literatur

- ALENIUS, S., LINDBERG, A., and LARSSON, B.: A national approach to the control of bovine viral diarrhoea virus. In: EDWARDS, S., PATON, D. J., and WENSVOORT, G. (Eds.): 3rd ESVV Symp. Pestivirus Infections, Lelystad, The Netherlands, 19.–20. September 1996, pp. 162–169 (1997)
- Anonym*: Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über ein Untersuchungsprogramm zur Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhöe und der Mucosal Disease bei Rindern. 303. Verordnung (2004)
- BAKER, J. C.: The clinical manifestations of Bovine Viral Diarrhea infection. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 11, 425–445 (1995)

- BARBER, D. M. L., NETTLETON, P. F., and HERRING, J. A.: Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 117, 459–464 (1985)
- BROWNLIE, J., CLARK, M. C., and HOWARD, C. J.: Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 144, 535–536 (1984)
- DEINHOFFER, M., ROSSMANITH, W., KÜHNE, S., DEINHOFFER, R., JANACEK, R., KIENESBERGER, J., and WILHELM, E.: Successful control of BVD-infection on common grassland. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 91, 72–76 (2004)
- GUNN, G. J., SAATKAMP, H. W., HUMPHRY, R. W., and SCOTT, A. W.: Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus. *Prev. Vet. Med.* 72, 149–162 (2005)
- HOUE, H.: Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 53, 320–323 (1992)
- HOUE, H., and PALFI, V.: Attempts at preventing further spread of bovine diarrhoea virus (BVDV) infection in 5 Danish dairy herds in which BVDV had been isolated. *Acta Vet. Scand.* 34, 139–144 (1993)
- HULT, L., and LINDBERG, A.: Experiences from BVDV control in Sweden. *Prev. Vet. Med.* 72, 143–148 (2005)
- KAMPA, J., STAHL, K., MORENO-LOPEZ, I., CHANLUN, A., AIUMLAMI, S., and ALENUS, S.: BVDV and BHV-1 infections in dairy herds in northern and northeastern Thailand. *Acta Vet. Scand.* 45, 181–192 (2004)
- KOLESÁROVÁ, M., FRANZ, A., JACKOVÁ, A., VILCEK, Š., MÖSTL, K., BENETKA, K., SCHÖPF, K., SCHODER, G., HOFER, J., and BAUMGARTNER, W.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus from Austrian field samples. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 91, 265–268 (2004)
- KREEFT, H. A. J. G., GREISER-WILKE, I., MOENNIG, V., and HORZINEK, C.: Attempts to characterise bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle after immunisation with a contaminated vaccine. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 97, 63–65 (1990)
- LINDBERG, A. L. E., and ALENUS, S.: Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.* 64, 197–222 (1999)
- MOERMANN, A., STRAVER, P. J., DE JONG, M. C. M., QUAK, J., BAANVINGER, T., and VAN OIRSCHOT, J. T.: A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Vet. Rec.* 132, 622–626 (1994)
- MOEN, A., SOL, J., and SIMPIMON, O.: Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. *Prev. Vet. Med.* 72, 215–219 (2005)
- NISKANEN, R.: Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.* 133, 341–344 (1993)
- NISKANEN, P., LINDBERG, A., and TRAVEN, M.: Failure to spread bovine virus diarrhoea virus infection from primarily infected calves despite concurrent infection with bovine coronavirus. *Vet. J.* 163, 251–259 (2002)
- OBRIITZHAUSER, W., OBRITZHAUSER, G., DEUTZ, A., KÖFER, J., MÖSTL, K., and SCHEIBNER, H.: Influence of cows persistently infected with Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) on BVD bulk milk diagnosis. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 89, 254–259 (2002)
- OLAFSON, P., MACCALLUM, A. D., and FOX, F. H.: An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36, 205–213 (1946)
- PALFI, V.: Studies on the decline of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves. *Acta Vet. Scand.* 34, 105–107 (1993)
- PETERHANS, E., BACHOFEN, C., JUNGI, T. W., and SCHWEITZER, M.: BVD-Virus: wie man das Immunsystem weniger Tiere überlistet und damit in der Wirtspopulation weltweit erfolgreich ist. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 91, 327–335 (2004)
- PYRA, H., BÖNI, J., and SCHÜPBACH, J.: Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1544–1548 (1994)
- RADOSTITS, O. M., and LITTLEJOHN, I. R.: New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Canad. Vet. J.* 29, 513–528 (1988)
- RIKULA, U., NUOTIO, L., AALTONEN, T., and RUOHO, O.: Bovine viral diarrhoea virus control in Finland 1998–2004. *Prev. Vet. Med.* 72, 139–142 (2005)
- ROEDER, P. L., and DREW, T. W.: Mucosal disease of cattle: A late sequel to fetal infection. *Vet. Rec.* 114, 309–313 (1984)
- ROSSMANITH, W., and DEINHOFFER, M.: Untersuchungen über das Vorkommen von BVD-Virusinfektionen in niederösterreichischen Milchviehbetrieben. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 105, 346–349 (1998)
- ROSSMANITH, W., VILCEK, Š., WENZEL, H., ROSSMANITH, E., LOITSCH, A., DURKOVIC, B., STROJNY, L., and PATON, D. J.: Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. *Vet. Microbiol.* 81, 207–218 (2001)
- ROSSMANITH, W., JANACEK, R., and WILHELM, E.: Control of BVDV – infection on common grassland – The key for successful BVDV – eradication in Lower Austria. *Prev. Vet. Med.* 72, 133–137 (2005)

- SANDVIK, T.: Progress of control and prevention programs for Bovine Viral Diarrhea virus in Europe. *Vet. Clin. North. Amer. Food Anim. Pract.* 20, 151–169 (2004)
- SCHIRRMIEIER, H., STREBELOW, G., DEPNER, K., HOFFMANN, B., and BEER, M.: Genetic and antigenetic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 85, 3647–3652 (2004)
- SHANNON, A., BROWN, L., and ELLIOT, A.: Commercial BVDV antigen – detection ELISAs: a cautionary tale! In: Abstracts of the European Symposium on Control of BVD – Virus Infection in Cattle, Lillehammer, 3–5 September 1997; pp. 50 (1997)
- VALLE, P. S., SKJERVE, E., MARTIN, S. W., LARSEN, R. B., OSTERAS, O., and NYBERG, O.: Ten years of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) control in Norway: a cost-benefit analysis. *Prev. Vet. Med.* 72, 189–207 (2005)
- VILCEK, Š., HERRING, A. J., HERRING, J. A., NETTLETON, P. F., LOWINGS, J. P., and PATON, D. J.: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 136, 309–323 (1994)
- VILCEK, Š., PATON, D. J., DURKOVIC, B., STOJNY, L., IBATA, G., MOUSSA, A., LOITSCH, A., ROSSMANITH, W., VEGA, S., SCICLUNA, T., and PALFI, V.: Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146, 99–115 (2001)
- VILCEK, Š., GREISER-WILKE, J., DURKOVIC, B., OBRITZHAUSER, W., DEUTZ, A., and KÖFER, J.: Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from southeast of Austria (Styria). *Vet. Microbiol.* 91, 285–290 (2003)
- ZIMMER, G. M., DE GOEY, L., BRINKHOF, J., and WENTINK, G.: Maternal antibodies interfere with the isolation of BVDV from peripheral blood. In: Poster Abstracts of the European Symposium on Control of BVD – Virus Infection in Cattle, Lillehammer, 3 – 5 September 1997; p. 28 (1997)

Dr. Wigbert ROSSMANITH
Abteilung Veterinärangelegenheiten
Amt der Niederösterreichischen Landesregierung
Landhausplatz 1
3109 St. Pölten
Österreich
Tel.: +43 2742 900513437
Fax: +43 2742 900512801
E-Mail: wigbert.rossmanith@noel.gv.at

Ergebnisse des Leopoldina-Förderprogramms V

Tagung und Berichte der Stipendiaten

am 17. und 18. November 2006 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Supplementum 20

Herausgegeben von Gunter S. FISCHER (Halle/Saale), Andreas CLAUSING

(Halle/Saale) und Volker ter MEULEN (Würzburg – Halle/Saale)

(2006, 170 Seiten, 102 Abbildungen, 21,80 Euro, ISBN-10: 3-8047-2358-6,

ISBN-13: 978-3-8047-2358-0)

Deutschlands älteste Akademie, die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, bemüht sich in besonderem Maße um die Förderung von Nachwuchswissenschaftlern. Seit 1992 vergibt sie zur Unterstützung der beruflichen Weiterentwicklung herausragender junger Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler ein Stipendium, ausgestattet durch Zuwendungen des Bundesministeriums für Bildung und Forschung, das es den Ausgezeichneten ermöglicht, innerhalb von zwei bis drei Jahren eigenständig ein außergewöhnlich innovatives Forschungsprojekt an ausländischen Wissenschaftseinrichtungen umzusetzen. Über 285 Forscherinnen und Forscher konnten seit Beginn des Programms gefördert werden. Der vorliegende Band zeigt die Vielfalt der Projekte und liefert Beispiele für die erreichten Ergebnisse in den letzten Jahren. Damit werden Chancen und Ansprüche des Förderprogramms für künftige Bewerber deutlich.

In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

BVD-Bekämpfung – Epidemiologische Aspekte

Walter OBRITZHAUSER (Parschlug) und Klemens FUCHS (Graz)

Mit 3 Tabellen

Zusammenfassung

Die Berechnung des BVD-Infektionsrisikos 24 Monate nach Einführung des amtlichen BVD-Bekämpfungsverfahrens in der Steiermark weist die Übertragungen von BVD-Virus durch direkten Kontakt mit Rindern BVD-verdächtiger Herden auf Heimweiden, möglicherweise aber auch indirekte Übertragungen (Übertragungen durch unhygienische Arzneimittelhandhabung, mangelhafte Reinigung und Desinfektion beim Tier- und Personenverkehr zwischen Betrieben) als wesentlichste BVD-Infektionsquellen aus. Daneben besteht auch 2 Jahre nach Inkrafttreten der BVD-Verordnung in Österreich ein erhöhtes BVD-Infektionsrisiko für Betriebe, die Rinder zukaufen. Auf die rasche Sanierung nachweislich BVDV-infizierter, verdächtiger Herden ist zu diesem Zeitpunkt des BVD-Bekämpfungsverfahrens besonderes Augenmerk zu legen. Die Bestimmungen für das Inverkehrbringen von Rindern müssen eingehalten werden, um BVD-Neuinfektionen zu verhindern.

Abstract

Twentyfour months after the implementation of the compulsory BVD-eradication program in Styria the risk of becoming a BVD-infected herd was at least at 2.7 times higher for herds located closer than 1.000 meters to a BVD-suspicious herd, than for herds located further away. The higher risk resulted from direct contact with persistently infected cattle and possibly to indirect virus contacts. Furthermore non-compliance with the program rules led to an increased infection risk in herds which purchased cattle. Virus clearance in infected herds and the compliance with the program rules for purchased cattle are the most important issues two years after the introduction of the compulsory BVD-eradication program in Styria.

1. Einleitung

Am 1. August 2004 ist die Verordnung zur Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhoe (*BVD-Verordnung* 2004, 2006) in Kraft getreten. Damit gilt nunmehr die BVD/MD des Rindes in Österreich als anzeigepflichtige Erkrankung. Die BVD ist in allen rinderhaltenden Betrieben Österreichs, ausgenommen reinen Rindermastbeständen, zu bekämpfen. Das BVD-Bekämpfungsverfahren gliedert sich in drei Phasen:

- die Feststellung des BVD-Status einer Rinderherde auf der Basis serologischer Stichproben tests;
- das Auffinden von persistent mit BVD-Virus infizierten Rindern in verdächtigen Herden mittels virologischer Tests und die Ausmerzung der Virusstreuer;
- die weitere Überwachung (Monitoring) unverdächtiger sowie sanierter Herden mittels serologischer Stichproben tests einschließlich der Überwachung des Tierverkehrs (LINDBERG und ALENIUS 1999). Das Ziel der BVD-Bekämpfung ist der Aufbau einer BVD-virusfreien (unverdächtigen) Herde bzw. Rinderpopulation. Durch wiederholte serologische

Untersuchungen muss nachgewiesen werden, dass sich in einer Herde keine persistent infizierten Rinder, somit auch keine noch nicht geborenen Virusstreuer, befinden.

Nach der Untersuchung von Tankmilchproben von allen milchliefernden Betrieben in der Steiermark werden Tierärzte mit der Entnahme von Blutproben in Betrieben mit verdächtigem Tankmilchuntersuchungsergebnis bzw. in Betrieben ohne Milchlieferung zur Erhebung des BVD-Status beauftragt. Diese Probenahmen wurden in der Steiermark nach Inkrafttreten der BVD-Verordnung zweimal (2005 und 2006) durchgeführt. Der Untersuchungsdurchgang 2006 wurde zum 31. 7. 2006 abgeschlossen.

1.1 BVD-Status

Von 15698 rinderhaltenden Betrieben in der Steiermark unterlagen 15 170 den Bestimmungen der BVD-Verordnung (Tab. 1). 14 169 (93,4%) Betriebe wurden bis zum 31. 7. 2006 als BVD-unverdächtig eingestuft. In diesen Betrieben wurde auf Grund einer unverdächtigen Tankmilchuntersuchung, eines unverdächtigen Jungtierfensters¹ oder einer unverdächtigen Jungkuhgruppe² festgestellt, dass zum Zeitpunkt der Probenahme kein Verdacht auf ein aktuelles BVD-Geschehen bestand. 411 (2,7%) Betriebe wiesen nach Abschluss des Untersuchungsdurchganges zum 31. 7. 2006 keinen eindeutigen BVD-Status auf („nicht beurteilbar“), weil entweder eine zu geringe Probenzahl für eine Beurteilung zur Verfügung stand (Kleinbetriebe) oder weil einzelne BVD-Antikörper-positive Befunde eine eindeutige Beurteilung des Jungtierfensters bzw. der Jungkuhgruppe nicht zuließen. 590 (3,9%) steirische Betriebe waren zum 31. 7. 2006 BVD-verdächtig. In diesen Beständen ist auf Grund BVD-Antikörper-positiver Befunde bei Jungrindern oder nachgewiesener Serokonversionen davon auszugehen, dass in dem von der Untersuchung erfassten Zeitraum BVD-Viruskontakt bestanden hat. Daher ist in diesen Betrieben mit der Geburt von persistent BVD-Virus-infizierten Rindern zu rechnen.

Seit dem 1. 8. 2004 konnten in der Steiermark 850 Rinder in 443 Herden als persistent BVD-Virus-infiziert nachgewiesen sowie der Schlachtung zugeführt oder getötet werden (Tab. 1).

1.2 Fragestellung

Mit dem Inkrafttreten der BVD-Verordnung (BGBl. 303/2004 novelliert durch BGBl. 282/2006) mit 1. August 2004 wurden auch wesentliche Einschränkungen beim Inverkehrbringen von Rindern wirksam. Die BVD-Verordnung definiert als Inverkehrbringen das Verbringen von Rindern in andere Bestände, auf Märkte, Versteigerungen und Ausstellungen sowie auf Weiden, sofern auf diesen der Kontakt mit Rindern anderer Herden nicht ausgeschlossen werden kann. Während das Verbringen von Rindern auf Gemeinschaftsweiden an die zentrale österreichische Rinderdatenbank gemeldet werden muss, sind Kontakte von Rindern auf Heimweiden kaum kontrollierbar. Die Anzahl derartiger Kontakte zwischen Rindern verschiedener Herden steigt mit der Anzahl pro Flächeneinheit gehaltener Rinder (Rinderdichte) und mit der Anzahl der Betriebe pro Flächeneinheit (Betriebsdichte). Wenn verdächtige Herden (also Herden, in denen

1 Jungtierfenster = Untersuchung von Blutproben von 15% der Rinder eines Bestandes, mindestens aber von fünf Jungrindern im Alter von 6 bis 24 Monaten.

2 Jungkuhgruppe = Untersuchung von Blutproben von 15% der Kühe eines Bestandes, mindestens aber von fünf Kühen. Die Proben sind vorzugsweise von den jüngsten Kühen zu ziehen.

Tab. 1 BVD-Status steirischer rinderhaltender Betriebe zum 31. 7. 2006

	N	%
Betriebe gesamt	15 698	
vom BVD-Bekämpfungsprogramm erfasste Betriebe	15 170	
BVD-unverdächtige Betriebe	14 169	93,4
BVD-verdächtige Betriebe	590	3,9
nicht beurteilbare Betriebe	411	2,7
Rinder gesamt	333 687	
Rinder in vom BVD-Bekämpfungsprogramm erfassten Betrieben	325 731	
Kühe in vom BVD-Bekämpfungsprogramm erfassten Betrieben	153 739	
persistent BVDV-infizierte Rinder (1. 8. 2004 – 31. 7. 2006)	850	
Betriebe mit persistent BVDV-infizierten Rindern (1. 8. 2004 – 31. 7. 2006)	443	

mit hoher Wahrscheinlichkeit persistent BVD-infizierte Rinder gehalten werden bzw. wurden) in räumlicher Nähe zu anderen Beständen liegen, steigt die Wahrscheinlichkeit für BVD-Infektionen durch Kontakte von Rindern verschiedener Herden, die auf hofnahen Weiden gehalten werden sowie durch indirekte Virusübertragungen (NISKANEN und LINDBERG 2003).

Bei der Umsetzung des amtlichen BVD-Bekämpfungsverfahrens konnte in der Steiermark auf Erfahrungen, die im Rahmen des freiwilligen BVD-Bekämpfungsprogramms gewonnen wurden, zurückgegriffen werden (OBRITZHAUSER et al. 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beurteilung des BVD-Infektionsrisikos in der Steiermark unter Berücksichtigung des Tierverkehrs, der Gemeinschaftsweidehaltung und geographischer Unterschiede in der Rinderhaltung zwei Jahre nach der Implementierung des amtlichen BVD-Bekämpfungsprogramms in Österreich.

2. Methode

Die Untersuchungsergebnisse aus den durchgeführten Tankmilchuntersuchungen, den BVD-Antikörper- und BVD-Antigen-ELISA-Tests, der aktuelle BVD-Status der vom Bekämpfungsprogramm erfassten Betriebe sowie Informationen betreffend den Zukauf von Rindern und das Verbringen von Rindern auf Gemeinschaftsweiden werden in einer Datenbank gespeichert, die für die Ergebnisverwaltung und für die Organisation des Bekämpfungsverfahrens entwickelt wurde. Die Datenbank enthält zusätzlich die geographischen Koordinaten aller steirischen rinderhaltenden Betriebe sowie Daten zur Anzahl der von diesen Betrieben gehaltenen Rinder (OBRITZHAUSER et al. 2002). Die Auswertung dieser Informationen erlaubt die Berechnung des BVD-Infektionsrisikos zu verschiedenen Zeitpunkten des Bekämpfungsverfahrens und für verschiedene Risikofaktoren in der steirischen Rinderpopulation.

2.1 BVD-Status

Jedem vom amtlichen BVD-Bekämpfungsverfahren erfassten Betrieb in der Steiermark wurde ein BVD-Status zum Zeitpunkt 31. 7. 2006 zugeordnet:

- BVD-unverdächtige Betriebe: Betriebe, für die bei der Untersuchung der Herdensammel-milch oder bei der serologischen Stichprobenuntersuchung von Jungrindern im Rahmen der BVD-Untersuchungskampagne 2006 ein unverdächtiges Ergebnis ermittelt wurde und in denen sonstige BVD-Untersuchungsergebnisse keinen Verdacht auf das Bestehen eines aktuellen BVD-Geschehens erkennen lassen.
- Betriebe mit nicht beurteilbarem Status: Betriebe, in denen einzelne serologisch positive Untersuchungsergebnisse bei der Stichprobenuntersuchung von Jungrindern im Rahmen der BVD-Untersuchungskampagne 2006 die Beurteilung als BVD-unverdächtiger Bestand ausschließen; die endgültige Klärung, ob ein Verdacht auf ein aktuelles BVD-Geschehen vorliegt, ist zum Zeitpunkt 31. 7. 2006 noch nicht erfolgt.
- BVD-verdächtige Betriebe: Betriebe, in denen BVD-Untersuchungsergebnisse oder der Nachweis eines persistent BVDV-infizierten Rindes den Verdacht auf das Bestehen eines aktuellen BVD-Geschehens bestätigen.

2.2 Risikofaktoren

Für jeden vom amtlichen BVD-Bekämpfungsverfahren erfassten Betrieb in der Steiermark wurde ausgewertet, ob folgende Risikofaktoren vorgelegen haben:

- Tierverkehr (Zukauf von Rindern):
 - (a.) Zukauf im Zeitraum A: Betriebe, die im Zeitraum vom 1. 8. 2004 bis zum 31. 7. 2006 Rinder zugekauft haben;
 - (b.) Zukauf im Zeitraum B: Betriebe, die im Zeitraum vom 1. 8. 2005 bis zum 31. 7. 2006 Rinder zugekauft haben;
 - (c.) Anzahl Zukäufe ≥ 3 : Betriebe, die im Zeitraum vom 1. 8. 2005 bis zum 31. 7. 2006 drei und mehr Rinder zugekauft haben.
 - (d.) Zukauf weiblicher Rinder: Betriebe, die im Zeitraum vom 1. 8. 2005 bis zum 31. 7. 2006 weibliche Rinder zugekauft haben.
- Verbringen von Rindern auf Gemeinschaftsweiden:
 - (a.) Gemeinschaftsweide – Weideperiode 1: Betriebe, die in der Weideperiode 2004 und/oder 2005 Rinder auf Gemeinschaftsweiden verbracht haben;
 - (b.) Gemeinschaftsweide – Weideperiode 2: Betriebe, die in der Weideperiode 2005 Rinder auf Gemeinschaftsweiden verbracht haben;
 - (c.) Anzahl Auftreiber > 4 : Betriebe, die in der Weideperiode 2005 Rinder auf Gemeinschaftsweiden verbracht haben, auf die mehr als vier Betriebe Rinder aufgetrieben haben.
- Kontakt von Rindern auf Heimweiden und sonstige Infektionswege: Zur Beurteilung, ob in Gebieten mit einer erhöhten Rinderdichte oder einer erhöhten Betriebsdichte das Risiko für BVD-Infektionen erhöht ist, wurde die Verteilung der steirischen rinderhaltenden Betriebe nach der Anzahl der im Umkreis von 1000 m um einen Betrieb gehaltenen Rinder (Rinderdichte) sowie nach der Anzahl der im Umkreis von 1000 m um einen Betrieb rinderhaltenden Betriebe (Betriebsdichte) bestimmt. Datengrundlage waren die in der BVD-Datenbank gespeicherten geographischen Koordinaten, die die Berechnung der im Umkreis jedes Betriebes gehaltenen Rinder, der im Umkreis jedes Betriebes befindlichen rinderhaltenden Betriebe und schließlich die Berechnung der Distanz jedes Betriebes zum nächstgelegenen BVD-verdächtigen Betrieb ermöglichen. Als Gebiete mit einer erhöhten Rinderdichte wurden solche mit mehr als 250 Rindern im Umkreis von 1000 m um den betreffenden Betrieb, als Gebiete mit einer erhöhten Betriebsdichte solche mit mehr als

10 Betrieben im Umkreis von 1000 m um einen Betrieb definiert (Tab. 2). 18,7% der Betriebe halten Rinder in Gebieten mit erhöhter Rinderdichte (mehr als 80 Rinder pro km²); 17,6% der Betriebe halten Rinder in Gebieten mit einer erhöhten Betriebsdichte (mehr als 3 Betriebe pro km²).

(a.) Betriebe in Gebieten mit erhöhter Rinderdichte (Rinderdichte > 250 R 1000): Betriebe, für die eine Anzahl von mehr als 250 Rindern, die im Umkreis von 1000 m vom Standort des Betriebes gehalten werden, errechnet wurde.

(b.) Betriebe in Gebieten mit erhöhter Bestandsdichte (Betriebsdichte > 10 R 1000): Betriebe, für die eine Anzahl von mehr als 10 Betrieben, die im Umkreis von 1000 m vom Standort des Betriebes Rinder halten, errechnet wurde.

(c.) Betriebe mit geringer Entfernung zu einem BVD-verdächtigen Bestand (Entfernung zu verdächtigem Bestand < 1000 m): Betriebe, für die eine Entfernung von weniger als 1000 m zum nächsten BVD-verdächtigen Bestand errechnet wurde.

Tab. 2 Geographische Kennzahlen der steirischen Rinderhaltung

	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Anzahl Rinder im Umkreis von 1000 m	153,9	126,0	123,8
Anzahl Betriebe im Umkreis von 1000 m	6,8	6,0	4,0
Distanz zum nächsten BVD-verdächtigen Betrieb (m)	2855,9	2119,1	2819,7
		N	
Anzahl Betriebe in Regionen mit mehr als 250 Rindern im Umkreis von 1000 m (Rinderdichte > 250 R 1000 m)		2854	
Anzahl Betriebe in Regionen mit mehr als 10 Betrieben im Umkreis von 1000 m (Betriebsdichte > 10 R 1000 m)		2686	
Anzahl Betriebe mit Distanz zum nächsten BVD-verdächtigen Betrieb unter 1000 m (Entfernung zu verdächtigem Bestand < 1000 m)		2825	

Zur Beurteilung des BVD-Infektionsrisikos diente die Berechnung des relativen Risikos (*Risk Ratio* – RR), des Chancenverhältnisses (*ODDS Ratio* – OR) sowie des jeweiligen Konfidenzintervalles (*Confidence Intervall* – 95% CI) für die angeführten Risikofaktoren Tierverkehr, Gemeinschaftsweide sowie Heimweide und sonstige Kontakte; die Signifikanz wurde mittels Chi-Quadrat-Test berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Zukauf von Rindern

Betriebe, die im Zeitraum vom 1. 8. 2004 bis zum 31. 7. 2006 Rinder in ihren Bestand zugekauft haben, trugen ein mindestens 1,5-mal (RR = 1,751, CI: 1,455 – 2,106; OR = 1,788,

CI: 1,477 – 2,164) größeres Risiko für eine BVD-Infektion als Betriebe, die innerhalb des genannten Zeitraumes keine Rinder zugekauft haben. Das Risiko für eine BVD-Infektion in Betrieben, die Rinder im Zeitraum vom 1. 8. 2005 bis zum 31. 7. 2006 (Zeitraum B) zugekauft haben, lag ebenfalls signifikant höher (RR = 1,651, CI: 1,404 – 1,942; OR = 1,686, CI: 1,424 – 1,995) als in Betrieben, die keine Zukäufe getätigt haben. Die Zahl im Zeitraum vom 1. 8. 2005 bis zum 31. 7. 2006 (Zeitraum B) von einem Betrieb zugekaufter Rinder hatte einen hoch signifikanten Einfluss auf das BVD-Risiko. Wurden von einem Betrieb drei oder mehr Rinder zugekauft, stieg das BVD-Infektionsrisiko um das 1,4- bis 2,2-Fache (RR = 1,743, CI: 1,418 – 2,143; OR = 1,795, CI: 1,445 – 2,229) verglichen mit Betrieben, die weniger Rinder zugekauft haben. Dagegen veränderte das Geschlecht der zugekauften Rinder das BVD-Infektionsrisiko nicht. Ein erhöhtes Infektionsrisiko durch den Zukauf potentiell mit einem PI-Kalb trächtiger, weiblicher Rinder war nicht nachweisbar (Tab. 3).

3.2 Verbringen von Rindern auf Gemeinschaftsweiden

Betriebe, die in den Weideperioden 2004 und/oder 2005 (Weideperiode 1) Rinder auf eine Gemeinschaftsweide aufgetrieben haben, trugen ein signifikant höheres Risiko für eine BVD-Infektion (RR = 1,249, CI: 1,053 – 1,482; OR = 1,261, CI: 1,055 – 1,509) als Betriebe, deren Rinder keine Gemeinschaftsweiden bestoßen. Für die Weideperiode 2005 allein (Weideperiode 2) war dagegen kein erhöhtes BVD-Infektionsrisiko mehr für Betriebe nachweisbar, die Rinder auf eine Gemeinschaftsweide aufgetrieben haben. Dies galt auch für Gemeinschaftsweiden, die von Rindern aus mehr als vier Betrieben beweidet wurden (Tab. 3).

3.3 Kontakt von Rindern auf Heimweiden und sonstige Infektionswege

Betriebe in Gebieten, in denen mehr als 80 Rinder pro km² gehalten werden (erhöhte Rinderdichte), hatten ebenso wie die in Gebieten mit mehr als drei Betrieben je km² gelegenen Betriebe (erhöhte Betriebsdichte) kein signifikant erhöhtes BVD-Infektionsrisiko. Dagegen konnte als größter, das Infektionsrisiko beeinflussender Faktor die Entfernung eines Betriebes zum nächstgelegenen BVD-verdächtigen Bestand ermittelt werden. Das BVD-Infektionsrisiko war für einen Bestand, der in einer Entfernung von weniger als 1000 m zum nächsten BVD-verdächtigen Bestand lag, mindestens 2,7-mal höher als für Betriebe, die in größerer Entfernung zu einem verdächtigen Bestand lagen (RR = 3,137, CI: 2,679 – 3,673; OR = 3,344, CI: 2,826 – 3,957) (Tab. 3).

4. Diskussion

Bereits während des freiwilligen BVD-Bekämpfungsprogramms in der Steiermark konnte das BVD-Infektionsrisiko signifikant gesenkt werden (OBRITZHAUSER et al. 2005). 30 Monate nach Beginn des freiwilligen Bekämpfungsprogramms lag das BVD-Infektionsrisiko in den 4412 teilnehmenden Betrieben bei einem Fünftel des ursprünglichen Wertes. Mit dem Inkrafttreten der BVD-Verordnung in Österreich unterliegen nunmehr 15 170 Betriebe der amtlichen BVD-Bekämpfung.

Tab. 3 Risiko für eine BVD-Infektion in Abhängigkeit von den Risikofaktoren Zukauf und Gemeinschaftsweidehaltung sowie von geographischen Risiken (RR = Relatives Risiko, RR-CI = 95% Konfidenzintervall für das Relative Risiko, OR = ODDS Ratio, OR-CI = 95% Konfidenzintervall für die ODDS Ratio)

Risiko	BVD-Status		RR	RR-CI	OR	OR-CI
	verdächtig	unverdächtig				
Zukauf im Zeitraum A	ja	8983	1,751 ^[2]	1,455 – 2,106	1,788 ^[2]	1,477 – 2,164
	nein	5186				
Zukauf im Zeitraum B	ja	6797	1,651 ^[2]	1,404 – 1,942	1,686 ^[2]	1,424 – 1,995
	nein	7372				
Anzahl Zukäufe ≥ 3	ja	3126	1,743 ^[2]	1,418 – 2,143	1,795 ^[2]	1,445 – 2,229
	nein	3671				
Zukauf weiblicher Rinder	ja	5316	1,036	0,809 – 1,326	1,037	0,800 – 1,345
	nein	1481				
Gemeinschaftsweide Weideperiode 1	ja	3680	1,249 ^[1]	1,053 – 1,482	1,261 ^[1]	1,055 – 1,509
	nein	10489				
Gemeinschaftsweide Weideperiode 2	ja	3878	0,972	0,813 – 1,162	0,971	0,806 – 1,169
	nein	10291				
Anzahl Auftreiber > 4	ja	2734	1,450	1,002 – 2,098	1,470	1,004 – 2,154
	nein	1144				
Rinderdichte > 250 R 1000	ja	2658	1,068	0,876 – 1,302	1,071	0,871 – 1,317
	nein	11511				
Betriebsdichte > 10 R 1000	ja	2495	0,951	0,773 – 1,170	0,949	0,764 – 1,178
	nein	11674				
Entfernung zu verdächtigem Bestand	ja	2642	3,137 ^[2]	2,679 – 3,673	3,344 ^[2]	2,826 – 3,957
	nein	11527				

[1] = p < 0,05; [2] = p < 0,005

4.1 Zukauf von Rindern

Die gemäß BVD-Verordnung bestehende Verpflichtung zur Untersuchung von Rindern, die in Verkehr gebracht werden sollen, wurde besonders in den ersten Monaten des amtlichen Bekämpfungsverfahrens teils aus Unkenntnis der neuen Rechtsbestimmungen, teils aber auch in deren Kenntnis nur lückenhaft eingehalten. Die Bestimmungen zum Inverkehrbringen von Rindern werden von Landwirten häufig als Vermarktungseinschränkung empfunden. Letztlich sind aber BVD-Neuinfektionen von bis dahin unverdächtigen Beständen die Folge der Nichteinhaltung der in der BVD-Verordnung vorgeschriebenen Untersuchungspflichten und Verkehrsbeschränkungen. Die für den Zeitraum der ersten beiden Jahre nach Beginn der amtlichen BVD-Bekämpfung in Österreich nach wie vor bestehenden signifikant höheren Risiken für Betriebe, die Rinder zukaufen, bestätigen, dass für die erfolgreiche Eradikation der BVD nicht nur die Kenntnis der Biologie des Virus, sondern auch die Bereitschaft der Tierbesitzer, Empfehlungen und Verpflichtungen im Rahmen der BVD-Bekämpfung strikt einzuhalten, erforderlich ist (LINDBERG und HOUE 2005). Da der Handel mit Rindern über (Zucht- und Nutz-) Rindermärkte in der Steiermark von der Veterinärbehörde lückenlos überwacht wird, kommt der Information und Kontrolle jener Landwirte und Viehhandelsunternehmen, die Rinder über andere Wege als über organisierte Märkte in Verkehr bringen, wesentliche Bedeutung im weiteren Verlaufe des BVD-Bekämpfungsprogramms zu.

4.2 Weideauftrieb

Die Haltung von trächtigen Rindern auf Gemeinschaftsweiden stellt eine weitere wesentliche Übertragungsmöglichkeit für die BVD zwischen Beständen dar. Die Untersuchung jener ca. 35 000 Rinder in der Steiermark, die auf Gemeinschaftsweiden aufgetrieben werden, hat daher eine zentrale Bedeutung in der BVD-Bekämpfung. Die Ergebnisse der Grund- bzw. Kontrolluntersuchungen wurden auch für den Weideauftrieb genutzt. Den Weideverantwortlichen von Gemeinschaftsweiden konnten Informationen, betreffend die Notwendigkeit zur Veranlassung von Einzeltieruntersuchungen, gegeben werden. Da die Meldedaten über das Verbringen von Rindern auf Gemeinschaftsweiden erst nach Ende des zweiten Quartals eines Kalenderjahres vorliegen, sind frühe amtliche Kontrollen allerdings nicht möglich. Insbesondere entziehen sich Tierzugänge auf Grund von Abkalbungen auf Gemeinschaftsweiden einer raschen amtlichen Kontrolle. Trotz nachweisbarer Lücken in der Einhaltung der verordneten Untersuchungspflichten konnte durch die gesetzten Maßnahmen eine weitere Verringerung des BVD-Infektionsrisikos erreicht werden. Während das BVD-Infektionsrisiko für einen Bestand, der Rinder auf eine Gemeinschaftsweide aufgetrieben hat, im freiwilligen BVD-Bekämpfungsverfahren in der Steiermark noch rund 3-mal so hoch als in einem Betrieb ohne Gemeinschaftsweidehaltung lag (OBRITZHAUSER et al. 2005), konnte für Betriebe, die in der Weideperiode 2005 Rinder auf eine Gemeinschaftsweide aufgetrieben haben, kein erhöhtes Infektionsrisiko mehr nachgewiesen werden. Die bereits im Zuge des freiwilligen BVD-Bekämpfungsverfahrens erzielte Verringerung des BVD-Infektionsrisikos auf Gemeinschaftsweiden lässt sich aus den Untersuchungsergebnissen aus dem Bundesland Niederösterreich ableiten. Trotz des potentiell höheren BVD-Infektionsrisikos, das für Betriebe, die Rinder auf Gemeinschaftsweiden auf-treiben, besteht, lag ein Jahr nach Beginn der amtlichen BVD-Bekämpfung der Anteil BVD-verdächtiger Betriebe in Regionen mit Gemeinschaftsweidehaltung deutlich niedriger als in Gebieten ohne Gemeinschaftsweidehaltung (ROSSMANITH et al. 2005).

4.3 Heimweide

Epidemiologische Untersuchungen in Rinderpopulationen, in denen BVD endemisch vorkommt, zeigen, dass die Größe von Rinderherden und die Betriebsdichte einen signifikanten Einfluss auf die BVD-Prävalenz haben (LINDBERG und HOUE 2005). Der direkte Kontakt von Rindern verschiedener Herden auf Heimweiden erklärt diesen Zusammenhang möglicherweise nur teilweise, bleiben doch in bis zu 50% die Infektionswege von BVD-Neuinfektionen in bislang BVD-unverdächtigen Herden ungeklärt (STAHL et al. 2005). Die Bedeutung indirekter Kontakte und Übertragungen korreliert negativ mit der Prävalenz BVD-Antikörper-positiver Rinder in den einem BVD-Eradikationsprogramm unterliegenden Herden. Unhygienische Arbeitsweisen bei der Applikation von Arzneimitteln sowie mangelhafte Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen in durch persistent BVDV-infizierte Rinder kontaminierten Stallungen können zu BVD-Neuinfektionen führen (NISKANEN und LINDBERG 2003). Die vorliegenden Zahlen bestätigen den hoch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Risiko für eine BVD-Infektion und der Entfernung zu einem BVD-verdächtigen Bestand. Auch ERSBØLL und HOUE (2004) konnten einen Zusammenhang zwischen der Entfernung zum nächsten BVD-verdächtigen Betrieb und der Anzahl BVD-verdächtiger Herden in der Nachbarschaft nachweisen. Das Risiko, ein BVD-verdächtiger Betrieb zu werden, stieg in dieser Untersuchung mit der Anzahl verdächtiger Herden in der Nachbarschaft und sank mit steigender Entfernung zum nächsten BVD-verdächtigen Betrieb. Die von ERSBØLL und HOUE (2004) nachgewiesene, positive Korrelation zwischen dem BVD-Infektionsrisiko und der Herdengröße konnte in der vorliegenden Untersuchung dagegen nicht bestätigt werden. Die dargestellten Zusammenhänge legen nahe, dass zum Zeitpunkt 24 Monate nach Beginn des amtlichen BVD-Bekämpfungsverfahrens besonderes Augenmerk auf die Sanierung der als BVD-verdächtig eingestuften Bestände zu legen ist. Direkte und möglicherweise auch indirekte Übertragungen von BVD-Virus sind durch die rasche Durchführung geforderter Untersuchungen und die strikte Einhaltung seuchenhygienischer Maßnahmen in BVD-verdächtigen und BVD-unverdächtigen Betrieben zu verhindern.

Literatur

- BVD-Verordnung*: Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über ein Untersuchungsprogramm zur Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhöe und der Mucosal Disease bei Rindern (BVD-Verordnung). Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, 303. Verordnung (2004)
- BVD-Verordnung*: Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über ein Untersuchungsprogramm zur Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhöe und der Mucosal Disease bei Rindern (BVD-Verordnung 2006). Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, 282. Verordnung (2006)
- ERSBØLL, A. K., and HOUE, H.: Spatial distribution and risk factors for spread of BVDV between cattle herds in Denmark. Second European Symposium on: BVDV Control, Porto, Portugal, October 20–22, Programme and Abstracts; pp. 76 (2004)
- LINDBERG, A. L. E., and ALENIUS, S.: Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet. Microbiol.* 64, 197–222 (1999)
- LINDBERG, A., and HOUE, H.: Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* 72, 55–73 (2005)
- NISKANEN, R., and LINDBERG, A.: Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet. J.* 165/2, 125–130 (2003)
- OBRIITZHAUSER, W., FUCHS, K., and KÖFER, J.: BVDV infection risk in the course of the voluntary BVDV eradication program in Styria/Austria. *Prev. Vet. Med.* 72, 127–132 (2005)

Walter Obritzhauser und Klemens Fuchs

- OBRITZHAUSER, W., WAGNER, P., ZINGGL, W., DEUTZ, A., and KÖFER, J.: BVD-database as an epidemiological tool in BVD-eradication program in Styria/Austria. XXII World Buiatrics Congress 2002, Hannover, Germany, Abstracts, pp. 54–55 (2002)
- ROSSMANITH, W., JANACEK, R., and WILHELM, E.: Control of BVDV-infection on common grassland – the key for successful BVDV-eradication in Lower Austria. *Prev. Vet. Med.* 72, 133–137 (2005)
- STAHL, K., KAMPA, J., BAULE, C., ISAKSSON, M., MORENO-LOPEZ, J., BELAK, S., ALENIUS, S., and LINDBERG, A.: Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Prev. Vet. Med.* 72, 103–108 (2005)

Dr. Walter OBRITZHAUER
Tierarztpraxis
Randweg 4
8605 Parschlug
Österreich
Tel.: +43 3862 33644
Fax: +43 3862 336442
E-Mail: w.obritzhauser@dairyvet.at

Dr. Klemens FUCHS
Österreichische Agentur für Gesundheit
und Ernährungssicherheit
Institut für Biostatistik
Beethovenstraße 8
8010 Graz
Österreich
Tel: +43 505 5561400
Fax: +43 505 5561409
E-Mail: klemens.fuchs@ages.at

Rückblick über die Umsetzung eines flächen- deckenden BVD-Bekämpfungsprogramms mittels Ohrgewebeprobe in der Autonomen Provinz Bozen-Südtirol

Alexander TAVELLA¹, Paolo ZAMBOTTO², Ernst STIFTER²,
Alessandro FUGATTI², Dorotea LOMBARDO¹, Michela RABINI¹,
Eva ROBATSCHER¹ und Gottfried BREM³ ML

Mit 11 Abbildungen und 14 Tabellen

Zusammenfassung

Ab dem 1. April 2005 wurden alle neugeborenen Kälber (rückwirkend bis zum Geburtsdatum 1. Dezember 2004) bis zum 31. März mittels Ohrgewebeentnahmehmethode untersucht. Die Ohrstanzproben wurden von Tiermarkierern im Rahmen der Kennzeichnung der Rinder entnommen, welche gemäß Verordnung (VO) 1760/2000/EG innerhalb von 20 Tagen nach der Geburt zu erfolgen hat.

Insgesamt wurden im Zeitraum vom 1. April 2005 bis zum 31. März 2006 bei 74 100 Kälbern eine Ohrgewebeprobe entnommen. Dabei reagierten 99,43 % der entnommenen Proben bei der Erstuntersuchung negativ auf BVD-Virus, 0,57 % der untersuchten Kälber waren positiv. Nach etwa einem Monat wurden die positiv reagierenden Tiere einer Nachuntersuchung auf BVD-Virus mittels Ohrstanzprobe unterzogen. Zusätzlich wurden ab dem 1. September 2005 bis zum 31. März 2006 die Blutproben der Kälber mittels PCR untersucht.

Von den insgesamt 420 bei der ersten Ohrstanzprobe positiv reagierenden Kälbern wurden 169 einer weiteren Probeentnahme unterzogen. Ehe diese Nachuntersuchung möglich war, sind 221 Kälber entweder verendet, geschlachtet oder nach Oberitalien in Mastbetriebe verkauft worden. Von den 169 erneut untersuchten Kälbern haben 128 in der Ohrstanzprobe positiv auf BVD-Virus reagiert. Von denselben Kälbern waren 125 bei der Blutuntersuchung BVD-Virus positiv. 41 Kälber reagierten in der Ohrstanzprobe negativ, während in der Blutuntersuchung 44 Kälber BVD-Virus negativ waren.

Abstract

From April 2005 until March 2006 all newborn calves were sampled for BVD antigen by analyzing an ear notch sample. The tissue samples derived from calf ear tagging within the first 20 days of life according to Regulation 1760/2000/CE using a sampling device. From April 2005 to March 2006 a total of 74,100 calves were tested by collecting ear notch samples. 99.43 % of the collected samples gave a negative result, about 0.57 % (420 calves) reacted positive. After approximately a month BVD virus positive calves were retested collecting an ear tissue sample again. Both samples were tested for BVD virus and antibodies. From September 2005 until March 2006 serum from retested calves was additionally analyzed by adopting a modified two step RT-PCR programme. In total 169 out of the 420 positive calves were subjected to a follow-up examination. 221 out of the 420 calves had been slaughtered, sold to other Italian Provinces or had died before it was possible to carry out retesting. 28 out of the 169 retested bovines were BVD virus positive to the second ear notch sample test, 125 out of the 169 were also found virus positive in the serum sample. 41 ear tissue samples reacted negative in the antigen capture ELISA test, whereas the serum of 44 calves yielded negative results.

1 Institut für Tierseuchenbekämpfung der Venetien, Bozen, Italien.

2 Landestierärztlicher Dienst der Autonomen Provinz Bozen, Kaiserau 59, I-39100 Bozen, Italien.

3 Institut für Tierzucht und Genetik, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1220 Wien, Österreich.

1. Einleitung

Die Autonome Provinz Bozen-Südtirol ist die nördlichste der 106 italienischen Provinzen. Geographisch und morphologisch gesehen, ist Südtirol durch ein subalpines bis ausgesprochen alpines Gelände geprägt. Diese landschaftlichen Gegebenheiten spiegeln sich auch in der Konfiguration und der relativen Größe der landwirtschaftlichen Betriebe. Es handelt sich dabei um typische Bergbauernhöfe. Die durchschnittliche Tierzahl dieser Rinder haltenden Betriebe beträgt 15 Tiere. Einige wenige größere Bauernhöfe sind vor allem in den Niederungen des Pustertals zu finden. Die Anzahl aller in Südtirol gehaltenen Rinder betrug im Jahr 2005 insgesamt 146054 Tiere. Die 8928 Rinder haltenden Betriebe sprechen dabei für die altbewährte und auch berühmte Südtiroler Rinderzucht. Geographische Lage und Umwelt beeinflussten demnach auch die Entstehung und Entwicklung typischer Südtiroler Rinderrassen wie die Pustertaler Kuh, auch Pustertaler Sprinze genannt (VALENTIN 2004).

Die Rinderzucht beschränkt sich in Südtirol vor allem auf Zweinutzungs- bzw. ausgesprochene Milchviehrassen wie Fleck- und Braunvieh bzw. Holstein Friesian (AVERDUNK et al. 2001). Grauvieh, Pinzgauer, Pustertaler Sprinzen und andere Rassen sind hingegen immer seltener anzutreffen. Den Anfang der 1950er Jahre entstandenen lokalen Züchtervereinen und der Ausdauer einzelner Züchter ist es zu verdanken, dass diese Rassen jedoch heutzutage noch auf den Weiden Südtirols anzutreffen sind (VALENTIN 2004). Eine wichtige Rolle bei der Erhaltung bestimmter Rassen spielen die verschiedenen Viehzuchtverbände, die auch eine wesentliche Rolle bei der Umsetzung des Pflichtprogramms für die BVD-Bekämpfung im Jahre 1999 spielten.

1.1 Die BVD-Bekämpfung in Südtirol

Im Jahre 1946 beschrieben OLAFSON et al. eine Form von akuter Gastroenteritis mit profusem Durchfall bei Rindern in Milchfarmen im *New York State* (USA). Sowohl Aborte bei trächtigen Kühen als auch ulcerative Läsionen im Maul- und Nasenbereich sowie im Gastrointestinaltrakt bei Jungtieren wurden festgestellt (GOENS 2002). Auffallend schien die hohe Morbiditätsrate, die Mortalität war jedoch niedrig. Differentialdiagnostisch wurden bakterielle Erkrankungen sowie Rinderpest ausgeschlossen.

Sieben Jahre später wurde erstmals durch RAMSEY und CHIVERS die Symptomatologie der *Mucosal Disease* bei Rindern verschiedenen Alters in Mastbetrieben in Iowa und den angrenzenden Staaten beschrieben. Wiederum wurden ulcerative Veränderungen im Maul- und Nasenbereich verzeichnet, verbunden jedoch mit einer hohen Mortalitätsrate. Obwohl anfänglich keine Verbindung zwischen den beiden Krankheiten vermutet wurde, stellte man später fest, dass dasselbe Virus sowohl die Bovine Virusdiarrhoe als auch die *Mucosal Disease* verursachte.

Weiterhin wurden Immunsuppression, respiratorische Symptome (FULTON et al. 2002), Thrombozytopenie, generalisierte Dermatitis und akute hämorrhagische Enteritis bei BVD-Virus-infizierten Tieren beschrieben (BECHER und THIEL 2005, ODEÒN et al. 2003, ALY et al. 2003, DOLL et al. 2002, SHAHRIAR et al. 2002, WALZ et al. 2001, CORAPI et al. 1989). BVDV ist auch als die Ursache für hohe Verluste in der Reproduktion und Störungen der Fertilität erkannt worden (FRAY et al. 2002).

Ende der 1960er, Anfang der 1970er Jahre wurde die Verwandtschaft zwischen dem BVD-Virus, dem Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und dem Virus der *Border Disease*

(BDV) beim Schaf erkannt. Alle drei Viren stammen aus der Familie der Flaviviridae und gehören dem Genus der Pestiviren an. Ein viertes Virus aus dem Genus Pestivirus – ein Giraffen assoziierter Stamm – wird angenommen (GIANGASPERO et al. 2001, GIANGASPERO and HARASAWA 2002, 2004, KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. 2006).

1.2 Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV)

Das Bovine Virusdiarrhoe-Virus gehört zur Familie der Flaviviridae und zum Genus Pestivirus, deren Erfolg auf der Tatsache einer Kombination zwischen persistenter und transientser Infektion beruht (AHN et al. 2005, PETERHANS et al. 2004). Pestiviren sind in der Lage, transplazentale Infektionen hervorzurufen. Die Folgen einer intrauterinen Infektion können von Aborten, Fruchtresorptionen und fetalen Malformationen bis zur Entstehung von persistent infizierten Tieren reichen (MÜLLER-DOBLIES et al. 2004, PRATELLI et al. 2001, McCLURKIN et al. 1984). Beim BVD-Virus handelt es sich um ein kleines behülltes Virus mit einzelsträngiger RNA mit Positivstrang-Orientierung (BAXI et al. 2006, BECHER et al. 1997). Isolate von BVD-Virus können in zwei Genotypen unterteilt werden, und zwar BVDV-1 und BVDV-2. In Europa kommt hauptsächlich der Genotyp I vor, seltener der Genotyp II. In der 5'UTR unterscheidet diese zwei Genotypen nur eine Punktmutation, und deswegen stellen sie keinen antigenen Unterschied dar. Zwei Biotypen von Pestiviren, zytopathogene und nicht zytopathogene Viren, können anhand ihrer Einwirkung auf Zellkulturen unterschieden werden (KÜMMERER et al. 2000, SCHWEIZER et al. 2006, AHN et al. 2005). Mit den zwei weiteren Mitgliedern des Genus Pestivirus – BDV und CSFV – weist das BVD-Virus eine enge antigenetische Verwandtschaft auf. Zwischen den einzelnen Mitgliedern des Genus Pestivirus treten, mit Ausnahme des CSF-Virus, Kreuzreaktionen auf. Dieses scheint nur für Schweine infektiös zu sein. Die restlichen Pestiviren können die tierspezifische bzw. wirtspezifische Barriere überschreiten und sind bei verschiedenen Tierarten aus dem Genus der *Artiodactyla* nachweisbar (BECHER et al. 1997, GIANGASPERO et al. 2001, GIANGASPERO und HARASAWA 2003, 2004) (siehe dazu Abb. 1 und 2).

Die genomische RNA des BVD-Virus besteht aus einer Sequenz von annähernd 12308 bp (WEINSTOCK 2001, BECHER et al. 1997). Diese Sequenz kann in drei Regionen eingeteilt

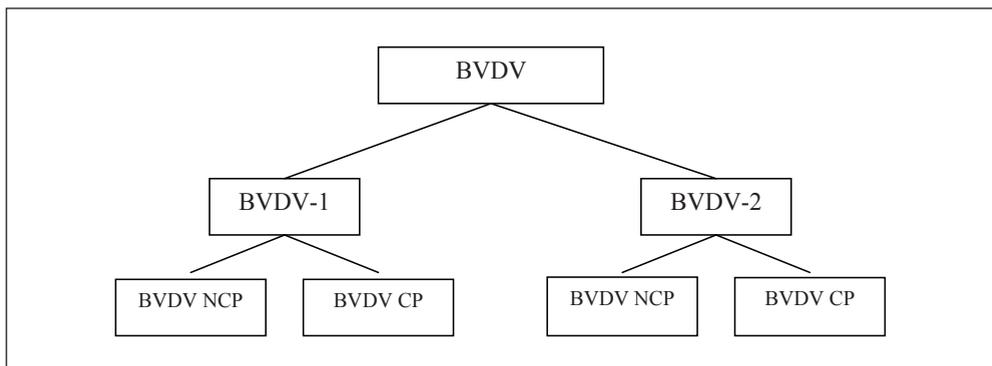


Abb. 1 Klassifikation der Pestiviren – CSFV: Virus der klassischen Schweinepest (*Classical Swine Fever Virus*); BVDV: Boviner Virusdiarrhoe-Virus (*Bovine Viral Diarrhea Virus*); BDV: *Border-Disease-Virus*

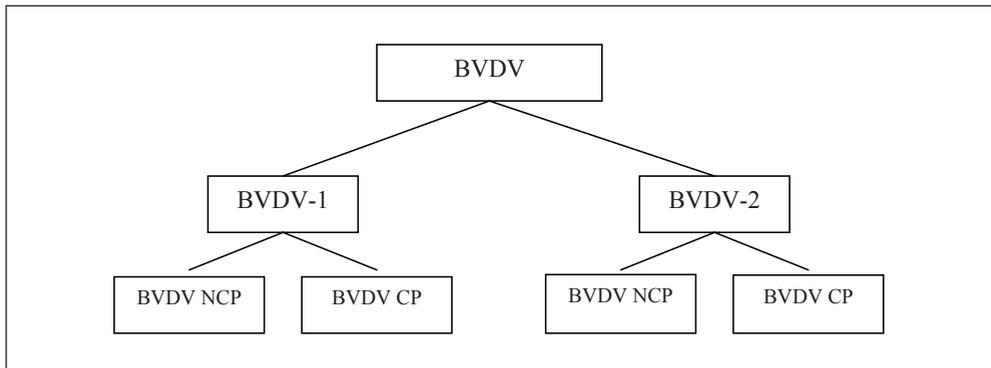


Abb. 2 Genotypen und Biotypen von BVDV – BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus; NCP: nicht cytopathogen; CP: cytopathogen.

werden: eine nicht translatierte Region 5' (UTR) mit einem IRES, ein ORF und ein 3'UTR (GIANGASPERO und HARASAWA 2004, KÜMMERER et al. 2000). Die 5'UTR ist bei allen Mitgliedern des Genus Pestivirus vorhanden und ist demnach für die Klassifizierung der Art und des Genotyps hilfreich. Die Klassifizierung des BVD-Virus in Genotyp I und Genotyp II erfolgte ebenfalls anhand der antigenetischen Variation und der Unterschiede in der 5'UTR. Die ausgeprägte genetische Variabilität in der Virusspezies bzw. im Genotyp führt zu einer minutiöseren Differenzierung: Bei BVDV-1 sind bislang elf – BVDV-1a bis BVDV-1k – und bei BVDV-2 drei Subtypen – BVDV-2a bis BVDV-2c – unterschieden worden (BECHER et al. 2005). GIANGASPERO et al. führen allerdings auch einen vierten Subtyp, BVDV-2d, an, der jedoch nur bei Schafen isoliert wurde. BVDV-2 wurde vor allem in den USA und Kanada bei Jungrindern mit den Symptomen des hämorrhagischen Syndroms, aber auch bei Schafen (vor allem BVDV-2b) isoliert. Charakteristisch für diesen Krankheitsverlauf ist die Thrombozytopenie, verbunden mit einer hohen Mortalitätsrate (GIANGASPERO et al. 2001, GIANGASPERO und HARASAWA 2003, KIRK et al. 2004). BVDV-2 kommt auch in Europa vor, jedoch wesentlich seltener als BVDV-1.

1.3 Prävalenz von BVD-Infektionen in Italien

Auf nationaler Ebene gibt es keine Daten über die Prävalenz der BVD-Infektion, da in Italien kein einheitliches BVD-Bekämpfungsprogramm existiert. Ein Pflichtprogramm zur Vorbeugung gegen BVD/MD gibt es nur für die Autonomen Provinzen Trient und Bozen (LUZZAGO et al. 2006, ZAMBOTTO 1999, FALCONE et al. 2003). Einzelne Feldstudien ergaben jedoch eine Prävalenz von 57 % bis 98 % an BVD-positiven Betrieben. Die Prävalenz an PI-Tieren beträgt laut Angaben von FALCONE et al. (2003) 0,31–1,04 %; diese Angaben beziehen sich nur auf Feldstudien. Beide Genotypen, sowohl BVDV-1 als auch BVDV-2, letzteres jedoch nur sporadisch, wurden nachgewiesen (LUZZAGO et al. 2006). BVDV-2 wurde vor allem in Beständen nachgewiesen, die mit einer kontaminierten IBR-Vakzine geimpft wurden. Symptome wie hochgradiges Fieber, Durchfall, Anorexie, Abmagerung und mucopurulenter Nasenausfluss traten innerhalb von zwei Wochen bei allen geimpften Kühen auf. Diese Tiere wurden sofort geschlachtet, um die Ausbreitung der Seuche zu unterbinden. Ähnlich wie in anderen Län-

dem verursacht BVD auch in Italien große wirtschaftliche Schäden. In Oberitalien wurden in nicht vakzinierten Milchviehbetrieben mit intensiver Rinderhaltung Fruchtbarkeitsstörungen in Zusammenhang mit BVDV-Infektionen beobachtet und beschrieben. Große wirtschaftliche Einbußen waren auch in Mastbetrieben zu verzeichnen (CIULLI et al. 2002, FALCONE et al. 2003). Bislang sind vor allem freiwillige BVD-Bekämpfungsprogramme in einigen der 106 italienischen Provinzen vorgesehen. In der Autonomen Provinz Bozen (Südtirol) läuft seit 1999 ein flächendeckendes Pflicht-BVD-Bekämpfungsprogramm (ZAMBOTTO 1999, PIFFER et al. 2003). Auch die Nachbarprovinz Trient hat im Jahr 2000 ein Pflichtprogramm zur BVD-Bekämpfung eingeführt.

1.4 Historie der BVD-Bekämpfung in Südtirol

Bereits im Jahr 1995 wurde das erste BVD-Bekämpfungsprogramm ansatzweise vom Landestierärztlichen Dienst der Autonomen Provinz Bozen ins Leben gerufen. Stichprobenartig wurden dabei 1248 Rinder serologisch auf BVD-Antikörper untersucht, 627 dieser Tiere zeigten positive Ergebnisse. Als Nachweismethode wurde bei 50 % der untersuchten Tiere der Serum-Neutralisationstest und beim Rest der Rinder der Antikörper-ELISA-Test Serelisa BVD/BD von Rhone Merieux verwendet (PIFFER et al. 2002). 1996 wurden insgesamt 2072 Rinder mittels Antikörper-ELISA-Test untersucht. Etwa 66 % dieser Tiere waren positiv, von diesen wurden lediglich 243 auf BVD-Virus untersucht mit dem Ergebnis, dass 14 davon positiv waren. Am 1. April 1997 führte der Landestierärztliche Dienst der Autonomen Provinz Bozen/Südtirol in Zusammenarbeit mit den Vertretern der Viehzuchtverbände ein freiwilliges BVD-Bekämpfungsprogramm ein (STIFTER 1997, ZAMBOTTO 1998). An diesem Programm nahmen sowohl betroffene Züchter, die in Folge dieser viralen Erkrankung bereits ökonomische Verluste verzeichnen mussten, aber auch Besitzer von verdächtigen oder BVD-freien Betrieben teil.

Auf Antrag des Direktors des Tierärztlichen Dienstes der Autonomen Provinz Bozen wurde ein BVD-Bekämpfungsprogramm auf freiwilliger Basis initiiert. Als Hauptziel wurden die Erkennung persistent infizierter Rinder und deren Ausmerzung, die Erhebung des Durchseuchungsgrades der Südtiroler Rinderpopulation und die Erfassung des Immunstatus des jeweiligen, untersuchten Betriebes angepeilt. Dabei wurden alle Rinder eines Bestandes, die zum damaligen Zeitpunkt älter als drei Monate waren, mittels Blutproben (Serum) auf Virus und Antikörper untersucht. In Betrieben mit mehr als 30–40 Tieren wurde das Jungtierfenster, bestehend aus einer relevanten Gruppe von Rindern im Alter zwischen sechs und achtzehn Monaten, serologisch auf Antikörper untersucht. In dabei positiv resultierenden Ställen wurden sämtliche Rinder des Bestandes serologisch und eventuell virologisch erfasst. Antigenpositive Tiere mussten im Rahmen desselben BVD-Bekämpfungsprogramms frühestens zwei Wochen nach der ersten Blutuntersuchung nochmals geprobt werden. Bestätigte dabei die Nachuntersuchung den ersten positiven Befund bzw. den Verdacht, wurden diese Tiere als persistent infiziert angesehen und mussten innerhalb von drei Wochen nach Erhalt der landestierärztlichen Mitteilung des Ergebnisses vom Tierzüchter der Schlachtung zugeführt werden (STIFTER 1999).

Die Verordnung sah außerdem für den Zeitraum eines Jahres nach dem Nachweis des immuntoleranten Tieres eine periodische Untersuchung der nachgeborenen und zugekauften Kälber auf BVD-Virus und -Antikörper vor. Auch in diesen Fällen galt für positive Tiere die Pflicht der Schlachtung. Eine Entschädigung für geschlachtete oder in Folge von BVD/MD

verendete Kälber war dabei vorgesehen. Im Laufe der genannten BVD-Bekämpfungskampagne wurden insgesamt 3588 Rinder auf BVD-Antikörper untersucht, 2066 Proben (57,4 %) reagierten dabei im ELISA-Test positiv. Von diesen positiven Rindern wurden 1494 Tiere auf BVD-Virus getestet, wobei 54 (3,6 %) in der Antigenuntersuchung positiv resultierten.

Der Landestierärztliche Dienst empfahl weiter die Vakzination BVD-Antikörper-freier Tiere, die während des freiwilligen BVD-Bekämpfungsprogramms erfasst worden waren. Eingesetzt wurden dabei sowohl inaktivierte als auch attenuierte, vom Landestierärztlichen Dienst genehmigte Impfstoffe. Während des darauf folgenden Jahres (1998) wurden 4426 Rinder serologisch auf BVD-Antikörper untersucht (ELISA) mit dem Ergebnis, dass 2645 (59,8 %) Tiere positiv waren. Auf BVD-Virusantigenen wurden lediglich 2204 Jungtiere getestet, 36 persistent infizierte Tiere (1,6 %) konnten erfasst werden. Von Ende Januar bis Ende April 1999 wurden anschließend nach dem gleichen Muster 1823 Rinder auf BVD-Antikörper untersucht. 853 Proben (46,8 %) zeigten positive Ergebnisse. An insgesamt 4104 Rindern wurden Virusantigenuntersuchungen durchgeführt, 91 dieser Tiere (2,2 %) waren positiv. Eine detaillierte Auflistung der Untersuchungen zwischen 1995 und 1999 findet sich in den Tabellen 1 und 2.

Tab. 1 Nachweis von BVD-Antikörpern bei den in den Jahren 1995 bis 1999 untersuchten Rindern

Jahr	Untersuchte Rinder	BVD-Antikörper positiv	%
1995	1248	627	50,3
1996	2072	1373	66,3
1997	3588	2066	57,4
1998	4426	2645	59,8
01. – 04. 1999	1832	853	46,8

Tab. 2 Nachweis von BVD-Virus bei den zwischen 1995 und 1999 untersuchten Rindern

Jahr	Untersuchte Rinder	BVD-Virus positiv	%
1995	72	2	2,9
1996	219	14	5,8
1997	1494	54	3,6
1998	2204	36	1,6
01. – 04. 1999	4198	91	2,2

Mit dem Dekret Prot. Nr. 32/2771 vom 25/10/99 führte der Landesveterinärdirektor das „Pflichtprogramm zur Vorbeugung gegen BVD/MD – Bovine Virus Diarrhoe/Mucosal Disease“ in der Provinz Bozen ein. Ausschlaggebend für diese Entscheidung war der Wille der Vereinigung der Südtiroler Tierzuchtverbände, die mehr als 60 % der Südtiroler Viehzüchter vertrat, sämtliche Rinder vor Viehschauen und Viehausstellungen einer Pflichtuntersuchung auf BVD-Virus zu unterziehen. Mit dem Entscheid, ein Pflichtprogramm für die BVD-Bekämpfung einzuführen, sollte eine Eindämmung der ökonomischen Einbußen in der Südtiroler Rinderzucht erzielt werden. Die flächendeckende BVD/MD-Sanierungskampagne erwies sich auch als unumgänglich, wenn man die BVD/MD-Pflichtsanierungsprogramme in den

angrenzenden Regionen (Tirol, Salzburg, Vorarlberg und Trient), vor allem in Anbetracht der Nutzung von nicht zur Provinz Bozen gehörenden Territorien durch einzelne Südtiroler Viehzüchter zum Zwecke der Alpung während der Sommermonate, berücksichtigte.

Im Rahmen dieses Pflichtprogramms mussten alle Rinder im Alter von drei Monaten bis drei Jahren untersucht werden. Einmal jährlich sollte bei den Tieren in dieser Altersklasse eine Einzeltierblutprobe zum Zwecke einer BVD-Virus-Untersuchung entnommen werden. Dazu wurden in erster Linie jene Blutproben verwendet, die man im Rahmen der jährlichen Prophylaxekampagne (ERL, Brucellose, IBR) entnahm. Mit dem Dekret wurde auch die Untersuchung der Rinder vor Versteigerungen bzw. Tierschauen geregelt. Das entnommene Blut wurde im Labor des Tierseuchenbekämpfungsinstituts der Venetien in Bozen (*Istituto Zooprofilattico delle Venezie*) auf BVD-Virus (ELISA) untersucht. BVD-Virus-positive Tiere sollten planmäßig nicht früher als zwei Wochen nach der ersten Entnahme nachuntersucht werden. Reagierten diese Rinder im Antigen-ELISA-Test erneut positiv, so galten sie als Virusausscheider und mussten innerhalb von drei Wochen nach Erhalt der landestierärztlichen Mitteilung über die positiven Ergebnisse vom Tierhalter der Schlachtung zugeführt werden.

Die Proben wurden im Rahmen der allgemeinen Prophylaxe ab Anfang November 1999 bis Anfang Juni 2000 erhoben. Die Verordnung sah außerdem vor, dass ausschließlich jene Rinder älter als zwei Monate an Viehversteigerungen in der Autonomen Provinz Bozen teilnehmen konnten, die negativ bei der virologischen Untersuchung (Blutprobe) in den letzten 30 Tagen vor der Veranstaltung reagiert hatten. Auf den Viehversteigerungen waren dabei nur Rinder, die aus Südtiroler Betrieben stammten, zugelassen. Der Einsatz von Vakzinen gegen BVD wurde mit dem erwähnten Dekret des Landesveterinärdirektors strikt verboten.

Die BVD-Prophylaxekampagne 2000/2001 stellte eine Weiterführung des im Jahre 1999 eingeführten Pflichtprogramms zur Vorbeugung gegen BVD/MD in der Autonomen Provinz Bozen dar. Im Gegensatz zur Sanierungskampagne im Jahr 1999 wurden nun alle Rinder eines Bestandes, die älter als zwei Monate waren, bis zum Alter von zwei Jahren mittels Blutproben auf BVD-Virusantigen untersucht. Ein weiterer Unterschied zum Vorjahr war, dass nun die positiven Tiere im Abstand von mindestens zwei Monaten von der ersten Blutprobe nachuntersucht werden sollten. Die Untersuchungen (ELISA) wurden vom Labor des Tierseuchenbekämpfungsinstitutes der Venetien in Bozen durchgeführt. Während der Prophylaxekampagne 2001/2002 galten die gleichen Vorschriften und Anweisungen wie während der BVD-Bekämpfungskampagne 2000/2001.

Im Rahmen der Prophylaxekampagne 2002/2003 wurden alle Rinder, die nach dem 1. September 2001 geboren wurden, und jene, die älter als drei Wochen waren, auf BVD-Virus untersucht. Die Nachuntersuchung positiver Rinder erfolgte nicht früher als zwei Monate nach der ersten positiven Blutuntersuchung. Auch 2003/2004 wurden alle Rinder zwischen der dritten Lebenswoche und dem 17. Lebensmonat (also Tiere, die nach dem 1. 9. 2002 geboren wurden) auf BVD-Virus untersucht. Die detaillierte und vergleichende Auflistung der Ergebnisse des BVD-Bekämpfungsprogramms zwischen 1999 und 2004 zeigen die Tabellen 3 und 4.

Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Anzahl der PI-Tiere an der Gesamtzahl der untersuchten Rinder während der jeweiligen Prophylaxekampagne.

In den Jahren 1997 bis 1999 wurden die Serumproben mit dem Test Serelisa BVD/BD von Rhone Merieux auf BVD-Antikörper untersucht, ab 2000 wurde der ELISA-Testkit von INSTITUT POURQUIER, ELISA BVD/MD/BD P80 Antibodies Screening, Version: P00645/02 eingesetzt. Die virologische Untersuchung wurde bis 2002 mit dem Checkit BVD-

Tab. 3 Anzahl der nachgewiesenen PI-Tiere von 1999 bis 2004

Alter (in Jahren)	1999/2000	2000/2001	2001/2002	2002/2003	2003/2004
0–1	269	164	76	74	64
1–2	246	73	31	16	22
2–3	167	1	7	1	2
> 3	18	15	–	2	–
Gesamt	700	253	114	93	88

Tab. 4 Prävalenz der PI-Tiere in den Jahren 1999 bis 2004

Prophylaxe	1999/2000	2000/2001	2001/2002	2002/2003	2003/2004
PI-Tiere	700	253	114	93	88
%	1,11 %	0,49 %	0,20 %	0,23 %	0,22 %

Virus II der Firma Dr. Bommeli AG (Nachweis des strukturellen Proteins E^{ms}) durchgeführt (PIFFER et al. 2002).

1.5 Prophylaxekampagne 2004/2005

Erstmals wurde bei der Untersuchung auf BVD zwischen Milch liefernden und nicht Milch liefernden Betrieben unterschieden. Nach dem schwedischen Modell wurden während dieser Kampagne jeweils Sammelmilchproben in den 5839 Milch liefernden Betrieben der Provinz Bozen/Südtirol zum Zwecke des Antikörpernachweises durch die Südtiroler Sennereigenossenschaften im Herbst 2004 entnommen. Die an das Labor des Tierseuchenbekämpfungsinstitutes in Bozen eingereichten Milchproben wurden mittels Antikörper-ELISA-Test (INSTITUT POURQUIER, ELISA BVD/MD/BD P80 Antibodies Screening) untersucht (Nachweis von NS2-3 Antikörpern). Überstieg dabei der Antikörpertiter den festgelegten Grenzwert (40 % Inhibition), so mussten alle Jungrinder des betroffenen Bestandes im Alter von drei Wochen bis 17 Monaten einer Blutuntersuchung unterzogen werden.

Bei 39 % der über die Tankmilch untersuchten Betriebe erhärteten die Ergebnisse den Verdacht der Präsenz des BVD-Virus im Bestand. In insgesamt 2277 Milch liefernden Betrieben mussten die Jungrinder im vorgeschriebenen Alter auf BVD-Virus mittels Blutproben untersucht werden, da in diesen Beständen BVD-Antikörper nachgewiesen werden konnten.

In den 3189 nicht Milch liefernden Betrieben wurden alle Rinder eines Bestandes – älter als drei Wochen bis zu einem Alter von 17 Monaten – einer Blutprobenentnahme unterzogen. Dabei wurden die untersuchten Tiere in zwei Kategorien unterteilt: Bei Rindern im Alter zwischen der dritten Lebenswoche und 17 Monaten wurde das gewonnene Serum auf BVD-Virusantigen untersucht. Auf BVD-Antikörper wurden hingegen nur Jungtiere im Alter zwischen sechs und 17 Monaten untersucht, um eine Wechselwirkung mit eventuell vorhandenen maternalen Antikörpern auszuschließen. Blutproben wurden außerdem in jenen Betrieben entnommen, die die produzierte Milch an außerhalb der Provinz Bozen/Südtirol gelegene Milchhöfe lieferten. Bei der ersten Blutprobe positiv resultierende Jungtiere wurden

im Abstand von nicht weniger als zwei Monaten nachuntersucht (dies galt sowohl für BVD-positive Jungtiere in nicht Milch liefernden Betrieben als auch für solche in Milch liefernden Betrieben). Die BVD-Prophylaxekampagne reichte von Anfang November 2004 bis Anfang Juni 2005.

2. BVD-Bekämpfungsprogramm mittels Ohrgewebeatnahmemethode

Ab dem 1. April 2005 wurde in der Provinz Bozen/Südtirol bei allen neugeborenen Kälbern, rückwirkend bis zum Geburtsdatum 1. Dezember 2004, die Methode der Ohrgewebeatnahme zum Nachweis des BVD-Virus eingeführt. Von dieser innovativen Methode erhoffte man sich möglichst genaue Ergebnisse vor allem auch in der sogenannten diagnostischen Lücke (KÜHNE et al. 2004). Die frühe Erkennung von immuntoleranten Kälbern und deren möglichst schnelle Entfernung aus dem Bestand sind von enormer Bedeutung, um die Infektionsausbreitung möglichst gering zu halten. Demnach ist eine frühzeitige Erkennung dieser persistent infizierten Kälber notwendig, da Dauervirusausscheider die Hauptursache für die Neuinfektion von Rindern mit naivem Immunsystem darstellen (FRANZ et al. 2006). Bislang waren jedoch die Virus-neutralisierenden maternalen Antikörper aus dem Kolostrum im Blut beim Nachweis von sehr jungen PI-Kälbern ein Problem (KUHNE et al. 2005, GROOMS und KEILEN 2002).

Die Ohrstanzproben wurden innerhalb der ersten 20 Lebenstage entnommen und im Labor des Tierseuchenbekämpfungsinstitutes in Bozen mittels Antigen-*capture*-ELISA-Test untersucht. Antigen-positive Kälber wurden im Abstand von etwa vier bis fünf Wochen nochmals mittels Ohrgewebeatnahmemethode und Blutproben (Antigen und Antikörper) untersucht. Ab Anfang September 2005 wurden alle positiven Tiere – soweit möglich – auch mittels PCR (Serumproben) untersucht. Bei der Nachuntersuchung wurden allgemein auch die Muttertiere, falls sie noch im betroffenen Bestand anwesend waren, mituntersucht (Ag-ELISA, Ak-ELISA, PCR). Die Nachuntersuchungen wurden durch die zuständigen Amtstierärzte etwa vier bis fünf Wochen nach der ersten Entnahme durch den Tierkennzeichner durchgeführt.

Die Ohrgewebeatnahmemethode wurde und wird auch weiterhin nicht nur während einer bestimmten, festgelegten Periode eingesetzt, sondern flächendeckend und ganzjährig durchgeführt, um eine bessere Überwachung zu gewährleisten und die Zeit des Verbleibens von Virämikern in den Beständen möglichst kurz zu halten.

2.1 Methode

Die Ohrgewebeprobe wird im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen Tierkennzeichnung entnommen. Diese wird von der Autonomen Provinz Bozen finanziert und von eigens dafür ausgebildeten Tierkennzeichnern durchgeführt (Abb. 3A). Die Ohrmarken und die Ohrstanzprobenbehälter sind mit der gleichen Matrikelnummer versehen (Abb. 3B). Somit werden Verwechslungen bei der Entnahme der Proben vermieden. Vor Ort werden die Daten des gekennzeichneten Kalbes erhoben und gleichzeitig vom Tierkennzeichner der Rinderpass ausgestellt. Alle Kennzeichner sind mit einem tragbaren Computer mit Tintenstrahldrucker ausgerüstet. Die von ihnen erhobenen Daten über das gekennzeichnete Kalb werden vor Ort elektronisch erfasst und dem Tierzuchtverband in Bozen weitergeleitet. Konform zur Verordnung 1760/2000 EG wird die Kennzeichnung innerhalb der ersten 20 Lebenstage durch-

geführt. Derzeit sind etwa 70 Tierkennzeichner für die Autonome Provinz Bozen im Dienst. Die Ohrmarken und die entsprechenden Ohrgewebebehälter werden von der Vereinigung der Tierzuchtverbände bereitgestellt. Die anfallenden Kosten für die Kennzeichnung sowie für die Entnahme und Untersuchung der Ohrknorpelproben werden von der Autonomen Provinz Bozen übernommen. Der Tierkennzeichner sorgt für die Entsendung der entnommenen Proben an die dafür eingerichteten Sammelstellen für Ohrgewebeproben in den Annahmestellen der verschiedenen Sanitätseinheiten. Mehrmals wöchentlich werden die Proben durch Landesbedienstete an das Tierseuchenbekämpfungsinstitut in Bozen abgegeben. Damit soll erreicht werden, dass positive Tiere möglichst rasch nachuntersucht werden können.



Abb. 3 (A) Vorbereitung der Probennahme. (B) Ohrmarke (gelb) und Probenbehälter (grün) tragen die gleiche Matrikelnummer

Die Laborergebnisse werden vom Landestierärztlichen Dienst erfasst und verwaltet. Ist ein Kalb bei der Untersuchung der ersten, vom Tierkennzeichner entnommenen Ohrstanzprobe BVD-Virus positiv, wird dies dem Landwirt schriftlich mitgeteilt. Der gebietszuständige Amtstierarzt wird vom Landesveterinärdirektor – ebenfalls schriftlich – aufgefordert, das positive Kalb und das dazugehörige Muttertier zu untersuchen. Die Vorschriften sehen die Entnahme einer Blutprobe und zweier Ohrgewebeproben beim betroffenen Kalb sowie eine Blutprobe von der Mutter vor. Meist erfolgt die Untersuchung innerhalb der vierten Lebenswoche. Der zeitliche Abstand von durchschnittlich vier Wochen von der ersten bis zur zweiten Probenentnahme ergibt sich daraus, dass etwa sieben Tage zwischen der Entnahme der ersten Ohrgewebeprobe und der Ankunft derselben im Labor vergehen. Eine weitere Woche verstreicht, bis die Befunde vom Laborpersonal ausgestellt werden. Anschließend benachrichtigt der Landestierärztliche Dienst die zuständigen Amtstierärzte über die Ergebnisse. Die Amtstierärzte werden schriftlich aufgefordert, die Nachuntersuchung der positiven Tiere durchzuführen. Berücksichtigt man dabei die Versandszeiten und die Zeitspanne vom Erhalt der Mitteilung bis zur Entnahme der Probe, resultieren daraus die erwähnten vier Wochen.

Tiere, die wiederum positiv reagieren, müssen innerhalb von drei Wochen nach Erhalt der Mitteilung des Ergebnisses der Schlachtung zugeführt werden. Der Beweis für die posi-

tiven Ergebnisse des ELISA-Tests auf Ohrgewebe wird zusätzlich bei der Nachuntersuchung durch Antikörper- und Antigen-ELISA aus Blutproben und der nachfolgenden PCR (Serum) gestützt. Für die Entnahme der Ohrgewebeprobe werden ein eigens dafür entworfener Probenbehälter und die entsprechende Zange (Abb. 4) verwendet. Der Vorgang muss nicht von einem Tierarzt ausgeführt bzw. überwacht werden.

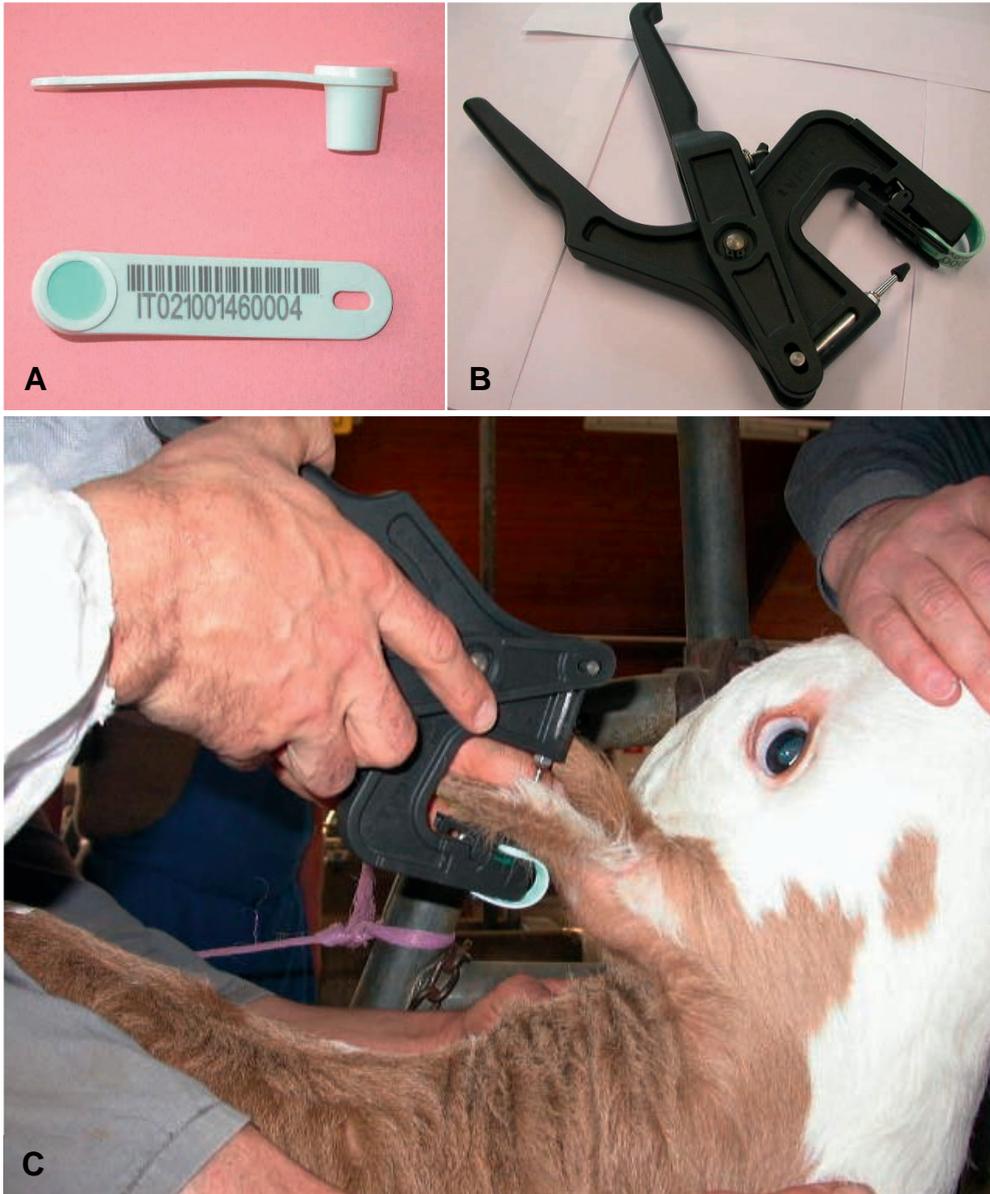


Abb. 4 (A) Ohrknorpelprobenbehälter. (B) Entnahmezange mit Stift und Ohrgewebebehälter (grün). (C) Entnahme der Ohrgewebeprobe beim neugeborenen Kalb

In Südtirol wird das TypiFix[®]-System der Firma Agrobiogen GmbH eingesetzt. Der TypiFix[®]-Probenbehälter dient zur einfachen Entnahme von Gewebeprobe bei Tieren ohne Anbringung einer Ohrmarke. Kontaminationen sind bei diesem System ausgeschlossen, da alle Komponenten, die mit der Probe in Kontakt kommen, nur einmal verwendet werden. Entnommen wird eine etwa drei Millimeter große Gewebeprobe (Abb. 5). Während des Vorganges schiebt der Stift der Zange den Stanzkopf mit dem im Durchmesser 2–3 mm großen Bioptat (Abb. 5A) in den Auffangbehälter, ohne die entnommene Probe zu kontaminieren. Die Entnahme ist sehr einfach durchzuführen. Im Labor werden die Probenbehälter (Abb. 5B) in der Annahmestelle mit Hilfe eines Barcodelesers elektronisch erfasst. Die Öffnung der Probenbehälter erfolgt mit einem teilautomatisierten Extraktor. Die Behälter müssen bei diesem Gerät einzeln (Abb. 6) eingelegt werden. Dies verlangsamt die Arbeit im Labor, vor allem wenn tausend bzw. mehr Behälter pro Woche anfallen. Bei großen Probenmengen empfiehlt sich deshalb ein Extraktor, mit dem 96 Proben in einem Durchgang bearbeitet werden können (BREM 2008).

Nach der Untersuchung auf BVD-Virus werden die Gewebeprobe im gefrorenen Zustand in Racks (Abb. 5B) gelagert und somit für weitere Untersuchungen (DNA-Datenbank,

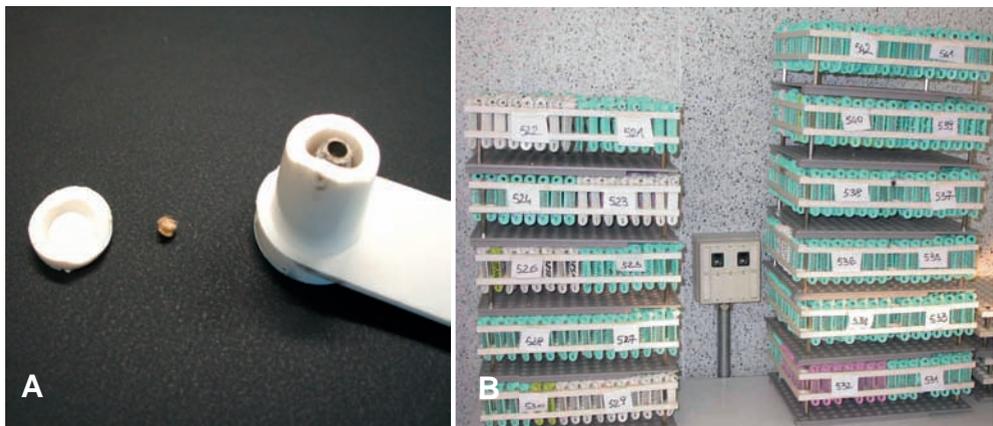


Abb. 5 (A) Ohrgewebeprobe. (B) Lagerung der Proben in Racks (geordnet und laufend beschriftet)

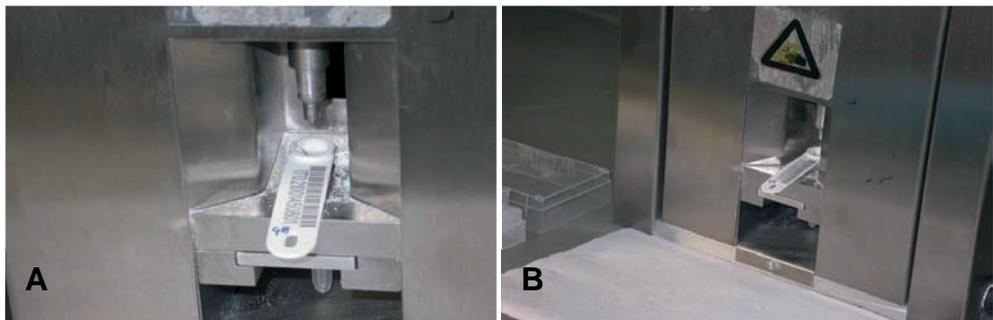


Abb. 6 (A) Öffnung der Probenbehälter (Detail 1). (B) Öffnung der Probenbehälter (Detail 2)

Genotypisierung) konserviert. Ein eigens dafür vorgesehener Raum wurde eingerichtet. Im Jahr fallen in etwa 74000 Ohrknorpelproben an, die planmäßig über sechs Jahre konserviert werden sollten. Deswegen ist die penibelste Ordnung bei der Lagerung der Proben notwendig. Mittels eines EDV-gestützten Systems können die gesuchten Gewebeproben lokalisiert und in kürzester Zeit gefunden werden.

2.2 Material

Zur Probennahme wurden Zangen (Abb. 4B) und Ohrgewebeprobebehälter (Abb. 4A) der Firma Agrobiogen GmbH, 86567 Hilgertshausen, Deutschland, für Ohrgewebeprobeentnahme (Abb. 4C) verwendet. Zum Nachweis von BVD-Virus aus der Ohrgewebeprobe (Abb. 7) wurde der HerdCheck BVDV Antigen/Serum Plus von der Firma IDEXX Laboratories verwendet. Dabei handelt es sich um ein Antigen-*capture*-Enzymimmunoassay zum Nachweis von spezifischem BVD-Virus-Antigen (Nachweis des Proteins E^{rms}). Das E^{rms} ist ein Pestivirusstrukturprotein (gp 44–48), das während der Virusreplikation extrazellulär ausgeschieden wird. Die Angaben des Herstellers zur Vorgangsweise wurden befolgt. Der Cutoff ist vom Hersteller angegeben: positiv bei >0,3, zweifelhaft 0,2–0,3, negativ bei <0,2.

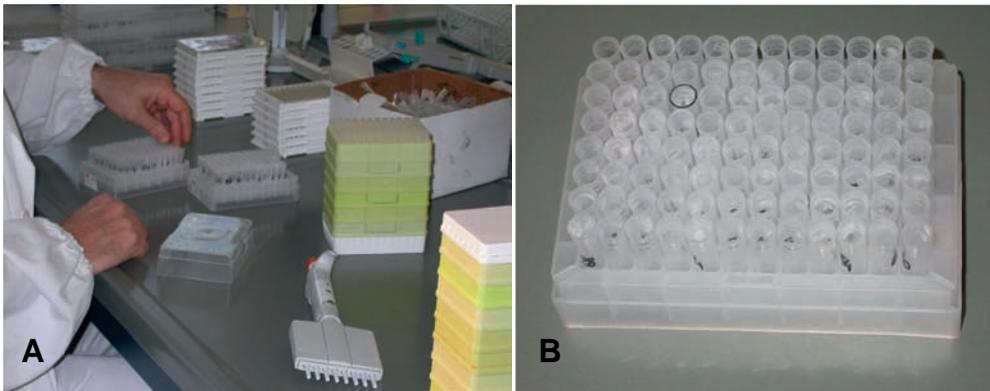


Abb. 7 (A) Vorbereitung der Lysate. (B) 96er Platten mit geordneten Proben für die Tiefgefrierkonservierung

2.2.1 Blutproben

Die Blutproben wurden bei der Nachuntersuchung sowohl vom BVD-Virus-positiven Kalb als auch vom Muttertier (falls es zu dem Zeitpunkt noch im Stall anwesend ist) aus der Vena jugularis bzw. der Vena coccygea entnommen. Die dabei gewonnenen Serumproben wurden auf BVD-Virus und -Antikörper untersucht. Die venöse Blutprobenentnahme erfolgte mittels Venoject-II-System (Terumo Europe N.V., 3001 Leuven, Belgien). Zum Nachweis von spezifischem Antigen des BVD-Virus wurde wie bei der Ohrstanzprobe der HerdCheck BVDV Antigen Test Kit/Serum Plus der Firma IDEXX Laboratories verwendet. Der Nachweis von BVD-Antikörpern in Serumproben wurde mit dem ELISA-Testkit von INSTITUT POUR-QUIER, ELISA BVD/MD/BD P80 Antibodies Screening, Version: P00645/02 durchgeführt. Die Angaben des Herstellers für die Anwendung des Tests wurden befolgt.

2.2.2 RT-PCR

Die RT-PCR wurde anhand der bei der Nachuntersuchung der positiven Kälber entnommenen Serumproben durchgeführt. Die *Revers*-Transkriptase-PCR (WEINSTOCK et al. 2001) wurde als zusätzliches diagnostisches Mittel seit Anfang September 2005 eingesetzt, um die Diagnose beim Nachweis des BVD-Virus zu erhärten. Im Zeitraum 1. September 2005 bis 31. März 2006 wurden die Seren von 124 Kälbern, die nach der Entnahme und Untersuchung der ersten Ohrstanzprobe BVD-Virus-positiv waren, für die PCR verwendet. Von den 124 durchgeführten PCR-Ansätzen waren 93 BVD-Virus-positiv, 31 negativ. Die gleichzeitig mit den gleichen Blutproben durchgeführten Antigen-*capture*-ELISA-Tests stimmten mit den Ergebnissen der PCR überein.

Die BVDV-Genomtemplates wurden durch die Extraktion der viralen RNA aus dem Serum der 124 zu untersuchenden Kälber mit dem High Pure Viral RNA Kit (Cod. 1 858 882) von Roche gewonnen. Die RT-PCR wurde entsprechend einem modifizierten *Two-step*-Protokoll nach WEINSTOCK, das im Hauptsitz des Tierseuchenbekämpfungsinstituts in Padua entwickelt wurde, durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer sind: *Forward*-Primer (103 F, MWG-Biotech) 5'-TAGCCATGCCCTTAGGAC-3'; *Reverse*-Primer (372 R, MWG-Biotech) 5'-ACTCCATGTGCCATGTACAGC-3', die eine konservierte Region im 5'UTR amplifizieren. Die verwendete Polymerase war die Taq-Polymerase (Hot Start Abigene). Das Protokoll umfasste einen Anfangszyklus bei 95 °C für 5 min, weitere 40 Zyklen (94 °C für 1 min, 56 °C für 1 min, 72 °C für 1 min) und die *Final Extension* bei 72 °C für 10 min.

3. Ergebnisse

3.1 Feldstudie im Zeitraum 1. April 2005 bis 31. März 2006

Im Halbjahr zwischen dem 1. April 2005 und dem 31. Oktober 2005 wurden 40470 Rinder mittels Ohrgewebeprobe auf BVD-Virus untersucht. Auch jene Kälber, die vor dem 1. April 2005 geboren wurden und noch in den Betrieben anwesend waren, flossen rückwirkend bis zum Geburtsdatum 1. Dezember 2004 in die Gesamtzahl der untersuchten Rinder ein. 39972 Ohrgewebeproben waren Virus-negativ, 170 Tiere waren positiv. 328 entnommene Proben waren unbrauchbar (meist leere Behälter). Diese fielen vor allem kurz nach der Einführung der Ohrgewebeentnahmemethode an. Wahrscheinlich lässt sich dies mit der anfangs noch geringen Erfahrung der Tierkennzeichner im Umgang mit der Entnahmezange erklären. Die fehlenden Proben wurden umgehend erneut entnommen.

Von den 170 positiven Tieren wurden planmäßig 88 nach etwa einem Monat wieder untersucht, 75 Kälber wurden bereits vor der Nachuntersuchung außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft, weitere 5 verendeten und 2 wurden geschlachtet, noch ehe die Entnahme einer zweiten Probe möglich war. In Italien ist kein Pflichtprogramm für die BVD-Bekämpfung vorgesehen. Deshalb ist der Handel auch mit nicht BVD-untersuchten Kälbern erlaubt. Die meisten dieser außer Provinz verkauften Kälber gelangen in Mastbetriebe in Oberitalien (siehe Tab. 5–7).

Von den 88 nochmals untersuchten Kälbern konnten anhand der Ohrknorpelprobe 70 als BVDV-positiv bestätigt werden, 18 waren negativ. In 20,4 % der Fälle konnten also die Ergebnisse der ersten positiven Ohrstanzprobe nicht bestätigt werden. Von den 70 bei der zweiten Ohrknorpelprobe positiven Kälbern waren 69 auch in den Blutproben Virus-positiv, 19 Tiere

Tab. 5 Ohrgewebeatnahmemethode, Zeitraum 1. April bis 31. Oktober 2005

Untersuchte Tiere	1. Ohrstanzprobe positiv	Nachuntersuchte Tiere	2. Ohrstanzprobe positiv	Blutprobe Antigen-positiv
40470	170 0,42 %	88	70 0,17 %	69

Die prozentuale Angabe bezieht sich jeweils auf die Gesamtzahl der untersuchten Tiere.

Tab. 6 Nachuntersuchungen, Zeitraum 1. April bis 31. Oktober 2005

Untersuchte Ohrstanzproben	aPv	Vor der Nachuntersuchung		Nachuntersuchte Tiere
		verendet	geschlachtet	
40470	75	5	2	88

aPv: außer Provinz verkauft (außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft); dabei handelt es sich um Tiere, die ausschließlich für den italienischen (nationalen) Tierhandel vorgesehen sind.

Tab. 7 Ergebnisse der BVD-Untersuchung mittels Ohrstanzprobe, Zeitraum 1. April bis 31. Oktober 2005

Untersuchte Proben	40470	
1. Ohrstanzprobe positiv	170	0,42 % (von gesamt)
2. Ohrstanzprobe positiv	70	0,17 % (von gesamt)
2. Ohrstanzprobe negativ	18	
Vor der Nachuntersuchung		
aPv	75	
Verendet	5	
Geschlachtet	2	

aPv: außer Provinz verkauft (außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft); dabei handelt es sich um Tiere, die ausschließlich für den italienischen (nationalen) Tierhandel vorgesehen sind.

zeigten nun negative Ergebnisse. Nur in einem Fall waren die Ergebnisse der Blut- und der Ohrgewebeprobe nicht übereinstimmend. Die Ergebnisse der Untersuchungsphase vom 1. April 2005 bis zum 31. Oktober 2005 sind in den Tabellen 5–7 zusammengestellt.

Im Vergleich zum ersten Halbjahr nach der Einführung der Ohrgewebeatnahmemethode werden anschließend auch die Werte der Erhebungen im Zeitraum zwischen dem 1. November 2005 und dem 31. März 2006 angeführt. In diesen Monaten sind erfahrungsgemäß die meisten Geburten bei den Rindern in der Autonomen Provinz Bozen zu verzeichnen. Demnach wurden in dieser Zeitspanne insgesamt 33 138 Kälber anhand der Ohrgewebeatnahmeprobe auf BVD-Virus untersucht. Von diesen waren 250 Ohrstanzproben Virus-positiv, 32 789 negativ; 99 Proben konnten für diagnostische Zwecke nicht gebraucht werden, da die Probenbehälter entweder leer waren oder zu wenig Gewebe enthielten. Die betreffenden Tiere wurden nachbeprob, um die flächendeckende Untersuchung aller neugeborenen Kälber zu gewährleisten. Von den 250 bei der ersten Ohrgewebeprobe positiven Kälbern wurden 81 nochmals mittels Ohrgewebe- und Blutprobenentnahme untersucht. Bei 58 Kälbern war

auch die zweite Ohrgewebeprobe BVD-Virus-positiv. Von diesen 58 Tieren waren 56 auch in der Blutprobe Virus-positiv. 23 der 81 bei der ersten Ohrgewebeprobe positiven Kälber waren bei der Nachuntersuchung mittels Ohrstanzprobe BVD-Virus-negativ, 25 waren auch in der Blutprobe Virus-negativ. In 28,4 % der Fälle konnten die Ergebnisse der ersten positiven Ohrstanzprobe nicht bestätigt werden. Bevor eine Nachuntersuchung möglich gewesen wäre, wurden 129 der 250 erstpositiven Kälber außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft, 8 verendeten und 2 wurden notgeschlachtet. Die Ergebnisse der Untersuchungsphase vom 1. November 2005 bis zum 31. März 2006 sind auch in den Tabellen 8–10 dargestellt.

Tab. 8 Ohrgewebeentnahmemethode, Zeitraum 1. November 2005 bis 31. März 2006

Untersuchte Tiere	1. Ohrstanzprobe positiv	Nachuntersuchte Tiere	2. Ohrstanzprobe positiv	Blutprobe Antigen-positiv
33 630	250 0,74 %	81	58 0,17 %	56

Die prozentuale Angabe bezieht sich jeweils auf die Gesamtzahl der untersuchten Tiere.

Tab. 9 Nachuntersuchungen, Zeitraum 1. November 2005 bis 31. März 2006

Untersuchte	Vor der Nachuntersuchung			Nachuntersuchte
Ohrstanzproben	aPv	verendet	geschlachtet	Tiere
33 630	129	8	2	81

aPv: außer Provinz verkauft (außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft); dabei handelt es sich um Tiere, die ausschließlich für den italienischen (nationalen) Tierhandel vorgesehen sind.

Tab. 10 Ergebnisse der BVD-Untersuchung mittels Ohrstanzprobe, Zeitraum 1. November 2005 bis 31. März 2006

Untersuchte Proben	33630	
1. Ohrstanzprobe positiv	250	0,74 % (von gesamt)
2. Ohrstanzprobe positiv	58	0,17 % (von gesamt)
2. Ohrstanzprobe negativ	23	
Vor der Nachuntersuchung:		
aPv	129	
Verendet	8	
Geschlachtet	2	

Sowohl die Ergebnisse der ersten Ohrstanzprobe, die innerhalb der ersten 20 Lebenstage entnommen wird, als auch der Nachuntersuchung werden angegeben. Die Nachuntersuchung findet in etwa vier bis fünf Wochen nach der ersten Ohrgewebeentnahme statt.

aPv: außer Provinz verkauft (außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft); dabei handelt es sich um Tiere, die ausschließlich für den italienischen (nationalen) Tierhandel vorgesehen sind.

Rückblickend auf die ersten 12 Monate (1. April 2005 bis zum 31. März 2006) seit der Einführung der Ohrgewebeatnahmemethode zum Zwecke der BVD-Bekämpfung in der Autonomen Provinz Bozen sind zusammenfassend insgesamt 74 100 Jungrinder untersucht worden. Davon waren 73 249 Tiere BVD-Virus-negativ. Bei 420 Rindern war die erste Ohrgewebeprobe positiv. Insgesamt 431 der von den Tierkennzeichnern entnommenen Proben konnten zu diagnostischen Zwecken nicht verwendet werden, da die Probenbehälter entweder leer waren oder zu wenig Gewebe enthielten. Zu erwähnen ist, dass die Mehrzahl dieser zu diagnostischen Zwecken nicht brauchbaren Proben im ersten Halbjahr seit Einführung der Methode angefallen waren (332 Proben), was auf die mangelnde Erfahrung der Tierkennzeichner zurückgeführt wird.

Von den 420 bei der ersten Ohrstanzprobe positiven Tieren (siehe Abb. 8) wurden 169 einer Nachuntersuchung unterzogen. Bei der Untersuchung der zweiten Ohrgewebeprobe waren 128 Kälber BVD-Virus-positiv. Die gleichzeitig entnommenen Blutproben konnten in 125 Fällen die positiven Ergebnisse bestätigen. Bei 41 der 169 bei der ersten Ohrgewebeprobe positiven und anschließend nochmals untersuchten Jungrinder war die zweite Ohrstanzprobe negativ. 24,3 % der erst positiven Ergebnisse konnten bei der Nachuntersuchung nicht bestätigt werden. In 44 Fällen waren die Blutproben BVD-Virus-negativ. Noch ehe eine Nachuntersuchung möglich war, verendeten 13 Kälber, 4 wurden notgeschlachtet und 204 außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft. 30 Kälber waren bis zum 31. März noch nicht einer Nachuntersuchung unterzogen worden (Tab. 11–13).

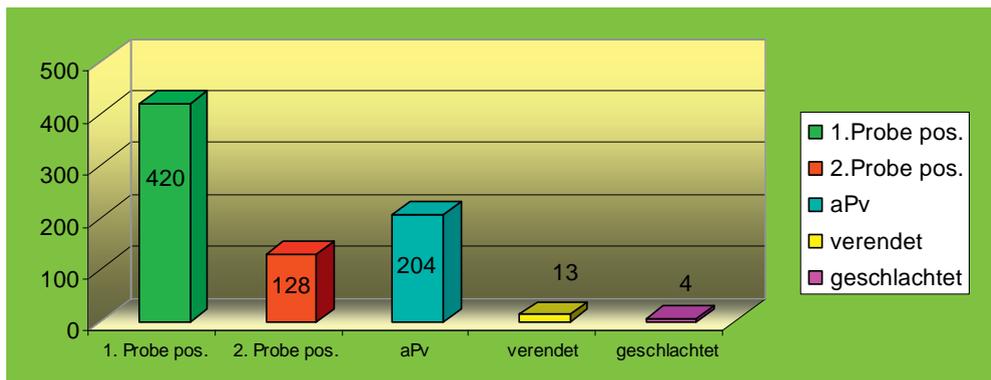


Abb. 8 Anzahl der mit der Methode der Ohrgewebeatnahme untersuchten und der nachuntersuchten Kälber. Berücksichtigt werden auch jene Kälber, die vor der Nachuntersuchung außerhalb der Autonomen Provinz Bozen (aPv) verkauft oder geschlachtet wurden oder verendeten.

Zeitgleich mit dem positiven Kalb wurde auch das jeweilige Muttertier (falls im Stall noch anwesend) auf BVD untersucht (Blutprobe). 86 Mutterkühe wurden untersucht, und bei 82 konnten Antikörper nachgewiesen werden, 4 (4,4%) Mutterkühe waren persistent infizierte Rinder, die entweder aus dem Ausland importiert worden waren (ein Tier aus den Niederlanden) oder während der vorhergehenden Prophylaxekampagnen nicht als immuntolerante Tiere erkannt wurden. Bei allen vier Kühen wurden auch Ohrgewebeproben entnommen und die PCR durchgeführt, um die Diagnose zu untermauern. Alle drei Nachweismethoden ergaben positive Ergebnisse. Die positiven Mutterkühe wurden der Schlachtung zugeführt.

Tab. 11 Ohrgewebeatnahmemethode, Zeitraum 1. April 2005 bis 31. März 2006

Untersuchte Tiere	1. Ohrstanzprobe positiv	Nachuntersuchte Tiere	2. Ohrstanzprobe positiv	Blutprobe Antigen-positiv
74 100	420 0,57 %	169	128 0,17 %	125

Die prozentuale Angabe bezieht sich jeweils auf die Gesamtzahl der untersuchten Tiere.

Tab. 12 Nachuntersuchungen, Zeitraum 1. April 2005 bis 31. März 2006

Untersuchte Ohrstanzproben	aPv	Vor der Nachuntersuchung verendet	geschlachtet	Nachuntersuchte Tiere
74 100	204	13	4	169

aPv: außer Provinz verkauft (außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft); dabei handelt es sich um Tiere, die ausschließlich für den italienischen (nationalen) Tierhandel vorgesehen sind.

Tab. 13 Ergebnisse der BVD-Untersuchung mittels Ohrstanzprobe, Zeitraum 1. April 2005 bis 31. März 2006

Untersuchte Proben	74 100	
1. Ohrstanzprobe positiv	420	0,57 in % (von gesamt)
2. Ohrstanzprobe positiv	128	0,17 in % (von gesamt)
2. Ohrstanzprobe negativ	41	
Vor der Nachuntersuchung		
aPv	204	
Verendet	13	
Geschlachtet	4	

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse nach dem ersten Jahr seit der Einführung der Ohrgewebeatnahmemethode in der Autonomen Provinz Bozen/Südtirol. Sowohl die Ergebnisse der ersten Ohrstanzprobe, die innerhalb der ersten 20 Lebenstage entnommen wird, und die der Nachuntersuchung werden angegeben. Die Nachuntersuchung findet in etwa vier bis fünf Wochen nach der ersten Ohrgewebeatnahme statt.

aPv: außer Provinz verkauft (außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft); dabei handelt es sich um Tiere, die ausschließlich für den italienischen (nationalen) Tierhandel vorgesehen sind.

Während des ersten Halbjahres seit der Einführung der Ohrgewebeatnahmemethode (vom 1. April bis zum 31. Oktober 2005) wurden 70 persistent infizierte Tiere nachgewiesen. Vom 1. November bis zum 30. April 2006 wurden 58 PI-Tiere gefunden (höhere Anzahl an Kälbergeburten in den Wintermonaten).

Von den 170 bei der ersten Ohrstanzprobe positiven Kälbern (vom 1. April bis zum 31. Oktober 2005) wurden 107 (62,9 %) planmäßig innerhalb der ersten 20 Lebenstage untersucht. 63 Tiere waren älter als drei Wochen, weil das BVD-Bekämpfungsprogramm mittels Ohrgewebeatnahmeprobe zwar am 1. April 2005 gestartet wurde, aber die Jungrinder, die ab dem 1. Dezember 2004 geboren wurden und noch in den Beständen anwesend waren, rückwirkend untersucht wurden (Abb. 9). Vergleichend zeigen die Werte zwischen dem 1. November 2006 und dem 31. März 2006, dass die große Mehrheit der untersuchten Kälber

jünger als vier Wochen war. Von 250 untersuchten Jungrindern waren 212 Kälber jünger als fünf Wochen, davon ein Großteil jünger als drei Wochen. Dies entspricht in etwa 81,2% der geprobten Tiere in dem oben genannten Zeitraum (Abb. 10).

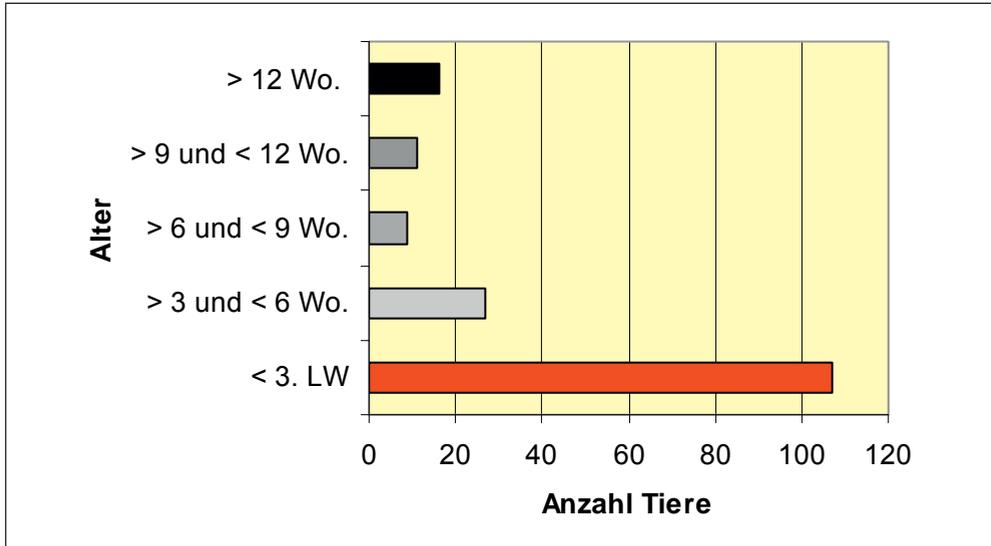


Abb. 9 Altersverteilung bei der Entnahme der ersten Ohrgewebeprobe, beginnend mit dem 1. April (rückwirkend bis zum 1. Dezember 2004) bis 31. Oktober 2005. LW: Lebenswoche; Wo.: Woche

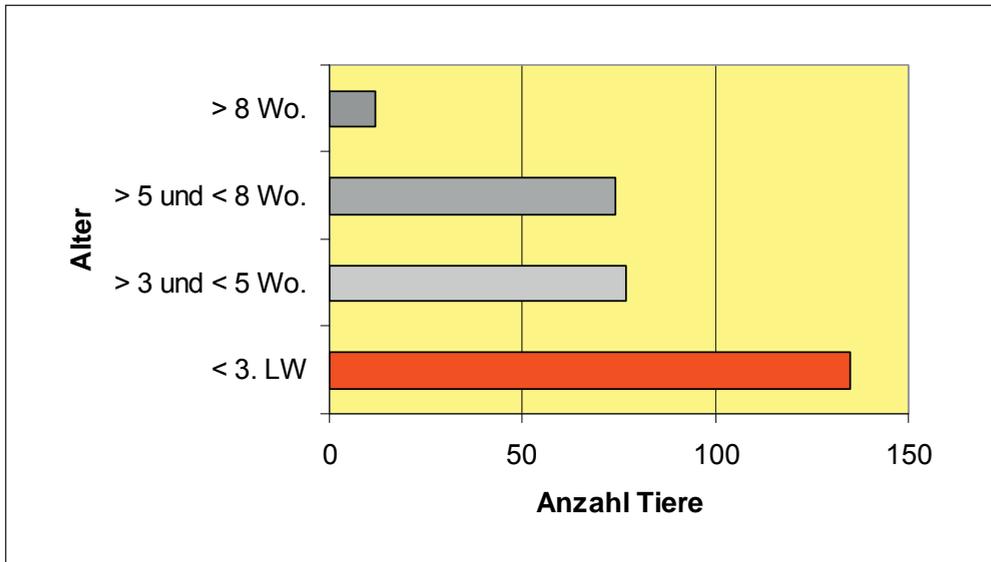


Abb. 10 Altersverteilung bei der Entnahme der ersten Ohrgewebeprobe. Man beachte, dass sich die Werte auf den Zeitraum zwischen dem 1. November 2005 und dem 31. März 2006 beziehen. LW: Lebenswoche; Wo.: Woche

3.2 Prophylaxekampagne 2005/2006

Während der allgemeinen Prophylaxekampagne 2005/2006 wurden in den Betrieben, in denen ab November 2004 bis Ende August 2005 PI-Tiere gefunden wurden (sowohl mittels Ohrgewebeatnahme oder mit Hilfe der Sammelmilch- und allgemeinen Blutproben), alle Rinder im Alter von drei Wochen bis 24 Monaten untersucht. Dabei wurden Blutproben zum Nachweis von BVD-Virus bzw. -Antikörpern entnommen. Mit dieser Kontrollmaßnahme sollten indirekt die Ergebnisse des BVD-Bekämpfungsprogramms mittels Ohrgewebeatnahmemethode des Vorjahres überprüft werden. Insgesamt 78 Betriebe, in denen – wie bereits erwähnt – immuntolerante Tiere gefunden worden waren, wurden auf BVD nachuntersucht. Gleichzeitig wurden alle neugeborenen Kälber mittels Ohrgewebeatnahmeprobe in allen Rinder haltenden Betrieben flächendeckend untersucht (Abb. 9, 10 und 11 sowie Tab. 14).

Tab. 14 Falsch negative Ergebnisse in den Jahren 1999 bis 2004

1999/2000	2000/2001	2001/2002	2002/2003	2003/2004
18	10	3	4	
(700 PI)	(253 PI)	(114 PI)	(93 PI)	(88 PI)

Die Tabelle berücksichtigt all jene Rinder, die während der jeweils vorhergehenden Bekämpfungskampagne BVD-Virus-negativ reagierten und im darauf folgenden Jahr als PI-Tiere erkannt wurden. In Klammer wurde jeweils die Gesamtzahl der nachgewiesenen PI-Tiere während der angegebenen Prophylaxekampagne verzeichnet.

Im Rahmen dieser Prophylaxekampagne konnten, wie erwähnt, auch solche Tiere untersucht werden, die im Laufe des vorhergehenden Jahres in der Ohrgewebeatprobe BVD-Virus-negativ reagiert hatten und noch in den Betrieben waren. Nur in einem Fall konnte bei einer im Juli 2005 geborenen, fünfmonatigen Färse, die planmäßig innerhalb der ersten 20 Lebenstage beprobt wurde und in der Ohrstanzprobe negativ reagiert hatte, das BVD-Virus nachgewiesen werden. Im Abstand von zwei und später drei Monaten von dieser Blutprobenentnahme wurde das Jungtier dann erneut untersucht (sowohl Blut- als auch Ohrgewebeatprobe) mit den Ergebnissen, dass keine Serokonversion stattgefunden hatte, das Tier jedoch immer noch Virus-positiv war. Somit handelte es sich dabei tatsächlich um ein PI-Tier. Sowohl die Ohrstanzprobe als auch die Blutprobe (ELISA) und die PCR ergaben das Ergebnis BVD-Virus-positiv. Es sei erwähnt, dass dieses Tier aus einem BVD-Bestand stammte und mit zwei Monaten zum zweiten Mal einer Ohrgewebeatnahme bei einer systematischen und nicht planmäßigen Untersuchung aller Rinder im Stall (Ohrgewebeatnahmemethode) unterzogen wurde. Erneut reagierte das Tier BVD-Virus-negativ (falsch negative Ohrstanzprobe). Demnach wurde das Tier weiter im Bestand gehalten.

4. Diskussion

Die weite Verbreitung des BVD-Virus in Südtirol bzw. das Risiko einer BVD-Infektion beruht in erster Linie auf dem regen Tierverkehr vor allem in den Sommermonaten. Die Haltung von Rindern aus unterschiedlichen landwirtschaftlichen Betrieben auf Gemeinschaftsweiden oder -almen stellt einen möglichen und auch relevanten Infektionsweg dar (ROSSMANITH et al. 2005). Eine nicht unterschätzbare Gefahr stellt erfahrungsgemäß auch der Zukauf von

nicht erkannten PI-Kälbern bzw. von tragenden Müttern, die während der Trächtigkeit erstmals mit dem BVD-Virus in Kontakt gekommen sind, dar. Es sei jedoch auch erwähnt, dass in vielen Fällen der Infektionsweg nicht nachvollzogen oder geklärt werden konnte (MOEN et al. 2005). Durch die Einführung einer flächendeckenden Untersuchung aller neugeborenen Kälber mittels Ohrgewebeentnahmeprobe erhoffte man sich eine raschere bzw. frühzeitigere Erkennung der persistent infizierten Tiere, um der Verschleppung dieser Tierseuche möglichst effizient entgegenzutreten (LINDBERG und HOUE 2005, WOLF 2004). Im Vergleich zum BVD-Bekämpfungsplan mittels Blutproben konnten die zeitlichen Abstände für den Nachweis von immuntoleranten Tieren zwar verringert werden, in manchen Fällen konnte aber trotzdem der Verkauf von Kälbern, bei denen die Ergebnisse der Untersuchung noch nicht fest standen, nicht vermieden werden. Einige Beispiele zeigten, dass die Kälber zwar erst nach der Entnahme der Ohrgewebeprobe, aber noch vor der Mitteilung der Laboregebnisse innerhalb der Autonomen Provinz Bozen weiterverkauft wurden. Unter diesen befanden sich auch PI-Kälber.

Als sehr wichtig zeigte sich auch die Entscheidung, die jeweiligen Muttertiere bei der Nachkontrolle der positiven Kälber zu untersuchen. Durch diese Maßnahme, gemeinsam mit der prophylaktischen Erhebung im Herbst 2005 aller Rinder im Alter zwischen 3 Wochen und 24 Monaten (mittels Einzelblutproben) in den BVD-verdächtigen Betrieben, war es möglich, vereinzelt persistent infizierte Tiere (auch ältere Rinder) zu entdecken. Dabei handelte es sich meist um Muttertiere, die bereits früher auf BVD (Serum) untersucht und anhand der Ergebnisse als BVD-Virus-negativ eingestuft worden waren.

Der Vorteil einer flächendeckenden und ganzjährigen Untersuchung der Kälber mit Hilfe der Ohrgewebeentnahmemethode war, dass alle neugeborenen Kälber in den ersten Lebenswochen untersucht werden konnten. Bis zum 1. April 2005 wurden die Tiere nur im Rahmen der jährlichen Prophylaxekampagne, die in den Wintermonaten durchgeführt wurde, auf BVD untersucht. Männliche Kälber konnten demnach kaum auf BVD untersucht werden, da sie bereits sehr jung an Mastbetriebe außerhalb der Autonomen Provinz Bozen verkauft wurden. Deshalb war es auch nicht möglich, die Muttertiere zu kontrollieren. Nun werden alle Kälber und bei den BVD-Virus-positiv resultierenden Tieren auch die dazugehörigen Mutterkühe, falls noch vorhanden, untersucht. Die Einführung der Ohrgewebeentnahmemethode hat zu höchst positiven und erfreulichen Ergebnissen in der BVD-Bekämpfung in Südtirol beigetragen, wie sich an der Anzahl der untersuchten Rinder (74 100) und dem prozentualen Anteil an PI-Tieren (0,17 %) zeigt.

Um eine nähere Beurteilung der Ohrgewebeentnahmemethode zu ermöglichen, wurden in den Betrieben, in denen mit Hilfe dieser Methode PI-Tiere diagnostiziert wurden, im Herbst/Winter 2005/2006 bei den Jungtieren im Alter zwischen drei Wochen und 24 Monaten Blutproben entnommen worden. Die gewonnenen Blutproben wurden mittels Antigen- und Antikörper-ELISA auf BVD untersucht. Zwei weibliche Jungrinder, die beide anhand der Ohrgewebeentnahmemethode im Sommer 2005 als BVD-Virus-negativ beurteilt worden waren, konnten mit Hilfe der im Rahmen dieser Aktion entnommenen Blutproben und der darauf folgenden Nachuntersuchungen als persistent infizierte Tiere nachgewiesen werden.

Eine weitere Maßnahme für die Überwachung und Eradikation der BVD in Südtirol könnte die gleichzeitige Untersuchung der Schafe und Ziegen in gemischten landwirtschaftlichen Betrieben sein.

Literatur

- AHN, B. C., WALZ, P., KENNEDY, G. A., and KAPIL, S.: Biotype, genotype and clinical presentation associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from cattle. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 3/4, 309–325 (2005)
- ALY, N. M., SHEHAB, G. G., and ABD EL-RAHIM, I. H. A.: Bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22/3, 879–892 (2003)
- AVERDUNK, G., GOTTSCHALK, A., PUTZ, M., und ROSENBERGER, E.: *Fleckvieh – Entwicklung zu einer Weltrasse*. München: BLV 2001
- BAXI, M., MCRRAE, D., BAXI, S., GREISER-WILKE, I., VILCEK, S., AMOAKO, K., and DEREGT, D.: A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 116/1-3, 37–44 (2006)
- BECHER, P., ORLICH, M., SHANNON, A. D., HORNER, G., KÖNIG, M., THIEL, H.-J.: Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. 78, 1357–1366 (1997)
- BECHER, P., und THIEL, H. J.: Impfung gegen Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease (BVD/MD): Gegenwärtiger Stand und Perspektiven. *Tierärztl. Umschau* 60, 463–468 (2005)
- BREM, G.: Identitätssicherung in der Tierseuchenbekämpfung. *Nova Acta Leopoldina*. NF Bd. 95, Nr. 350, 85–96 (2008)
- CIULLI, S., BATTILANI, M., SCAGLIARINI, A., OSTANELLO, F., et PROSPERI, S.: Identificazione e caratterizzazione di ceppi di BVDV isolati da soggetti immunotolleranti nella provincia di Bologna. *Veterinaria Italiana, Rivista di Sanità Pubblica, Anno XXXVIII – NN 45-46- Luglio-Dicembre* 65–72 (2002)
- CORAPI, E. W., FRENCH, T. W., and DUBOVI, E. J.: Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 63/9, 3937–3943 (1989)
- DOLL, K., und MOENNING, V.: BVD/MD. In: DIRKSEN, G., GRÜNDER, H. D., und STÖBER, M. (Eds.): *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. 4. Aufl. S. 572–581. Berlin: Parey 2002
- FALCONE, E., CORDIOLI, P., TARANTINO, M., MUSCILLO, M., SALA, G., and LA ROSA, G.: Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2) isolated from a contaminated vaccine. *Vet. Res. Commun.* 27, 577–589 (2003)
- FRANZ, S., MÖSTL, K., BENETKA, V., HOFER, J., and BAUMGARTNER, W.: Oesophagoscopy and detection of viral nucleic acids in oesophageal biopsies – A contribution to BVDV diagnosis. *J. Vet. Med. B* 53, 11–16 (2006)
- FRAY, M. D., MANN, G. E., BLEACH, E. C., KNIGHT, P. G., CLARKE, M. C., and CHARLESTON, B.: Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction* 123, 281–289 (2002)
- FULTON, W. R., RIDPATH, J. F., SALIKI, J. T., BRIGGS, R. E., CONFER, A. W., BURGE, L. J., PURDY, C. W., LOAN, R. W., DUFF, G. C., and PAYTON, M. E.: Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Canad. J. Vet. Res.* 66, 181–190 (2002)
- GIANGASPERO, M., HARASAWA, R., ZECONI, A., and LUZZAGO, C.: Genotypic characteristics of bovine viral diarrhoea virus 2 strains isolated in northern Italy. *J. Vet. Med. Sci.* 63/9, 1045–1049 (2001)
- GIANGASPERO, M., and HARASAWA, R.: Eterogenità di pestivirus ovini. *Veterinaria Italiana, Rivista di Sanità Pubblica, Anno XXXVIII – NN. 45-46- Luglio/Dicembre* 59–64 (2002)
- GIANGASPERO, M., and HARASAWA, R.: Genetic variety of bovine viral diarrhoea virus 2 strains isolated from sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 66/3, 323–326 (2003)
- GIANGASPERO, M., and HARASAWA, R.: Caratterizzazione dei genotipi di ceppi del virus della diarrea virale bovina 2 mediante sostituzioni nucleotidiche palindromiche nella regione genomica non tradotta 5'. *Veterinaria Italiana, Rivista di Sanità Pubblica. Vol. 40/2 Aprile/Giugno* 22–38 (2004)
- GOENS, S. D.: The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Canad. Vet. J.* 43, 946–954 (2002)
- GROOMS, D. L., and KEILEN, E. D.: Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* July 2002, 898–900 (2002)
- KIRK, J. H., MOELLER, R., and MOORE, D.: *The Nature of Bovine Virus Diarrhoea in cattle*. School of Veterinary Medicine, Veterinary Medicine Extension, University of California Davis 2004
- KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., LOITSCH, A., KOHLER, H., SCHLEINER, A., SCHIEFER, P., MOESTL, K., GOLJA, F., and BAUMGARTNER, W.: Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. *J. Vet. Med. B* 53, 48–50 (2006)
- KÜHNE, S., HOLMQUIST, G., BALLAGI, B., WOLF, G., HORNER, S., BREM, G., SHOBERG, R., GÖTZ, C., und SCHROEDER, C.: Untersuchung von Ohrstanzproben im modifizierten HerdCheck BVDV Antigen-ELISA – eine zuverlässige und ökonomische Methode zur Detektion von PI-Tieren. *Proceedings of the 23rd Working Group for Veterinary Infection Diagnostics Conference (AVID-Tagung)*, <http://www.dvg.net/avid/23tag>. (2004)
- KÜHNE, S., SCHROEDER, C., HOLMQUIST, G., WOLF, G., HORNER, S., BREM, G., and BALLAGI, A.: Detection of bovine viral diarrhoea virus infected cattle – testing tissue samples derived from ear tagging using an E^{ms} capture ELISA. *J. Vet. Med. B* 52, 272–277 (2005)

- KÜMMERER, B. M., TAUTZ, N., BECHER, P., THIEL, H.-J., and MEYERS, G.: The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 77, 117–128 (2000)
- LINDBERG, A., and HOUE, H.: Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med.* 72, 55–73 (2005)
- LUZZAGO, C., FRIGERIO, M., LIANDRIS, E., CESARIS, L., CABRINI, L., PICCININI, R., and ZECONI, A.: Piano di controllo volontario delle infezioni da BVD nelle province di Lecco e di Como: risultati del triennio 2002–2004. *L'Osservatorio, rivista bimestrale d'informazione scientifica*, Anno 9 – n.1, pp. 4–8 (2006)
- MCCURKIN, A. W., LITTLEDIKE, E. T., CUTLIP, R. C., FRANK, G. H., CORIA, M. F., and BOLIN, S. R.: Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Canad. J. Comp. Med.* 48, 156–161 (1984)
- MOEN, A., SOL, J., and SAMPIMON, O.: Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. *Prev. Vet. Med.* 72, 93–98 (2005)
- MÜLLER-DOBLIES, D., ARQUINT, A., SCHALLER, P., HEEGAARD, P. M. H., HILBE, M., ALBINI, S., ABRIL, C., TOBLER, K., EHRENSPERGER, F., PETERHANS, E., ACKERMANN, M., and METZLER, A.: Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11/2, March 2004, 302–312 (2004)
- ODEÓN, A. C., RISATTI, G., KAISER, G., LEUNDA, M. R., ODRIÓZOLA, E., CAMPERO, C. M., and DONIS, R. O.: Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet. Microbiol.* 96, 133–144 (2003)
- OLAFSON, P., MCCALLUM, A., and FOX, F.: An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.* 36, 205–213 (1946)
- PETERHANS, E., BACHOFEN, C., JUNGI, T. W., and SCHWEIZER, M.: BVD-Virus: wie man das Immunsystem weniger Tiere überlistet und damit in der Wirtspopulation weltweit erfolgreich ist. *Vet. Med. Austria/Wien. Tierärztl. Mschr.* 91, 327–335 (2004)
- PIFFER, C., RABINI, M., et ZAMBOTTO, P.: Diarrea virale bovina – malattia delle mucose: piano di controllo nella provincia autonoma di Bolzano (1997–2002). *Praxis Vet.* XXIV/2, 2–9 (2003)
- PRATELLI, A., MARSILIO, F., CIRONE, F., SASANELLI, M., CAMERO, M., SABINI, V., BUONAVOGLIA, C.: Indagini virologiche su una bovina con malattia delle mucose. *Praxis Vet.* XXIII/1, 6–9 (2001)
- RAMSEY, F. K., and CHIVERS, W. H.: Pathology of a mucosal disease of cattle. *J. Amer. Vet. Med. A* May 1, 381–383 (1953)
- ROSSMANITH, W., JANACEK, R., and WILHELM, E.: Control of BVDV-infection on common grassland – The key for successful BVDV-eradication in Lower Austria. *Prev. Vet. Med.* 72, 133–137 (2005)
- SCHWEIZER, M., MÄTZENER, P., PFAFFEN, G., STADLER, H., and PETERHANS, E.: “Self” and “Nonself” manipulation of interferon defense during persistent infection: Bovine viral diarrhoea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J. Virol.* 80/14, July 2006, 6926–6935 (2006)
- SHAHRIAR, F. M., CLARK, E. C. G., JANZEN, E., WEST, K., and WOBESER, G.: Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Canad. Vet. J.* 43, 863–868 (2002)
- STIFTER, E.: Rundschreiben Nr. 14 des Landesveterinärdirektors vom 24. 4. 1997. Autonome Provinz Bozen, Landestierärztlicher Dienst 1997
- STIFTER, E.: Das freiwillige BVD-Sanierungsprogramm Südtirols im Vergleich zu internationalen BVD-Kontrollprogrammen. Diplomarbeit, Spezialisierungsschule für Rinderkrankheiten, Veterinärmedizinische Universität Parma (nicht publiziert) 1999
- VALENTIN, H.: Pustertaler, eine bodenständige Rinderrasse, una razza bovina autoctona, frijes fosces, frijes cöcenes. Südtiroler Fleckviehzuchtverband Gen. m. b. H. (Hrsg.). Brixen: Athesia Druck 2004
- WALZ, H. W., BELL, G. T., GROOMS, D. L., KAISER, L., MAES, R. K., and BAKER, J. C.: Platelet aggregation responses and virus isolation from platelets in calves experimentally infected with type I or type II bovine viral diarrhoea virus. *Canad. J. Vet. Res.* 65, 241–247 (2001)
- WEINSTOCK, D., BHUDEVI, B., and CASTRO, A. E.: Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *J. Clin. Microbiol.* 39/1, 343–346 (2001)
- WOLF, G.: Diagnostik von BVDV-PI-Kälbern in der kolostralen Phase: Quantitative Virusisolierung, Erns- und NS2/3-ELISAs, NS2/3-IFT (FACS) und RT-PCR aus Blutproben. Proceedings of the 23rd Working Group for Veterinary Infection Diagnostics Conference (AVID-Tagung), <http://www.dvg.net/avid/23tag>. (2004)

Umsetzung eines flächendeckenden BVD-Bekämpfungsprogramms

ZAMBOTTO, P.: Dekret des Landesveterinärdirektors Nr. 32/3001 vom 25. September 1998. Plan zur Vorbeugung gegen BVD/MD – Bovine Virus Diarrhoe/Mucosal Disease (1998)

ZAMBOTTO, P.: Dekret Prot. Nr. 32/2771 Pflichtprogramm zur Vorbeugung gegen BVD/MD – Bovine Virus Diarrhoe/Mucosal Disease. Autonome Provinz Bozen, Landestierärztlicher Dienst 1999

Dr. Ernst STIFTER
Landestierärztlicher Dienst
der Autonomen Provinz Bozen
Kaiserau 59
I 39100 Bozen
Italien
Tel.: +39 471 635100
Fax: +39 471 635119
E-Mail: ernst.stifter@provinz.bz.it

Threat of Infection

Microbes of High Pathogenic Potential – Strategies for Detection, Control and Eradication

Internationales Symposium

vom 25. bis 28. Juli 2004 in Würzburg

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 92, Nr. 344

Herausgegeben von Jörg HACKER (Würzburg) und Hans-Dieter KLENK (Marburg)
(2005, 244 Seiten, 33 Abbildungen, 5 Tabellen, 26,95 Euro, ISBN 3-8047-2236-9)

Infektionskrankheiten, hervorgerufen durch Erreger mit hohem pathogenem Potential stellen ein großes Problem in Entwicklungs- und Industrieländern dar. Trotz der Verfügbarkeit von Antibiotika und von Impfstoffen gegen einige dieser Mikroorganismen blieb die Mortalitätsrate in den letzten Jahren sehr hoch. Weltweit sind etwa 33 % aller Todesfälle auf Infektionskrankheiten zurückzuführen. Zwei Gründe sind verantwortlich für diese Entwicklung, zum einen ist es die dramatische Zunahme von Resistenzen gegen Chemotherapeutika, zum anderen das Fehlen von Impfstoffen, was auch auf die hohen Kosten zurückzuführen ist, die von den Entwicklungsländern nicht refinanziert werden können. Die antigenetische Variabilität und die Flexibilität von Oberflächenproteinen dieser pathogenen Mikroorganismen stellen eine weitere Schwierigkeit dar. Das Auftreten von neuen Pathogenen ist von großem öffentlichem Interesse begleitet, und neue antimikrobielle Substanzen sowie neue Vakzinierungsstrategien sind notwendig, um die heraufziehenden Mikroorganismen mit hohem pathogenem Potential wirksam bekämpfen zu können. Eine Voraussetzung, um gegen diese Infektionserreger zu kämpfen, ist es zu verstehen, wie diese Viren, Bakterien, Parasiten und Pilze das Immunsystem des Wirtes für ihre eigenen Belange nutzen und wie diese Mikroorganismen mit dem Wirt kommunizieren. Die verschiedenen Beiträge geben neue Einsichten in die Wirts-Pathogen-Interaktionen, die Evolution von Pathogenen sowie die Wirkung von Virulenzfaktoren und Toxinen. Auf der molekularen Ebene werden die Mechanismen der Genomflexibilität verschiedener Pathogene diskutiert, neue Strategien wie die RNA-Interferenz vorgestellt und Fragen der Herkunft und Übertragung von Infektionserregern sowie neue Identifizierungsstrategien behandelt. Einen weiteren Schwerpunkt bilden neue Ansätze zur Entwicklung von alternativen Präventions- und Therapiemöglichkeiten. Darüber hinaus werden auch politische und soziale Aspekte von Infektionskrankheiten in der Vergangenheit und der Gegenwart behandelt, und es wird auf Missbrauchsmöglichkeiten (Biowaffen) eingegangen. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Landesweite BVD-Sanierung durch populationsweite Beprobung in Tirol

Josef OETTL, Karl SCHÖPF, Monika MATT (Innsbruck), Michael DÜNSER (Linz), Georg WOLF (München) und Gottfried BREM ML (Wien)

Zusammenfassung

Die Bovine Virusdiarrhoe (BVD) zählt weltweit zu den wirtschaftlich bedeutendsten Infektionskrankheiten des Rindes. Der Beitrag dokumentiert zwei Aktionsuntersuchungen 2005 und 2006 rinderhaltender Betriebe in Tirol auf BVDV. Bedingt durch den starken Tierverkehr (Alpung, Handel) ist die lückenlose, flächendeckende Ohrgewebeuntersuchung aller nachgeborenen Tiere im Zuge der Kennzeichnung erforderlich. Ein Transportverbot aller PI-Tiere (außer zur Schlachtung) ist unabdingbar.

Abstract

In terms of cost, the bovine virus diarrhoea (BVD) is one of the most important infectious diseases affecting cattle throughout the world. The paper documents two campaigns, in 2005 and 2006, during which cattle on farms in Tyrol were examined for BVDV. Strong animal traffic (driving cattle to mountain pastures, cattle trade) requires that the ear tissue examination of all subsequent animals is documented as part of their identification marking. A prohibition of transport for all PI animals (except for slaughter) is an absolute necessity.

Die Bovine Virusdiarrhoe (BVD) zählt weltweit zu den wirtschaftlich bedeutendsten Infektionskrankheiten des Rindes. Seit 1999 wurde in Tirol einmal jährlich in den Monaten Februar bis April (vor der Alpung) eine flächendeckende BVD-Untersuchung in allen rinderhaltenden Betrieben Tirols durchgeführt. Seit 1. 8. 2004 ist die BVD/MD-Bekämpfung in der BVD/MD-Verordnung BGBl. II Nr. 303/2004 gesetzlich geregelt. Somit ist die BVD/MD eine anzeigepflichtige Tierseuche.

Bei der BVD-Eradikation stehen das Auffinden und die Ausmerzung dieser PI-Tiere aufgrund der Epidemiologie des BVD-Virus im Vordergrund. Eine regionale Besonderheit in Tirol stellt die Bewirtschaftung von Gemeinschaftsweiden durch die Alpung dar. Der Viehbestand in Tirol im Jahr 2005 umfasst ca. 180 000 Rinder, wovon 60 % jeden Sommer auf Gemeinschaftsweiden aufgetrieben werden und einen intensiven Kontakt zu betriebsfremden Tieren haben. Hier herrscht ein besonders enger Kontakt von Tieren aus Betrieben mit unterschiedlichem BVD-Status.

Von 1999 bis 2004 wurden im Zuge eines freiwilligen Bekämpfungsverfahrens alle nachgeborenen Kälber mit Stichtag 1. 1. des Vorjahres auf BVD-Antigen untersucht. Die Anzahl der persistent infizierten Tiere (PI) konnte von 1999 bis 2004 jährlich reduziert werden.

Die Erfahrungen bis 2004 in der BVD-Bekämpfung haben gezeigt, dass für die weitere BVD-Sanierung zwei Schwachstellen in der Bekämpfung berücksichtigt werden müssen:

In 25 % der BVD-infizierten Betriebe (PI-Betriebe oder Sanierungsbetriebe) wurden im Folgejahr bei einer einmal jährlichen flächendeckenden Untersuchung wieder PI-Tiere gebo-

ren. Daher ist für die Früherkennung von PI-Tieren eine laufende Untersuchung und strenge Überwachung der Sanierungsbetriebe erforderlich. Ein weiterer Schwachpunkt in der Bekämpfung ist die Überwachung des Tierverkehrs, da ein großer Anteil von Rindern im Sommer auf Gemeinschaftsweiden aufgetrieben wird und ein reger Kälberhandel besteht.

Zur Beseitigung der angeführten Schwachstellen und um in der BVD-Bekämpfung weiterzukommen, wurde die Bekämpfungsstrategie geändert und die Ohrstanzprobe zur BVD-Untersuchung eingeführt.

Die Ohrstanzprobe erfolgte mit der Einziehung einer weiteren Ohrmarke und diente neben der Früherkennung von PI-Tieren gleichzeitig auch als Sichtbarmachung und somit als Kennzeichnung des BVD-untersuchten Rindes. Weitere Vorteile sind neben der eindeutigen Identifizierung und Rückverfolgbarkeit der Probe, dass sich das Ohrgewebe in der BVD-Diagnostik bei jungen Kälbern besonders gut eignet und somit den Tierverkehr ermöglicht. Im Gegensatz zu Blutproben ist die Ohrgewebeuntersuchung weniger durch maternale Antikörper belastet.

Erstmalig wurde in der Aktionsuntersuchung 2005 neben der Blutuntersuchung die Ohrgewebeprobe zur BVD-Untersuchung flächendeckend eingesetzt.

Aktionsuntersuchung 2005

Von März bis April 2005 wurden in allen 10040 rinderhaltenden Betrieben in Tirol 78470 Rinder auf BVD untersucht. Dabei wurden in 70 Betrieben 84 PI-Tiere gefunden. Das entspricht 0,70 % der Betriebe bzw. 0,10 % PI-Tiere zur Anzahl der untersuchten Betriebe bzw. Tiere. Von den insgesamt 78470 BVD-untersuchten Tieren wurden 43723 serologisch auf BVD-Antikörper (Untersuchung des Jungtierfensters, JTF) und 34747 Kälber (Stichtag: nach dem 1. 9. 2004 geborene Rinder) mit der Ohrgewebeprobe auf BVD-Antigen untersucht. 43 % der durch Ohrgewebeuntersuchung gefundenen PI-Tiere waren jünger als 2 Monate. In diesem Lebensalter sind Blutuntersuchungen auf BVDV-Antigen aufgrund maternaler Antikörper in der Sensitivität stark eingeschränkt.

Gemäß der Ergebnisse der BVD-Reihenuntersuchung wurden die Betriebe als „amtlich anerkannt BVD-virusfrei“, „BVD-verdächtig“ und „Sanierungsbetriebe“ eingestuft. Ein Betrieb erhielt den Status „Amtlich anerkannt BVD-virusfrei“, wenn alle drei Tankmilchprobenergebnisse unverdächtig waren oder die serologische Untersuchung ein unverdächtiges Jungtierfenster ergab und kein BVD-Antigen-positives Tier festgestellt worden ist. BVD-verdächtig wurde der Betrieb eingestuft, wenn die Untersuchung des Jungtierfensters verdächtig beurteilt wurde und kein BVD-Antigen-positives Tier befundet wurde. Im Sanierungsbetrieb wurde zumindest ein BVD-Antigen-positives Tier festgestellt.

Von insgesamt 10040 Betrieben wurden 9058 Betriebe (90,22 %) als „Amtlich anerkannt BVD-virusfrei“, 899 Betriebe (8,95 %) als „BVD-verdächtig“ und 83 Betriebe (0,83 %) als Sanierungsbetriebe eingestuft.

Von Mai 2005 bis Februar 2006 wurden insgesamt 120 PI-Tiere festgestellt. Davon wurden in 13 amtlich anerkannt BVD-virusfreien Betrieben 17 PI-Tiere, in 14 BVD-verdächtigen Betrieben 32 PI-Tiere und in 30 Sanierungsbetrieben insgesamt 71 PI-Tiere mit der Ohrgewebeprobe erkannt und ausgemerzt.

Aktionsuntersuchung 2006

Von März bis April 2006 wurden flächendeckend in allen rinderhaltenden Betrieben Proben gezogen. Dabei wurden in 9815 Betrieben 77481 Rinder untersucht und in 29 Betrieben 32 PI-Tiere gefunden. Das entspricht 0,30% der Betriebe bzw. 0,04% PI-Tiere zur Anzahl der untersuchten Betriebe bzw. Tiere. Von den insgesamt 77481 BVD-untersuchten Tieren wurden 40967 serologisch über das Jungtierfenster und 34061 mit der Ohrgebewebeprobe auf BVD-Antigen untersucht.

Der Bekämpfungserfolg von 2005 nach 2006 ist höchst signifikant aufgrund der Reduktion gefundener PI-Tiere ($P = 0,0024\%$, CHI-Quadrat-Test). Die Auswertung der Betriebsstatus 2006 ist in Bearbeitung.

Bedingt durch den starken Tierverkehr (Alpung, Handel) ist die lückenlose, flächendeckende Ohrgebewebeuntersuchung aller nachgeborenen Tiere im Zuge der Kennzeichnung erforderlich. Ein Transportverbot aller PI-Tiere (außer zur Schlachtung) ist unabdingbar. Nur dann besteht die Hoffnung auf eine möglichst rasche Eradikation des BVD-Virus in Tirol.

Mag. Josef OETTL
Veterinärdirektion
Amt der Tiroler Landesregierung
Wilhelm-Greil-Straße 25
A-6010 Innsbruck
Österreich
Tel.: +43 512 5083243
Fax: +43 512 5083245
E-Mail: j.oettl@tirol.gv.at

350 Jahre Leopoldina – Anspruch und Wirklichkeit

Festschrift der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

1652–2002

Herausgegeben von

Benno PARTHIER (Halle/Saale) und Dietrich VON ENGELHARDT (Lübeck)

(2002, 816 Seiten, 130 Abbildungen, 8 Tabellen, 54,90 Euro, ISBN 3-928466-45-3)

Die älteste deutschsprachige Akademie prüft „Anspruch und Wirklichkeit“ ihrer Vergangenheit und lässt 350 Jahre wechsellvoller Geschichte in ihren naturwissenschaftlichen und medizinischen Rahmenbedingungen Revue passieren. Die Festschrift wendet sich an eine interessierte Öffentlichkeit, die allmählich diese besondere Akademie in der deutschen und internationalen Akademienlandschaft mit ihrer spezifischen wissenschaftlich-kulturellen Bedeutung wahrnimmt, nachdem die Wirkungen von 40 Jahren defizitärer Existenz „hinter dem eisernen Vorhang“ überwunden werden konnten. (Klappentext)

Inhalt:

Teil I: Geschichte der Leopoldina in Schwerpunkten

Teil II: Die Leopoldina im Spiegel einzelner Wissenschaftsdisziplinen

Teil III: Querschnittsthemen

Teil IV: Anhänge

Mit Beiträgen von:

Gunnar BERG (Halle/Saale), Johanna BOHLEY (Halle/Saale), Dietrich VON ENGELHARDT (Lübeck), Menso FOLKERTS (München), Bernhard FRITSCHER (München), Sybille GERSTENGARBE (Halle/Saale), Fritz HARTMANN (Hannover), Lothar JAENICKE (Köln), Ilse JAHN (Berlin), Joachim KAASCH (Halle/Saale), Michael KAASCH (Halle/Saale), Kai Torsten KANZ (Lübeck), Andreas KLEINERT (Halle/Saale), Eberhard KNOBLOCH (Berlin), Dorothea KUHN (Marbach), Irmgard MÜLLER (Bochum), Uwe MÜLLER (Schweinfurt), Gisela NICKEL (Ober-Olm), Thomas NICKOL (Halle/Saale), Benno PARTHIER (Halle/Saale), Horst REMANE (Halle/Saale), Hermann-J. RUIEPER (Halle/Saale), Klaus SANDER (Freiburg i. Br.), Thomas SCHNALKE (Berlin), Werner SCHROTH (Halle/Saale), Eugen SEIBOLD (Freiburg i. Br.), Eduard SEIDLER (Freiburg i. Br.), Richard TOELLNER (Rottenburg-Bieringen) und Gudrun WOLFSCHMIDT (Hamburg).

Druck-Zuck GmbH, Seebener Straße 4, 06114 Halle/Saale

Buchbestellung on-line: www.druck-zuck.net

V. Anhang

Zelluläre Immunität: Zytotoxizität gegen BVDV-infizierte Zellen

Ilona MOSSBRUGGER, Martin BEER¹ und Georg WOLF²

Die Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) induziert bei Rindern mit vollständig entwickeltem Immunsystem eine adaptive Immunantwort, die das Virus beseitigt. Gut bekannt ist die Bildung neutralisierender und nicht-neutralisierender Antikörper *post infectionem*. Bisher wenig untersucht sind die T-zellvermittelten Immunreaktionen, die durch eine BVDV-Infektion induziert werden und die insbesondere bei der Eliminierung nicht zytopathogener Viren eine wichtige Rolle spielen. Zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen virale Antigene, die an der Oberfläche einer infizierten Zelle präsentiert werden. Bei manchen Virusinfektionen sind sie allein in der Lage, eine Infektion unter Kontrolle zu bringen, indem sie infizierte Zellen bereits vor Abschluss der Replikation abtöten. Der Nachweis BVDV-induzierter CTLs nach einer Infektion mit einem nicht zytopathogenem BVDV-Virus gelang erstmals 1995. Eigene Untersuchungen am Rind mit rekombinantem modifiziertem Vacciniavirus Ankara (MVA) sprechen für das Vorliegen relevanter Epitope für CTLs im BVDV-Nichtstrukturprotein 3. So konnte nachgewiesen werden, dass bei vier von sechs Kälbern nach drei Immunisierungen mit rekombinantem BVDV-NS3 eine deutliche BVDV-spezifische Zytotoxizität gegenüber autologen BVDV-infizierten Hodenzellen induziert wurde. Nach der BVDV-Belastungsinfektion war die spezifische Zytotoxizität bei fünf der sechs BVDV-NS3-MVA-Impftiere höher als bei den Kontrolltieren (N = 4).

Bei Immunisierungsversuchen mit nicht replizierenden BVDV-Antigenen wurde deutlich, dass eine humorale Immunantwort alleine auch bei maximalen Titern neutralisierender Antikörper nur eingeschränkt gegen eine BVDV-Infektion und ihre Folgen schützt. Ein komplexer Schutz dagegen wird durch eine Infektion mit Feld- oder gut replizierenden Impfstämmen induziert. Neben einer humoralen Immunität sind spezifische CTLs als ursächlich dafür anzunehmen. Bei der Entwicklung neuer Vakzinen ist dies ein wichtiger Aspekt.

Ilona MOSSBRUGGER
Helmholtz Zentrum München
German Research Center for Environmental Health
Institute of Experimental Genetics
Ingolstaedter Landstraße 1
85764 Neuherberg
Bundesrepublik Deutschland

Tel.: +49 89 31873241
Fax: +49 89 31873360
E-Mail: ilona.mossbrugger@helmholtz-muenchen.de

1 Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit Greifswald Insel Riems.

2 Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, München.

Das kaiserliche Privileg der Leopoldina vom 7. August 1687

Acta Historica Leopoldina Nr. 17

Herausgegeben vom Präsidium der Akademie

Ins Deutsche übertragen von Siegfried KRATZSCH und eingeleitet von
Georg USCHMANN

(3. Auflage 2006, 72 Seiten, 41 Seiten Faksimile, 4 Abbildungen, 9,90 Euro,
ISBN-10: 3-8047-2285-7, ISBN-13: 978-3-8047-2285-9)

Am 7. August 1687 vollzog Kaiser LEOPOLD I. (1640–1705) eine Urkunde, die der von ihm 1677 bestätigten *Sacri Romani Imperii Academia Naturae Curiosorum* (des Heiligen Römischen Reiches Akademie der Naturforscher) neben einem eigenen Wappen gewichtige Privilegien garantierte, Präsident und *Director Ephemeridum* sowie deren rechtmäßige Nachfolger zu kaiserlichen Leibärzten machte, sie in den erblichen Adelsstand erhob, verbunden mit der Pfalzgrafenwürde des heiligen Palastes vom Lateran, und – zweifellos am wichtigsten für die zukünftige Wirksamkeit der Akademie – die völlige Zensurfreiheit und ein Privilegium gegen den Nachdruck gewährte. Damit wurden Ansehen und Ausstrahlung der Akademie erheblich gefördert und eine Entwicklung eingeleitet, auf der letztlich die Stellung und Bedeutung der Leopoldina in der Gegenwart beruht. Sie durfte sich von da an Kaiserlich Leopoldinische Akademie der Naturforscher nennen, was noch im heutigen Namen – Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina – zum Ausdruck kommt. Sie erhielt das Recht, wie die kaiserlich bestätigten Universitäten Doktoren, Lizentiaten, Magister und Bakkalaurei in der medizinischen und philosophischen Fakultät sowie in der beider Rechte zu promovieren und gekrönte Poeten zu ernennen, darüber hinaus aber – ebenso wie jene – öffentlich Notarien und gewöhnliche Richter zu ernennen, uneheliche Kinder zu legitimieren, Vormünder und Kuratoren zu bestellen, Adoptionen und Sklavenfreilassungen zu bestätigen, unehrliche Personen wieder ehrlich zu machen, ehrbaren Personen Wappen zu erteilen usw., alles, auch wenn es heute für eine wissenschaftliche Akademie ebensowenig wie für Universitäten in Frage käme, ein Spiegel der zeitgenössischen Praxis, mit der die Habsburger Zentralgewalt ihren Einfluss gegenüber den Territorialfürstentümern geltend machte. Diese Privilegien nahm die Akademie erst später und nur gelegentlich in Anspruch. Dieses kostbare Dokument mit dem eigenhändigen Namenszug LEOPOLDS I., als einzige von mehreren kaiserlichen Urkunden heute noch erhalten, ist in vorliegender Publikation vollständig als Faksimile wiedergegeben, zusammen mit der wortgetreuen deutschen Übersetzung, die ein eindrückliches Bild barocker Formulierungskunst vermittelt. Unter der barocken Hülle verbirgt sich aber ein ausgefeilter juristischer Text, der die historischen Umgangsformen und die Möglichkeiten des damals gültigen *Corpus iuris civilis* für einen ganz konkreten Zweck auslegt und anwendet – und jedem Untertanen des Heiligen Römischen Reiches eine „Strafe von 50 Mark reinen Goldes“ androht, „so oft gegen diese Urkunde Unserer Bestätigung, Bewilligung, Gründung und Gnadenbewilligung verstoßen worden ist“. Die Publikation ist ausgestattet mit teilweise farbigen Abbildungen der Urkunde und des großen kaiserlichen Siegels, die Einleitung skizziert die Leopoldina bis zu diesem Wendepunkt in ihrer Geschichte knapp, aber treffend.

In Kommission bei Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Control of Bovine Virus Diarrhea Virus (BVDV) – the Norwegian Experience

Paul S. VALLE (Oslo)

The Bovine Virus Diarrhea Virus (BVDV) eradication strategy chosen by the Nordic countries was initially met with skepticism and a “wait and see” attitude. However, it soon became clear that the Norwegian BVDV program led to a marked drop in the number of BVDV-infected herds. The program parties therefore decided it was interesting to investigate whether the benefit of the program balanced the resources put in, and retrospective cost-benefit analyses were performed both for the first five years and now, recently, for the first ten years of control. The results from this latter calculation as well as other core experiences related to the success and failures of the Norwegian BVDV control program will be shared during this presentation.

The Norwegian BVDV control program can be divided into three distinct periods. It started as a joint effort between the National Animal Health Authorities (NAHA) and the cattle industry, i.e. TINE Norwegian Dairies, The cattle breeding association, GENO, and Norwegian Meat, lasting for five years up to 1998. There from the NAHA took over the control program and included it as a part of the national surveillance scheme. Then, in 2001, the industry entered back into the program in order to intensify the screening for the last infective herds and to reduce the length of the ‘epidemic tail’.

The retrospective cost-benefit analysis was carried out for the years 1993–2003. Information regarding the control cost input parameters was gathered from the cattle industry, NAHA and The Veterinary Institute. We accounted for variable costs (both direct costs associated with the control, and those costs carried by the farmers as a consequence of the control program). The benefit was estimated as the difference between the assumed losses without control – represented overall as 10% increase of the observed 1993 BVDV infection level – and the observed losses during the control period. An estimate of the financial losses associated with the BVDV infection was based on studies of the herd level effects on health, reproduction, and production in dairy herds with evidence of recent BVDV infection. We used a stochastic simulation model to account for the total uncertainty in both the control cost and financial loss estimates. The annual net benefits over the 10 years of BVD control were discounted to a 1993 net present value (NPV). The median NPV of the BVDV control, nationally, was estimated at 130 million NOK with a distribution of the NPV ranging from +51 to +201 million NOK (5th and 95th percentiles, respectively). Out of the total control costs the farmers and the farmer-owned industries (the co-operatives) had carried about 62% of the costs. However, the farmers were also the main beneficiaries.

The Norwegian experience shows a robust cost-efficiency for a BVDV eradication strategy; this stands in sharp contrast to earlier studies where the results were not supportive. Further more, the positive infectious status that the BVDV program has created for the Nor-

Paul S. Valle

wegian cattle population, has put our cattle industry in a unique situation with respect to both import and export of live animals. There are also benefits to the animal welfare status in the Norwegian cattle population. The values of these effects are not included in the present calculations.

Even though every cattle population and country is unique, the Norwegian findings and experiences should have wider implications.

Dr. Paul S. VALLE
The Norwegian School of Veterinary Sciences
Department of Production Animal Medicine
P. O. Box 8146 Dep.
0033 Oslo
Norway
Phone: +47 22964857
Fax: +47 22597081
E-Mail: psvalle@online.no

Einflussfaktoren auf die Analyse diagnostischer Ohrstanzen

Robert FUX, Ilona MOSSBRUGGER und Georg WOLF (München)

Die Untersuchung neugeborener Kälber durch Ohrstanzproben dürfte das vielversprechendste Diagnoseverfahren zur Kontrolle und Eradikation der BVDV-Infektion darstellen. Bei den Tiermarkierungs-/Probenahmesystemen erfolgt die Konservierung des Ohrgewebes durch Eintrocknung. Für eine schnelle, günstige und massentaugliche Untersuchung bieten sich vor allem der Antigen-Nachweis mittels ELISA und der RNA-Nachweis mittels *Real-time*-RT-PCR an.

Für die Untersuchung muss der Analyt ausreichend stabil im Gewebe vorhanden sein, die Freisetzung muss durch die Probenbearbeitung gewährleistet sein, und die Analyseverfahren muss eine hinreichende analytische Sensitivität aufweisen. Weiterhin dürfen hohe Transport- und Lagerungstemperaturen, mikrobieller Verderb, Kotkontaminationen und vor allem kolostrale Antikörper die Nachweisbarkeit des BVDV nicht in dem Maße beeinflussen, dass es zu falsch negativen Ergebnissen kommt.

Für die ELISA-Untersuchungen hat sich das Nichtstrukturprotein 2/3 (p80/p125) als ungeeignetes Antigen erwiesen. Die Gründe dafür liegen vor allem in der geringen analytischen Sensitivität der verfügbaren NS2/3-ELISAs, seinen instabilen Epitopen (unter dem Einfluss von höheren Temperaturen und bestimmten Detergentien) und der starken Neutralisation durch kolostrale Antikörper. Der Nachweis des Hüllprotein E^{ms} mittels ELISA hingegen lässt sich mit hoher Sensitivität durchführen und gelingt auch unter dem Einfluss oben aufgeführter Störfaktoren.

Die *Real-time*-RT-PCR stellt eine höchst sensitive Methode in der BVDV-Diagnostik dar, wobei sich hierzu die 5'-UTR als stabile Zielstruktur erwies. Für die Freisetzung der RNA aus dem getrockneten Gewebe führte ein automatisierbares mechanisches Bearbeitungsverfahren zur höchsten Ausbeute. Störende Faktoren spielen dabei eine untergeordnete Rolle. Eine Inhibition der PCR-Reaktion kann über interne Kontrollen überwacht werden.

Dr. Robert FUX
Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät,
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Veterinärstraße 13
80539 München
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 89 21802536
Fax: +49 89 21802597
E-Mail: robert.fux@micro.vetmed.uni-muenchen.de

Vorträge und Abhandlungen zur Wissenschaftsgeschichte 2002/2003 & 2003/2004

Acta Historica Leopoldina Nr. 48

Herausgegeben von Wieland BERG, Sybille GERSTENGARBE, Andreas KLEINERT
und Benno PARTHIER (Halle/Saale)

(2007, 385 Seiten, 118 Abbildungen, 22,95 Euro, ISBN 978-3-8047-2241-9)

Der Band enthält elf Vorträge aus den Wissenschaftshistorischen Seminaren der Leopoldina vom Wintersemester 2002 bis Sommersemester 2004: Die Rekonstruktion der angeblichen Verwicklung Adolf BUTENANDTS in die NS-Forschung (Achim TRUNK, Köln); die „Aufforderung“ Wilhelm WIENS an die deutschen Physiker am Beginn des Ersten Weltkrieges (Stefan L. WOLFF, München); zum Naturbegriff in der mittelalterlichen Medizin (Ortrun RIHA, Leipzig); Raphael LEMKINS Standpunkt über Menschenversuche und Genozid im Nürnberger Ärzteprozess 1946/47 (Paul WEINDLING, Oxford, UK); die Rassenhygienikerin Agnes BLUM und die Frauenbewegung (Johanna BLEKER, Berlin); die Vorgeschichte der Entdeckung der DNA-Doppelhelix und die Rolle des Protein-Paradigmas (Rudolf HAGEMANN, Halle/Saale); Politik und Mathematik während der „Kulturrevolution“ in China (Joseph W. DAUBEN, New York); Eugenik und Humangenetik am Beispiel der psychiatrischen Genetik in Deutschland, Großbritannien und den USA zwischen 1910 und 1960 (Volker ROELCKE, Gießen); Karl ZIEGLER und 50 Jahre Niederdruck-Polyethylen (Horst REMANE, Halle/Saale); Rudolf VIRCHOWS Strategie des Sammelns am Beispiel seines Pathologischen Museums (Thomas SCHNALKE, Berlin); Natur als Erklärungshilfe in den Bilderhandschriften des Sachsenspiegels (Heiner LÜCK, Halle/Saale).

Als Abhandlungen folgen wissenschaftshistorische Analysen zur Erklärung des Regenbogens bei Johann Wolfgang VON GOETHE und Josef Maria PERENTER (Thomas NICKOL, Halle/Saale) sowie zur Zusammenarbeit von Werner REICHARDT und Bernhard HASSENSTEIN auf dem Weg zur Tübinger Biokybernetik (Bernhard HASSENSTEIN, Merzhausen).

Abgeschlossen wird der Band durch zwei Dokumentationen (Uwe MÜLLER, Schweinfurt, dokumentiert Alexander VON HUMBOLDTS Mitwirkung an der Aufnahme AIMÉ BONPLANDS in die Akademie und ediert das dazu vorhandene Archivgut, und Rudolf HAGEMANN, Halle/Saale, beschreibt die Entwicklung der Genetik an der Universität Halle bis zum Ende des 20. Jahrhunderts (hier als Teil II für die Zeit ab 1946).

Seroepidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von Pestiviren bei Schafen und Ziegen in Österreich

Reinhild KRAMETTER-FRÖTSCHER¹, Angelika LOITSCH², Hannes KOHLER¹,
Alexandra SCHLEINER¹, Peter SCHIEFER¹, Ferdinand GOLJA³, Karin MÖSTL⁴,
und Walter BAUMGARTNER¹

In Österreich werden wie in anderen Ländern Programme zur Bekämpfung der BVD/MD durchgeführt. Von besonderer Bedeutung wird bei fortschreitendem Sanierungserfolg und damit Vorliegen von zunehmend empfänglichen Rinderpopulationen die Verhinderung von Neuinfektionen sein. Da Interspeziesübertragungen von Pestiviren der Wiederkäuer zwischen Rindern und kleinen Wiederkäuern bekannt sind und Pestiviren auch in diesen Populationen weltweit vorkommen, wurden seroepidemiologische Untersuchungen in verschiedenen Regionen Österreichs zur Verbreitung von Pestivirusinfektionen in den Schaf- und Ziegenpopulationen durchgeführt.

In den Bundesländern Kärnten, Tirol, Vorarlberg und Niederösterreich wurden insgesamt 4931 Schafblutproben von 377 Betrieben und 549 Ziegenblutproben von 80 Betrieben mittels eines konventionell erhältlichen indirekten ELISAs (BDV-AB ELISA Test Kit, Fa. Svanova Biotech AB, Schweden) auf Antikörper gegen Pestiviren getestet. Alle im ELISA positiven Proben wurden im SNT nachgetestet. Als Referenzstämme wurde für BVDV-1 der Stamm NADL, für BVDV-2 der Typ „125“ und für BDV der Referenzstamm MOREDUN verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden bezüglich der regionalen Seroprävalenzen sowie bezüglich verschiedener Haltungsformen bedingter Einflüsse ausgewertet.

Die Seroprävalenz betrug bei den Schafen 29 % (Einzeltierbasis) bzw. 63 % (Herdenbasis) und bei den Ziegen 12 % (Einzeltierbasis) bzw. 31 % (Herdenbasis), wobei deutliche regionale Unterschiede festgestellt wurden. Bei den Schafen konnten in Tirol und Vorarlberg signifikant höhere Prävalenzen festgestellt werden als in Kärnten und Niederösterreich. Die in Niederösterreich eruierte Prävalenz auf Einzeltierbasis bei den Schafen war mit 6 % signifikant geringer als in den übrigen Bundesländern. Bei den Ziegen konnte in Vorarlberg eine signifikant höhere Prävalenz im Vergleich zu den anderen Bundesländern nachgewiesen werden. Bezüglich der Haltungsformen konnte gezeigt werden, dass die Individualprävalenz bei Schafen, die gealpt wurden, mit 44 % signifikant höher war als bei solchen, die nicht gealpt wurden. Bei Schafen und Ziegen, die Kontakt zu betriebseigenen Rindern hatten, waren die Prävalenzen signifikant höher als bei Tieren, die keinen Kontakt zu Rindern bzw. betriebs-

1 Veterinärmedizinische Universität Wien, Klinik für Wiederkäuer, Klinisches Department für Nutztiere und Bestandsbetreuung, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Österreich.

2 Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, R.-Koch-Gasse 17, A-2340 Mödling, Österreich.

3 Institut für Angewandte Statistik und Systemanalyse, Joanneum Research, A-8010 Graz, Österreich.

4 Veterinärmedizinische Universität Wien, Klinische Virologie, Klinisches Department für Bildgebende Diagnostik, Infektions- und Laboratoriumsmedizin, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Österreich.

fremden Schafen oder Ziegen aufwiesen. Ein Großteil der im SNT untersuchten Proben wies einen höheren Antikörpertiter gegen einen bovinen als gegen einen ovinen Pestivirusstamm auf, doch lag speziell regional gehäuft der Hinweis auf ein zusätzlich unabhängig in der kleinen Wiederkäuerpopulation kursierendes Pestivirusinfektionsgeschehen vor.

Unterschiedliches Management in Schaf- und Ziegenbetrieben und verschiedene Tierdichten dürften die Ursache für die regionalen Schwankungen in den Prävalenzen sein. Besondere epidemiologische Bedeutung dürfte dem intensiven Tierkontakt während der Alpengang zukommen. Die Ergebnisse deuten auch daraufhin, dass Interspeziesübertragungen von Pestiviren vom Rind auf Schaf und Ziege häufig vorkommen. Weitere Untersuchungen zur Rolle von Pestivirus-infizierten Schafen und Ziegen sind erforderlich, um zu prüfen, ob es ausreichend ist, die BVD Bekämpfung auf die Rinderpopulation zu beschränken.

Dr. Reinhild KRAMETTER-FRÖTSCHER
Veterinärmedizinische Universität Wien
Klinik für Wiederkäuer
Klinisches Department für Nutztiere
und Bestandsbetreuung
Veterinärplatz 1
A-1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250775204
Fax: +43 1 250775290
E-Mail: reinhild.krametter@vu-wien.ac.at

ISSN: 0369-5034
ISBN: 978-3-8047-2467-9