

Departement für Nutztiere
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun

**Übertragung des Border-Disease-Virus von einem persistent infizierten Rind
auf seronegative Rinder durch Kontaktinfektion und virushaltiges Sperma**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von
Sandra Frei
Tierärztin
von Ehrendingen AG

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun, Referent
PD Dr. M. Schweizer, Korreferent

Zürich, 2014
Zentralstelle der Studentenschaft

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	4
2. SUMMARY	5
3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	6
4. LITERATURÜBERSICHT	8
4.1. Border-Disease	8
4.2. Border-Disease-Virus	8
4.2.1. Taxonomie	8
4.2.2. Struktur	9
4.2.3. Tenazität und Überlebensfähigkeit	11
4.3. Pathogenese	11
4.3.1. Intraspeziesübertragung	11
4.3.1.1. Horizontale Übertragung	11
4.3.1.2. Vertikale Übertragung	13
4.3.2. Speziesspezifität und Interspeziesübertragung	14
4.3.2.1. Übertragung vom Rind auf kleine Wiederkäuer	14
4.3.2.2. Übertragung vom kleinen Wiederkäuer auf das Rind	15
4.4. Vorkommen und Klinik	17
4.4.1. Schaf	17
4.4.2. Ziege	20
4.4.3. Rind	22
4.5. Pathologisch-anatomische Befunde bei Border-Disease	23
4.6. Epidemiologie der Border-Disease	23
5. TIERE, MATERIAL UND METHODIK	24
5.1. Tiergruppen	24
5.1.1. pi-BDV-Rind	24
5.1.2. Gruppe A: Kontaktinfektion von frühträchtigen Rindern	25
5.1.3. Gruppe B: Besamung von Kühen mit infiziertem Sperma	25
5.2. Pestivirusstatus der beiden Tiergruppen A und B	25
5.3. Untersuchungsort und -zeitraum	26
5.3.1. Haltung der Tiere	26
5.3.2. Untersuchungszeitraum	26
5.3.3. Phasen der Untersuchung	27
5.3.3.1. Akklimatisationsphase	27
5.3.3.2. Infektionsphase	28
5.4. Sperma des pi-BDV-Jungstiers	29
5.5. Methodik der Untersuchungen	31
5.5.1. Klinische Untersuchungen	31
5.5.2. Trächtigkeitsuntersuchungen	31

5.5.3. Entnahme von Blutproben	32
5.6. Virologische Blutuntersuchungen	32
5.6.1. Nachweis viraler RNA im Blut	33
5.6.2. Antikörpernachweis im Blut	33
5.6.3. Serumneutralisationstest (SNT)	35
5.7. Untersuchungen an Uterus, Plazenta und Fetus in der Gruppe A	36
5.7.1. Pathologisch-anatomische Untersuchung	36
5.7.2. Histologische Untersuchung	36
5.7.3. Immunhistochemische Untersuchung	36
5.7.4. Virologische Untersuchung	38
5.8. Statistik	38
5.9. Zusammenarbeit mit anderen Instituten	39
5.10. Tierversuchsbewilligung	40
6. ERGEBNISSE	41
6.1. pi-BDV-Rind	41
6.2. Kontaktinfektion von frühträchtigen Rindern (Gruppe A)	43
6.2.1. Klinische Befunde bei den Rindern der Gruppe A	43
6.2.2. Virologische Blutuntersuchungen bei den Rindern der Gruppe A	46
6.2.3. Untersuchungen an Uterus, Plazenta und Fetus in der Gruppe A	50
6.2.4. Beziehung zwischen der Serokonversion und den klinischen Befunden der Gruppe A	53
6.2.5. Beziehung zwischen der Serokonversion und den pathologischen Befunden der Gruppe A	53
6.3. Besamung von Kühen mit infiziertem Sperma (Gruppe B)	55
6.3.1. Klinische Befunde bei den Kühen der Gruppe B	55
6.3.2. Virologische Blutuntersuchungen bei den Kühen der Gruppe B	57
6.3.3. Beziehung zwischen der Serokonversion und den klinischen Befunden der Gruppe B	58
7. DISKUSSION	59
7.1. Übersicht	59
7.2. Kontaktinfektion von frühträchtigen Rindern (Gruppe A)	60
7.2.1. Klinische Befunde bei den Rindern der Gruppe A	60
7.2.2. Virologische Blutuntersuchungen bei den Rindern der Gruppe A	62
7.2.3. Untersuchungen an Uterus, Plazenta und Fetus in der Gruppe A	66
7.2.4. Beziehung zwischen der Serokonversion und den pathologischen Befunden der Gruppe A	71
7.3. Besamung von Kühen mit infiziertem Sperma (Gruppe B)	73
7.3.1. Klinische Befunde bei den Kühen der Gruppe B	73
7.3.2. Virologische Blutuntersuchungen bei den Kühen der Gruppe B	73
7.4. Schlussfolgerung	75

8. LITERATURVERZEICHNIS	76
9. LEBENSLAUF	88
10. DANKSAGUNG	89

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, abzuklären, ob das Border-Disease-Virus (BDV) von einem persistent mit BDV infizierten (pi-BDV-) Kalb bzw. Jungtier auf andere seronegative Rinder und Kühe übertragbar ist. Es wurden anhand der Tiergruppen A und B zwei unterschiedliche Übertragungswege untersucht. Die Gruppe A bestand aus sechs Rindern, welche ab dem 50. Tag der Trächtigkeit während 60 Tagen zusammen mit einem persistent mit BDV infizierten Kalb in einem Laufstall gehalten wurden. Die Tiere wurden in dieser Zeit täglich klinisch untersucht und es wurden in regelmässigen Abständen Blutproben zum Nachweis von pestiviraler RNA und Antikörpern entnommen. Nach den 60 Tagen wurden die Tiere geschlachtet und die Feten und Plazenten der Tiere pathologisch-anatomisch und virologisch untersucht. Nur bei drei Rindern konnte zwischen den Tagen 8 und 14 nach Infektionsbeginn eine leichte Virämie festgestellt werden. Bis zum Tag 40 hatten aber alle sechs Rinder gegen BDV serokonvertiert. Die Plazenten der drei virämisch gewesenen Rinder wiesen histologisch Anzeichen einer Plazentitis auf und die Organe ihrer Feten waren bei der immunhistochemischen Untersuchung auf BDV positiv. Ebenso konnte in den Organproben dieser Feten BDV-RNA nachgewiesen werden. Zusammenfassend führte die gemeinsame Haltung der Rinder mit einem pi-BDV-Kalb bei allen sechs Rindern zur Serokonversion und bei drei davon zusätzlich zu einer persistenten Infektion des Fetus.

Die Gruppe B bestand aus sechs Kühen. Fünf davon wurden mit Sperma eines pi-BDV-Jungstiers besamt und eine Kuh diente als Kontrolle. Bis zum Tag 28 nach Besamung wiesen alle besamten Kühe neutralisierende Antikörper gegen BDV auf, während die Kontrollkuh seronegativ blieb. Eine Konzeption trat, vermutlich aufgrund der schlechten Spermaqualität, bei keinem Tier ein. Die Untersuchungen zeigten, dass die Besamung mit virushaltigem Sperma eines pi-BDV-Stiers bei allen besamten Rindern zur Serokonversion führte.

2. SUMMARY

The purpose of this study was to investigate the transmission of Border disease virus (BDV) from a persistently infected calf to pregnant heifers and from a persistently infected bull to bred cows. Two groups of cattle were investigated. Group A consisted of six heifers that were co-housed with the infected calf in a free stall barn from days 50 to 110 of pregnancy. The heifers were examined clinically every day and underwent periodic blood sampling for pestivirus RNA and antibody testing. The heifers were slaughtered after 60 days of exposure to the infected calf, and the fetuses and placentae underwent postmortem and virological examination. Three heifers had mild viraemia between days 8 and 14 after the start of exposure, and by day 40, all heifers had seroconverted to BDV. The placentae of the three viraemic heifers had histological evidence of inflammation, and immunohistochemical evaluation of various fetal organs showed positive staining for BDV antigen. The organs were positive for BDV RNA. This trial showed that pregnant heifers co-housed with a calf persistently infected with BDV are highly likely to seroconvert and are likely to produce offspring persistently infected with BDV.

Group B consisted of six cows, five of which were artificially inseminated with frozen semen from a young bull persistently infected with BDV. The remaining cow served as a control and was not inseminated. By day 28 post insemination, all five experimental cows, but not the control cow, had developed neutralising antibodies against BDV. None of the experimental cows conceived, which was attributed to poor semen quality. This trial showed that cows inseminated with frozen semen from a bull persistently infected with BDV are highly likely to seroconvert to this virus.

3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Das Border-Disease-Virus (BDV) gehört zusammen mit den Genotypen 1 und 2 des Bovinen-Virus-Diarrhoe-Virus (BVDV-1 und -2) und dem Virus der klassischen Schweinepest („classical swine fever virus“, CSFV) zum Genus *Pestivirus*. Ursprünglich wurden die Pestiviren anhand der betroffenen Spezies und der ausgelösten Erkrankung benannt. So wurden Isolate vom kleinen Wiederkäuer als BDV, Isolate vom Rind als BVDV und Isolate vom Schwein als CSFV bezeichnet. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass sowohl die Wiederkäuer als auch die Schweine durch mehrere Pestiviren infiziert werden können (NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008; LEBLANC et al., 2010). So konnte das Border-Disease-Virus schon von mehreren Autorengruppen beim Rind isoliert werden (BECHER et al., 1997; CRANWELL et al., 2007; HORNBERG et al., 2009; STRONG et al., 2010; McFADDEN et al., 2012). Ebenfalls konnten schon mehrere Autorengruppen Interspeziesübertragungen von Pestiviren zwischen Rindern und kleinen Wiederkäuern nachweisen (CARLSSON, 1991; CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995; BROADDUS et al., 2007; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008a, 2008b; BROADDUS et al., 2009; BACHOFEN et al., 2013). Thema neuerer Studien war nun insbesondere die Übertragbarkeit des Border-Disease-Virus von Schafen auf Rinder. So wurde in experimentellen Studien gezeigt, dass es bei Kontakt von seronegativen Rindern mit persistent mit BDV infizierten Schafen zur Serokonversion kommt (REICHLE, 2009; BRAUN et al., 2013a), und dass das BD-Virus bei trächtigen Rindern die Plazentarschranke gleich wie das BVD-Virus überschreitet, den Fetus infiziert und bei über 50 % der Tiere zum frühzeitigen Abbruch der Trächtigkeit führt (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a). Ob die Übertragung des BD-Virus von persistent mit BDV infizierten Rindern auf seronegative Rinder ebenfalls möglich ist und welche Auswirkungen eine solche Infektion haben könnte, wurde bisher nicht erforscht. Einzig aus Neuseeland liegt ein Bericht vor, in welchem in einer Herde ein Zuchttier als persistent mit BDV infiziert

identifiziert wurde (McFADDEN et al., 2012). Bei allen Kühen der Herde wurden zu diesem Zeitpunkt Antikörper gegen BDV im Blut nachgewiesen. Auf welchem Weg die Tiere infiziert wurden, war retrospektiv nicht mehr feststellbar. Das Ziel dieser Arbeit war es, abzuklären, ob das Border-Disease-Virus von einem persistent mit BDV infizierten Kalb bzw. Jungstier auf andere seronegative Rinder bzw. Kühe übertragbar ist. Es wurden dazu bei zwei Tiergruppen zwei verschiedene Übertragungswege untersucht, nämlich die Kontaktinfektion fruchträchtiger seronegativer Rinder mit einem pi-BDV-Rind einerseits und die Insemination seronegativer Kühe mit virushaltigem Sperma andererseits.

4. LITERATURÜBERSICHT

4.1. Border-Disease

Die Border-Disease (BD) ist eine virale Erkrankung bei Schafen und Ziegen, die nicht nur durch das Border-Disease-Virus (BDV), sondern auch durch das Bovine-Virus-Diarrhoe-Virus-1 und -2 (BVDV-1/-2) ausgelöst werden kann (CARLSSON, 1991; SAWYER, 1992; CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995). Die Infektion kann sowohl transient als auch persistent auftreten. Persistent infizierte Tiere spielen jedoch aufgrund ihrer starken Virusausscheidung in der Epidemiologie der Erkrankung eine weitaus grössere Rolle als transient infizierte. Infolge der typischen klinischen Symptome wie haarig gekräuseltem Vlies und tonisch-klonischen Muskelkrämpfen werden an Border-Disease erkrankte Tiere auch als „hairy-shakers“ oder „fuzzy lambs“ bezeichnet (NETTLETON, 1987). Bis heute konnte die Border-Disease fast weltweit diagnostiziert werden, und sie wurde in mehreren Übersichtsartikeln beschrieben (WOLF und BÜTTNER, 1994; BOSTEDT und DEDIÉ, 1996; NETTLETON et al., 1998; BRAUN et al., 2002; NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010b). In der Schweiz trat die Erkrankung 1975 das erste Mal bei Lämmern auf (CRAVERO et al., 1975), und das sie verursachende Virus konnte 2001 das erste Mal isoliert werden (BRAUN et al., 2002).

4.2. Border-Disease-Virus

4.2.1. Taxonomie

Das Border-Disease-Virus (BDV) gehört zusammen mit dem Bovinen-Virus-Diarrhoe-Virus (BVDV) und dem Virus der klassischen Schweinepest (‘classical swine fever virus’, CSFV) zum Genus Pestivirus. Die Genera Pestivirus, Flavivirus und Hepacivirus bilden zusammen die Familie der Flaviviridae (PLETNEV et al., 2011). Diese Einteilung ist noch nicht sehr alt, denn ursprünglich wurden die Pestiviren zur Familie der Togaviridae gezählt (MOENNING,

1990). BDV und BVDV bilden zusammen die Gruppe der ruminanten Pestiviren. Die ruminanten Pestiviren bestehen aus einer Vielzahl von Genotypen; anhand phylogenetischer Analysen (Abb. 1) konnte bis heute bereits eine grosse Diversität aufgezeigt werden (BECHER et al., 2003; STALDER et al., 2005). So werden heute die Bovinen-Virus-Diarrhoe-Viren in zwei Genotypen (BVDV-1 und -2) unterteilt und innerhalb des Genotyps BVDV-1 in bis zu 16 Subgenotypen unterschieden (VILČEK et al., 2001; NAGAI et al., 2008; PETERHANS et al., 2010). Die Border-Disease-Viren werden zurzeit in bis zu 7 Genotypen untergliedert (PETERHANS et al., 2010), wobei jedoch immer wieder neue Typen isoliert werden (VALDAZO-GONZÁLES et al., 2007; OGUZOGLU et al., 2009; GIAMMARIOLI et al., 2011; GIANGASPERO, 2011). In der Schweiz konnten bisher sowohl BD-Viren des Genotyps BDV-3 als auch einer separaten Untergruppe BDSwiss gefunden werden (BRAUN et al., 2002; BÜCHI, 2009; REICHERT, 2009; SCHENK, 2012; BRAUN et al., 2013a).

4.2.2. Struktur

Pestiviren besitzen eine (+)-Strang-RNA, welche einen einzelnen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF) kodiert. Am 5'- und am 3'-Ende dieses ORF befindet sich jeweils eine nicht kodierende Sequenz (UTR, „untranslated region“) (NETTLETON und ENTRICAN, 1995; NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008). Die Sequenz der 5'-UTR ist zirka 288 Basenpaare lang (VILČEK et al., 2001) und bei allen Pestiviren sehr ähnlich, sie besitzt aber innerhalb dieser Sequenz zwei kurze, innerhalb der Pestiviren variable, Regionen. Dies führt dazu, dass die 5'-UTR zur Herstellung von Primern zur Amplifizierung, aber auch Spezifizierung der Pestiviren mittels PCR verwendet wird (NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008). Der ORF wird in ein einzelnes Polypeptid translatiert, welches aus den Proteinen N^{pro}, C, E^{rns}, E1, E2, p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B besteht.

Das BD-Virus wie auch das BVD-Virus lassen sich in zwei Biotypen, einen zytopathogenen (cp) und einen nicht zytopathogenen (ncp), unterteilen. Nach dem heutigen Wissensstand entsteht das cp-Virus innerhalb des jeweiligen Trägers durch Mutation aus dem ncp-Virus (BECHER et al., 1996; NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008). Der nicht zytopathogene Biotyp kann sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden und wird in Feldversuchen viel häufiger als der zytopathogene isoliert (NETTLETON und ENTRICAN, 1995; PETERHANS et al., 2010).

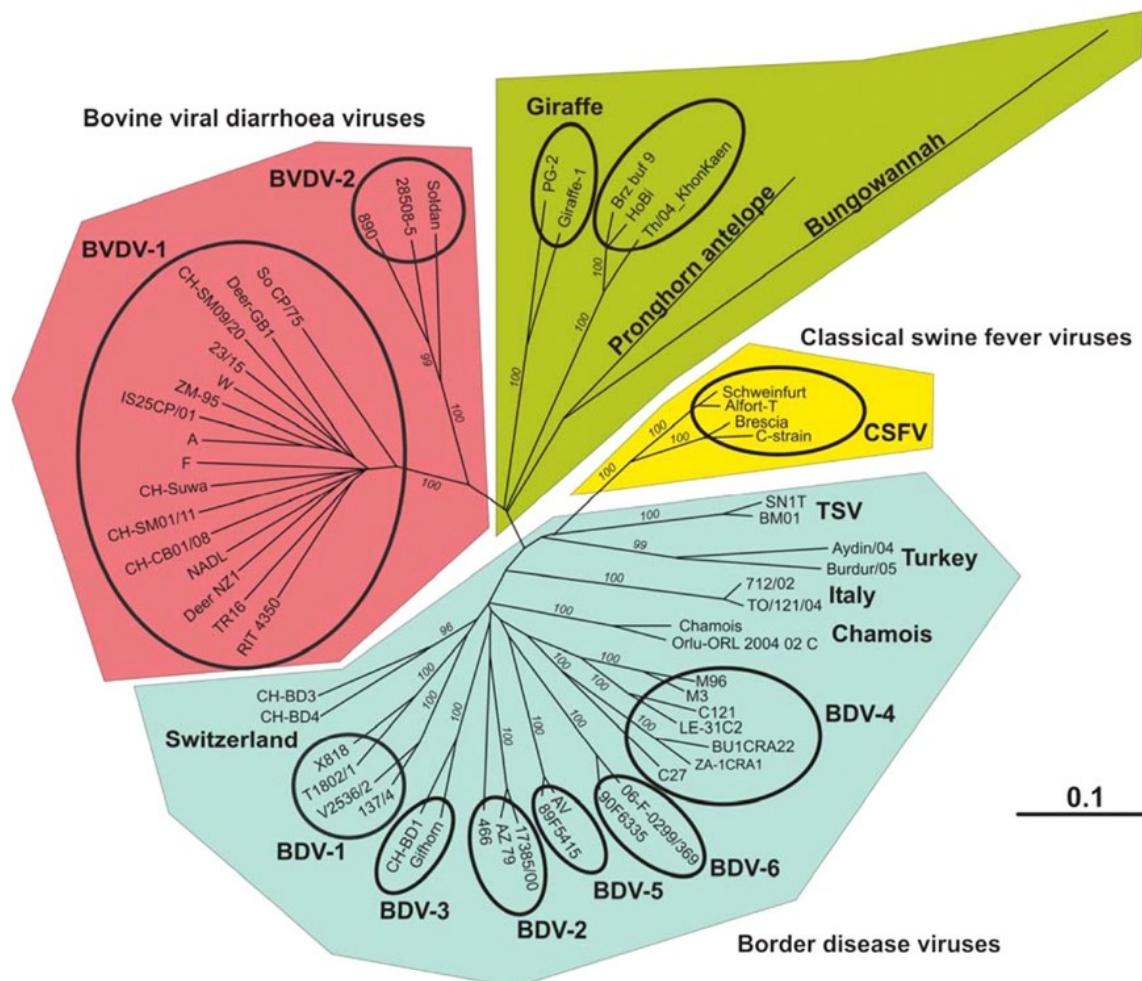


Abb.1: Phylogenetische Analyse und Klassifizierung der Pestiviren basierend auf der für das Virusprotein N^{pro}-kodierenden Sequenz (modifiziert von PETERHANS et al., 2010)

4.2.3. Tenazität und Überlebensfähigkeit

Die Tenazität von Pestiviren ist gering. Die Viren werden durch gängige Desinfektionsmittel inaktiviert. Das BVD-Virus verliert seine Infektiosität bei 37 °C nach etwa 4 Tagen, bei 56 °C jedoch schon nach zirka 45 Minuten (MAYR und KAADEN, 2007).

4.3. Pathogenese

4.3.1. Intraspeziesübertragung

4.3.1.1. Horizontale Übertragung

Die wichtigsten Quellen für Pestiviren sind asymptomatisch persistent infizierte (pi-) Tiere. Diese scheiden das Virus in grossen Mengen in allen Sekreten aus. So kann bei oronasalem Kontakt eine Übertragung über jegliche Art von Sekreten und Exkreten stattfinden, insbesondere über Speichel und Nasenausfluss (NETTLETON und ENTRICAN, 1995). In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich das Virus auf diese Weise schnell von einem pi-Tier auf die ganze Herde verbreiten kann (BARLOW et al., 1980; CARLSSON und BELÁK, 1994; BRAUN et al., 2004). Das Virus wird aber auch im Sperma von mit Pestiviren infizierten Stieren und Schafböcken ausgeschieden (BARLOW et al., 1986; GIVENS et al., 2003; GIVENS und MARLEY, 2013). Laut GARD et al. (2007) kann das Virus infolge vier verschiedener Infektionstypen in das Sperma gelangen: a) persistente Infektion des Stiers infolge Exposition in utero (McFADDEN et al., 2012), b) akute Infektion des Stiers infolge Exposition nach Entwicklung des Immunsystems, c) anhaltende testikuläre Infektion des Stiers infolge andauernder Infektion des Hodengewebes nach einer akuten Infektion (DÜNSER et al., 2005; GIVENS et al., 2007; GIVENS et al., 2009) und d) persistente testikuläre Infektion infolge unbekannter Virusexposition (VOGES et al., 1998; GARD et al., 2007). Bei persistent mit BVDV infizierten Tieren ist die nachgewiesene Virusmenge bedeutend höher als bei transient infizierten. Das Sperma kann dabei eine normale (MEYLING und MIKÉL JENSEN, 1988;

KIRKLAND et al., 1991), aber auch eine vergleichsweise schlechtere Qualität aufweisen (PATON et al, 1990; NETTLETON et al., 1998). Eine schlechte Qualität äussert sich in einer Reduktion des Spermavolumens sowie der Spermienzahl und -motilität. Sie führt damit auch zu einer schlechteren Befruchtungsfähigkeit eines persistent mit BVDV infizierten Stiers (McFADDEN et al., 2012) bzw. eines persistent mit BDV infizierten Schafocks (GARDINER und BARLOW, 1981). Das ausgeschiedene BVD-Virus kann die Kryokonservierung und Prozessierung des Samens unbeschadet überstehen und somit auch über die künstliche Besamung übertragen werden (GARD et al., 2007). In verschiedenen Experimenten wurde versucht, das BVD- bzw. das BD-Virus natürlich und via künstliche Besamung zu übertragen. So besamten GARDINER und BARLOW (1981) verschiedene seronegative Mutterschafe mit Sperma eines pi-BDV-Bocks oder liessen sie von ihm decken. Nach 30 Tagen hatten alle Mutterschafe serokonvertiert. Weiter wurde festgestellt, dass sich das Virus im Uterus der Mutterschafe bis zu 32 Tage halten kann und somit auch bei einer späteren Befruchtung eine Gefahr für den Fetus darstellt. MEYLING und MIKÉL JENSEN (1988) haben als erste gezeigt, dass auch BVDV via Sperma übertragen und zur Serokonversion der besamten Rinder führen kann. Ebenfalls wurde über die transiente Infektion und Serokonversion bei Rindern durch die Befruchtung mit Samen von pi-BVDV-Stieren (KIRKLAND et al., 1994) und zusätzlich von transient mit BVDV infizierten Stieren (KIRKLAND et al., 1997) berichtet. Dabei war die Konzeptionsrate von einem pi-BVDV-Stier wesentlich schlechter (38 %) als von einem transient infizierten (65 %) und von den mit letzterem Sperma besamten Rindern serokonvertierten bedeutend weniger Tiere. Bei der Insemination von Rindern mit Samen von Stieren mit einer anhaltenden testikulären BVDV-Infektion wurde keine Serokonversion der besamten Tiere festgestellt und das Virus persistierte im Hodengewebe der Stiere bis zu 2.75 Jahre (GIVENS et al., 2009). Bei den Infektionsversuchen, bei denen eine Serokonversion des Muttertiers stattfand, wurde zusätzlich eine vertikale Übertragung

nachgewiesen. Neben der Geburt von nicht infizierten kam es auch zur Geburt von persistent infizierten Nachkommen (GARDINER und BARLOW, 1981; MEYLING und MIKÉL JENSEN, 1988; KIRKLAND et al., 1994). Diese entstanden möglicherweise infolge der Rezirkulation des Virus in empfänglichen Muttertieren oder infolge Virus-Persistenz innerhalb des Urogenitaltrakts (FRAY et al., 2000). In einem Betrieb, in welchem ein persistent mit Border-Disease-Virus infizierter Stier zum Decken verwendet wurde, wurde im Nachhinein festgestellt, dass alle Rinder auf dem Betrieb, welche mit dem Stier zusammengehalten wurden und für Bluttests noch zur Verfügung standen (15/62), gegen das Border-Disease-Virus serokonvertiert hatten (McFADDEN et al., 2012).

4.3.1.2. Vertikale Übertragung

Die schwerwiegendsten Konsequenzen treten bei einer Pestivirus-Infektion eines empfänglichen Muttertiers während der Trächtigkeit ein. Die betroffenen Tiere zeigen selbst kaum Anzeichen einer Infektion, während das Virus den Fetus innerhalb einer Woche infiziert (OSBURN und CASTRUCCI, 1991). Die Auswirkungen einer solchen Infektion hängen von verschiedenen Faktoren, wie dem spezifischen Virusstamm, der Virusdosis und dem genauen Trächtigkeitsstadium zum Zeitpunkt der Infektion ab (BROWNLIE, 1990; GROOMS, 2004). Generell sind die Auswirkungen auf die Trächtigkeit umso dramatischer, je früher die Infektion stattfindet. Die ovinen und caprinen Feten sind erst mit 60 bis 80 Tagen fähig, auf einen Antigenstimulus immunologisch zu reagieren. Daher sterben bei einer Infektion vor diesem Zeitpunkt bis zu 50 % von ihnen ab (DEPNER et al., 1991; LØKEN und BJERKÅS, 1991; NETTLETON und ENTRICAN, 1995; BACHOFEN et al., 2013). Beim bovinen Fetus führt eine Infektion bis zum 100. Gestationstag zu den meisten Verlusten, wobei die Überlebensrate mit bis zu 70 % bedeutend höher als bei Schafen ist (RADOSTITS et al., 2007a).

4.3.2. Speziesspezifität und Interspeziesübertragung

Ursprünglich wurden die Pestiviren anhand der betroffenen Spezies und der ausgelösten Erkrankung benannt. So wurden Isolate vom kleinen Wiederkäuer als BDV, Isolate vom Rind als BVDV und Isolate vom Schwein als CSFV bezeichnet. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass sowohl die Wiederkäuer als auch die Schweine durch verschiedene Pestiviren infiziert werden können (NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008), und es existieren unterschiedliche Berichte über die Übertragung von Pestiviren zwischen Rindern und kleinen Wiederkäuern (CARLSSON, 1991; CARLSSON und BELÁK, 1994; CAMPBELL et al., 1995; BROADDUS et al., 2007; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008a, 2008b; BACHOFEN et al., 2013). Die Rolle der Wildwiederkäuer und Neuweltkameliden ist bis heute nicht geklärt. Es wurde allerdings über einen Border-Disease- Ausbruch bei wild lebenden Gämsen berichtet (MARCO et al., 2007) und serologische Untersuchungen zeigten, dass bei Gämsen, Rothirschen und Neuweltkameliden sowohl BVDV- als auch BDV-Infektionen vorkommen können (PIOZ et al., 2007; MARCO et al., 2008; DANUSER et al., 2009; MUDRY et al. 2010; CASAUBON et al., 2012). Jedoch wurde nie ein Beweis erbracht, dass die genannten Tierarten eine Infektionsquelle für die Hauswiederkäuer darstellen (VILČEK und NETTLETON, 2006).

4.3.2.1. Übertragung vom Rind auf kleine Wiederkäuer

Über die Übertragung von BDV vom Rind auf die kleinen Wiederkäuer wurde bis heute nicht berichtet. Vom BVD-Virus ist jedoch bekannt, dass es sowohl auf natürlichem Weg als auch experimentell vom Rind auf die kleinen Wiederkäuer übertragbar ist (CARLSSON, 1991; CAMPBELL et al., 1995; BROADDUS et al., 2007, 2009; BACHOFEN et al., 2013). Die Infektion mit BVDV bewirkte bei nicht trächtigen Ziegen lediglich eine Serokonversion (BROADDUS et al., 2007), während sie bei den Feten bzw. den nachfolgenden geborenen Jungtieren von trächtigen Schafen und Ziegen zu Symptomen der Border-Dis-

ease führte. Es traten Aborte und Totgeburten auf (BROADDUS et al., 2009; BACHOFEN et al., 2013) und es wurden lebensschwache Ziegenkitze (BROADDUS et al., 2009) bzw. Lämmer geboren, die teilweise neurologische Symptome wie Tremor zeigten und ein verändertes Vlies aufwiesen (CARLSSON, 1991; CAMPBELL et al., 1995). Bei einem Teil der Jungtiere konnten das BVD-Virus, aber keine BVDV-Antikörper nachgewiesen werden, was für eine persistente Infektion sprach.

4.3.2.2. Übertragung vom kleinen Wiederkäuer auf das Rind

Ein erster Bericht über den Versuch, Rinder mit dem vom Schaf gewonnenen Border-Disease-Virus zu infizieren, ist bereits 40 Jahre alt (GIBBONS et al., 1974). Es gelang damals durch die intramuskuläre Injektion einer Emulsion aus Gewebe von pi-BDV-Schafen bei 9 von 10 Kühen einen Abort oder eine Totgeburt auszulösen. CARLSSON und BELÁK (1994) berichteten über einen Betrieb, in welchem im Winter 1989/90 fünf spätfrächtige Rinder, die aus einem BVDV-freien Betrieb stammten, gegen Pestiviren serokonvertierten. Der Ursprung der Infektion wurde bei einem persistent mit BDV infizierten Mutterschaf vermutet, das erst wenige Monate zuvor zugekauft wurde und zu welchem die Rinder engen Kontakt hatten. Die Kälber der betroffenen Rinder wiesen auch nach drei Monaten noch hohe Antikörpertiter gegen Pestiviren auf. Dies sprach für eine Infektion nach Eintritt der Immunkompetenz, also in der späten Trächtigkeit, und es handelte sich nicht mehr um maternale Antikörper. Weitere solche Berichte folgten erst einige Jahre später aus Österreich. KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2008a, 2008b) berichteten sowohl über natürliche als auch über experimentell verursachte Infektionen von Rindern durch persistent mit BDV infizierte Schafe. In einer Schafherde in der Nähe von Salzburg kam es durch einen zugekauften persistent infizierten Schafbock zu mehreren Aborten bei Schafen und zum Abort bei einer Kuh. Mittels einem Serumneutralisations-test (SNT) wurde nachgewiesen, dass die Kuh gegen BDV serokonvertiert hatte

(KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008a). Diese Beobachtung wurde dann experimentell bestätigt, indem vier zwei Monate alte, Pestivirus-negative Kälber mit sechs persistent mit BDV infizierten Schafen gemeinsam gehalten wurden. Aufgrund einer Serokonversion gegen BDV wurde bei allen vier Kälbern auf eine Infektion mit dem BD-Virus geschlossen (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008b). Ein ähnliches Experiment wurde mit neun Kälbern durchgeführt, welche mit persistent mit BDV infizierten Schafen zusammengehalten wurden (REICHLE, 2009). Infolge des Kontakts zu den Schafen serokonvertierten 6 von 9 Kälbern gegen BDV. Zusätzlich zeigten alle Kälber während der Infektionsphase leicht- bis mittelgradige Schleimhautveränderungen im Bereich des Gaumens, der Mundwinkel, der Schleimhäute der Ober- und Unterlippen und der incisiven Gingiva. In einem weiteren Versuch (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a) wurden die Auswirkungen einer gemeinsamen Haltung von persistent mit BDV infizierten Schafen und trächtigen Rindern untersucht. Dazu wurden 8 zwischen 47 und 73 Tagen trächtige Rinder zusammen mit 9 gesunden persistent mit BDV infizierten Schafen gehalten. Alle Rinder serokonvertierten nach 23 bis 38 Tagen. Ausser einem milden Temperaturanstieg wurden keine weiteren klinischen Symptome festgestellt. Fünf Tiere abortierten jedoch nach 54 bis 202 Tagen. In vier Feten und in der Plazenta des fünften Fetus (der Fetus stand für die Untersuchung nicht zur Verfügung) konnte BDV nachgewiesen werden. Drei Rinder gebaren drei klinisch gesunde Kälber. Zwei der Kälber waren Pestivirus-negativ, eines davon präkolostral serologisch positiv und eines negativ. Das dritte Kalb war zum Zeitpunkt der Geburt Pestivirus-positiv und Antikörper-negativ; es wurde deshalb eine persistente Infektion vermutet. Als das Kalb jedoch im Alter von 7 Monaten wieder getestet wurde, hatte es serokonvertiert, und es konnte kein Pestivirus mehr nachgewiesen werden. Die Abortraten in dieser Studie sowie in derjenigen von GIBBONS et al. (1974) zeigen, wie drastisch der Einfluss einer BDV-Infektion auf die Fertilität von Rindern ohne Antikörper gegen Pestivirus sein kann.

4.4. Vorkommen und Klinik

Pestiviren infizieren im Allgemeinen nur Tiere der Ordnung Paarhufer (*Artiodactyla*) (NETTLETON und ENTRICAN, 1995). Ruminante Pestiviren wurden sowohl bei domestizierten Arten als auch bei Wildwiederkäuern nachgewiesen (BECHER et al., 1997; VILČEK und NETTLETON, 2006; CASAUBON et al., 2012). Bei den domestizierten Arten sind dies vor allem Schweine, Rinder, Schafe, Ziegen, Rothirsche, Alpakas, Lamas und Kamele. Bei den Wildwiederkäuern sind bis zu 40 betroffene Spezies bekannt (NETTLETON und ENTRICAN, 1995).

4.4.1. Schaf

Infektion von nicht trächtigen immunkompetenten Schafen

Bei gesunden Schaf-Neonaten und adulten Schafen verläuft die Infektion mit BDV meist subklinisch. Es kann zu milden Temperaturanstiegen kommen, die aber meist unbemerkt bleiben. Die kurzzeitige Virämie lässt sich, wenn überhaupt, nur zwischen dem 4. und 11. Tag post infectionem nachweisen. Sie wird von einer leichtgradigen Leukopenie begleitet. Etwa 2 bis 3 Wochen nach der Infektion können Antikörper nachgewiesen werden (NETTLETON et al., 1998; THABTI et al., 2002). Die sogenannte Aveyron-Disease bildet eine Ausnahme von diesen subklinischen Fällen (NETTLETON, 1990). Im Jahr 1983 starben in der Aveyron-Region in Frankreich etwa 1500 Mutterschafe und 24'000 Lämmer an einer Erkrankung, die mit hochgradigem Fieber, Durchfall, Nasenausfluss, Dyspnoe und einer anhaltenden Leukopenie einherging. Als Erreger wurde ein ungewöhnlich virulentes BD-Virus nachgewiesen (NETTLETON, 1990).

Infektion von trächtigen serologisch negativen Schafen

Eine BDV-Infektion während der Trächtigkeit verläuft beim Muttertier fast symptomlos. Der ncp-Biotyp des BDV kann jedoch eine nekrotisierende Plazentitis verursachen und den Fetus infizieren (NETTLETON und ENTRICAN,

1995). Der weitere Verlauf der Trächtigkeit ist vom Zeitpunkt der Infektion abhängig. Die unten aufgeführten Angaben der Trächtigkeitstage stellen nur Richtwerte dar, und die Grenzen verlaufen fliessend. Es kann zu jedem Zeitpunkt der Trächtigkeit, am wahrscheinlichsten jedoch in der frühen Gestationsphase, zum Abort des Fetus kommen (NETTLETON et al., 1998).

a) Infektion vor dem 60. Trächtigkeitstag

Bei einer Infektion vor Entwicklung der fetalen Immunabwehr kann sich das Virus ungehindert replizieren und es befällt Haut, Gehirn und innere Organe. Dies führt in bis zu 50 % der Fälle zum Tod und zur anschliessenden Resorption oder zum Frühabortal der Frucht (NETTLETON und ENTRICAN, 1995; BOSTEDT und DEDIÉ, 1996; NETTLETON et al., 1998).

b) Infektion zwischen dem 60. und 70. Trächtigkeitstag

Wenn der Fetus eine Infektion trotz nicht entwickeltem Immunsystem überlebt, wird er gegenüber dem Virus tolerant. Dieses repliziert und verteilt sich in allen Organen und infiziert so den Fetus persistent. Persistent infizierte Lämmer sind bei der Geburt meist klein und schwach, manchmal könne sie nicht aufstehen. Typisch sind neurologische Symptome und Vliesveränderungen („hairy shaker“) sowie Missbildungen der langen Röhrenknochen und des Schädelns (SAWYER, 1992). Eine Hypomyelinisation im ZNS führt zu Nachhandataxie und Tremor (NETTLETON, 1990; NETTLETON und ENTRICAN, 1995; RADOSTITS et al., 2007b). Der Tremor reicht von feinem Zittern des Kopfes, der Ohren und des Schwanzes bis hin zu tonisch-klonischen Muskelkrämpfen der Hintergliedmassen, des Beckenbereichs, des Kopfes und des Nackens (NETTLETON et al., 1998). Infolge einer Vergrösserung der primären Haarfollikel entstehen Vliesveränderungen, welche am besten bei feinwolligen Rassen zu sehen sind. Das Vlies erscheint rauhwollig, ist weniger gekräuselt und hat vor allem an Kopf und Nacken überstehende Wollhaare (SAWYER, 1992; NETTLETON et al., 1998).

Manche Lämmer weisen eine abnorme Pigmentierung auf. Als zugrunde liegende Ursache für die defiziente Myelinisierung und das retardierte Wachstum wird eine verminderte Aktivität der Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ diskutiert (SAWYER, 1992; RADOSTITS et al., 2007b). Es muss aber bedacht werden, dass pi-Lämmer auch klinisch unauffällig sein können. Die pi-Tiere besitzen oft eine verminderte zellmedierte Immunität und sind daher empfänglicher für jegliche Art von Erkrankung. Dies wird auch als Grund dafür angesehen, dass die Tiere meist vor Erreichen der Geschlechtsreife sterben (BOSTEDT und DEDIÉ, 1996; RADOSTITS et al., 2007b; NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008). Persistent infizierte Schafböcke können infolge qualitativ schlechten Spermias eine verminderte Fruchtbarkeit aufweisen und scheiden über das Sperma meist sehr viele Viren aus (GARDINER und BARLOW, 1981; NETTLETON et al., 1998).

c) Infektion zwischen dem 60. und 85. Trächtigkeitstag

Bei einer Infektion in diesem Stadium kann es zu einer Reaktion des Immunsystems gegen das Virus kommen. Infolge der einsetzenden Antikörperbildung können schwerwiegende immunmedierte Missbildungen im ZNS auftreten (NETTLETON et al., 1998; NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008).

d) Infektion nach dem 85. Trächtigkeitstag

Bei einer Infektion nach dem 85. Trächtigkeitstag entwickelt der Fetus eine normale, nicht überschiessende Immunantwort, welche das Virus eliminiert. Der Fetus wird ohne klinische Anzeichen der Border-Disease lebend geboren. Das Blut enthält post partum reichlich Antikörper, aber kein Virus (NETTLETON et al., 1998; NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008).

Late-onset disease bei persistent infizierten Schafen

Wenn persistent infizierte Schafe plötzlich Symptome wie unstillbaren Durchfall, Kümmern, Augen- und Nasenausfluss sowie Atemnot entwickeln, handelt es sich wahrscheinlich um eine late-onset disease (NETTLETON et al., 1998). Die Symptomatik ähnelt derjenigen der durch das zytopathogene BVDV ausgelösten bovinen Mucosal Disease (MD) (NETTLETON, 1990; NETTLETON und WILLOUGHBY, 2008). Diese wird bei einem persistent mit nicht zytopathogenem BVDV infizierten Rind durch ein zweites zytopathogenes BVD-Virus ausgelöst und man unterscheidet ein early- und late-onset MD. Nach experimenteller Infektion von persistent mit ncp BVDV infizierten Rindern mit einem cp BVD-Virus konnte bei einem Teil der Tiere bereits 1-2 Wochen (early-onset) und beim anderen Teil erst nach einigen Monaten (late-onset) Symptome der Mucosal Disease beobachtet werden (FRITZEMEIER et al., 1997). Aufgrund der Ergebnisse wurde vermutet, dass das cp-Virus bei der early-onset MD durch Mutation des ncp-Virus aus dem eigenen Viruspool entsteht oder aber das cp-Virus durch Superinfektion in das pi-Tier gelangt. Demgegenüber sind für die late-onset MD Rekombinationsvorgänge zwischen dem ncp-Virus des pi-Tiers und dem superinfiziernden cp-Virus notwendig (FRITZEMEIER et al., 1997). Die Vorgänge, die zur MD-ähnlichen Erkrankung bei pi-BDV Schafen führen, sind noch nicht genauer bekannt. In der Schweiz wurde bisher nur ein Fall bei einem persistent mit BDV-3 infizierten Schaf beschrieben, welches entzündliche Schleimhautveränderungen an verschiedenen Lokalisationen aufwies (HILBE et al., 2009).

4.4.2. Ziege

Bei Ziegen konnte in experimentellen Infektionsversuchen mit BVDV (DEPNER et al., 1991; BROADDUS et al., 2007, 2009; BACHOFEN et al., 2013) und BDV (LØKEN und BJERKÅS, 1991; REICHERT, 2009) eine relativ hohe Anfälligkeit für Pestiviren gezeigt werden. Im Gegensatz dazu sind aber

Berichte über natürliche Infektionen weniger häufig (PRATELLI et al., 2001; STALDER et al., 2005; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2006; DANUSER et al., 2009; BACHOFEN et al., 2013). LØKEN et al. (1982) beschrieben ein Ziegenkitz, das aufgrund einer natürlichen Infektion an Border-Disease erkrankt war und auch Symptome der Erkrankung zeigte. Dazu gehörten neben starkem Tremor auch erschwertes Aufstehen und Gehen. Grösse, Form und Haarkleid des Tieres waren unauffällig. Beim betroffenen Tier sowie bei weiteren 43 % der Herde wurden im Serum BDV-neutralisierende Antikörper nachgewiesen. Infektionsversuche mit BVDV und BDV zeigten, dass die typischen Border-Disease-Symptome bei lebensschwach geborenen Zicklein meist fehlen, während bei Mutterziegen Fruchtbarkeitsstörungen überwiegen (DEPNER et al., 1991; LØKEN und BJERKÅS, 1991; LØKEN et al., 1991; BROADDUS et al., 2009; BACHOFEN et al., 2013). LØKEN und BJERKÅS (1991) infizierten 50 Ziegen in verschiedenen Trächtigkeitsstadien intramuskulär entweder mit einem nicht zytopathogenen ovinen oder einem zytopathogenen bovinen Pestivirus. Alle Tiere bildeten innerhalb von 5 Wochen neutralisierende Antikörper. Die Folgen unterschieden sich zwischen den zwei Virustypen kaum. Analog zu den Schafen waren auch hier die Folgen für die Trächtigkeit umso gravierender, je früher die Infektion stattfand. Bei vier lebenden Nachkommen konnte eine persistente Infektion nachgewiesen werden. Drei erschienen klinisch gesund und eines zeigte Tremor. Es handelte sich bei drei der vier Tiere um eine Infektion mit BDV und bei einem Tier um eine Infektion mit BVDV. Von den 17 Ziegen, die um den 40. Tag infiziert wurden, gebar keine ein gesundes Zicklein. Sieben abortierten, drei beherbergten im Uterus mumifizierte Feten, vier erwiesen sich als nicht trächtig und drei gebaren tote oder lebensschwache Jungtiere. Von den 18 Ziegen, die um den 60. Tag infiziert wurden, gebaren zwei gesunde Nachkommen. 12 Ziegen brachten tote oder lebensschwache Jungtiere zur Welt, von denen eines ataktisch war und sieben Tremor aufwiesen. Zwei Ziegen abortierten, eine blieb leer und eine hatte einen kleinen, sich in Auflösung befindenden

Fetus im Uterus. Von den 15 Ziegen, die um den 100. Tag infiziert wurden, bekamen 11 gesunde Nachkommen, nur eine Ziege abortierte und drei Ziegen gebaren tote oder lebensschwache Jungtiere. Ähnliche Ergebnisse ergab ein Versuch mit 25 Ziegen nach Inokulation von BVDV vor bzw. nach dem 78. Trächtigkeitstag (DEPNER et al., 1991) bzw. zwei Versuche mit trächtigen Ziegen, welche mit persistent BVDV infizierten Rindern zusammengehalten wurden (BROADDUS et al., 2009; BACHOFEN et al., 2013).

4.4.3. Rind

Bis heute existieren nur wenige Berichte über Erkrankungen beim Rind durch Border-Disease-Viren. Hingegen konnte das BD-Virus beim Rind schon von mehreren Autorengruppen isoliert werden (BECHER et al., 1997; CRANWELL et al., 2007; HORNBERG et al., 2009; STRONG et al., 2010; McFADDEN et al., 2012). BECHER et al. (1997) identifizierten Ende der 60er Jahre ein bei einem australischen Rind isoliertes Virus anhand molekulargenetischer Untersuchungen als Border-Disease-Virus. CRANWELL et al. (2007) berichteten von drei Rindern in Grossbritannien, welche nachweislich mit dem Border-Disease-Virus infiziert waren. Ein 13 Monate altes Rind zeigte Kümmern und Durchfall, ein weiteres, 2.5 Jahre altes Rind wies Symptome der Mucosal Disease auf und das dritte, ein lebensschwaches Kalb, starb kurz nach der Geburt. Anhand einer TaqMan-RT-PCR wurden die Virusisolale als BDV identifiziert. Im Fall des Kalbes wurde das BDV zudem in Thymus und Hirn nachgewiesen und eine persistente Infektion bestätigt. Bei allen drei Fällen erschien die Klinik ähnlich wie bei einer BVDV-Infektion. Kürzlich wurde in Neuseeland (McFADDEN et al., 2012) ein 3-jähriger Galloway-Stier aufgrund sehr schlechter Fruchtbarkeitsleistungen untersucht. Der Stier war für sein Alter eher klein, und es fehlte das typisch männliche Charakteristikum des ausgeprägten Halses. Zusätzlich betrug der Hodenumfang nur 22 cm; dieser sollte laut den Autoren ab einem Alter von 24 Monaten mindestens 34 cm betragen. Ein BVDV-Antigen-ELISA war posi-

tiv, der entsprechende BVDV-Antikörper-ELISA war wie erwartet negativ. Ein Monat danach wurden die Tests wiederholt und sie ergaben dieselben Resultate. Eine daraufhin durchgeführte PCR war positiv für BDV und negativ für BVDV. Der Stier wurde darauf geschlachtet und in Milz, Hoden und lymphatischem Gewebe konnte BDV, nicht jedoch BVDV, nachgewiesen werden.

4.5. Pathologisch-anatomische Befunde bei Border-Disease

Die bei mit Border-Disease-Virus persistent infizierten Schafen typischen pathologisch-anatomischen Befunde wurden in der Dissertation von REICHERT (2009) ausführlich beschrieben. Zusätzlich wurden bei der histologischen Untersuchung der Hoden eines persistent mit BDV infizierten Galloway-Stiers eine hochgradige, chronische, testikuläre Degeneration und Atrophie gefunden (McFADDEN et al., 2012). Beide Hoden waren diffus degeneriert. Die Samenkanälchen waren nur teilweise zu erkennen und sie enthielten nur eine geringe Zahl Spermatiden. Eine aktive Spermatogenese war nicht zu sehen.

4.6. Epidemiologie der Border-Disease

Das weltweite Vorkommen und die Verbreitung der Border-Disease wurden in den Dissertationen von BÜCHI (2009) und SCHENK (2012) ausführlich beschrieben.

5. TIERE, MATERIAL UND METHODIK

5.1. Tiergruppen

Für die Untersuchungen wurden ein persistent mit Border-Disease-Virus infiziertes männliches Rind (zuerst war es ein Kalb, später ein Jungtier) und die zwei Tiergruppen A und B verwendet. Die Gruppe A bestand aus sechs seronegativen Rindern. Diese wurden besamt und während der Frühträchtigkeit mit dem pi-BDV-Kalb zusammen gehalten. Das Ziel war es, abzuklären, ob es durch den Kontakt zu einer Virusübertragung kommt. Die Gruppe B bestand aus sechs seronegativen Kühen. Fünf der Kühe wurden mit Sperma des pi-BDV-Jungstiers besamt. Eine Kuh diente als Kontrolle und wurde nicht besamt. Das Ziel dieser Untersuchung war es, abzuklären, ob es durch die Insemination mit virushaltigem Sperma zu einer Virusübertragung kommt.

5.1.1. pi-BDV-Rind

Beim persistent mit Border-Disease-Virus infizierten Rind handelte es sich um ein männliches Tier, das am 15. September 2011 geboren und im Alter von 41 Tagen ans Tierspital gebracht wurde. Die Mutter war eine Braunviehkuh, der Vater ein Limousinstier. Das Kalb war im Zuge des BVDV-Eradikationsprogramms in der Schweiz in der Ohrstanzprobe mittels Antigen-ELISA positiv auf Pestiviren getestet worden. Die Nachuntersuchung einer Blutprobe mittels RT-PCR erbrachte das gleiche Ergebnis, so dass das Tier definitiv als persistent virämisch diagnostiziert wurde. Mittels Sequenzierung wurde dabei eine Infektion mit dem Border-Disease-Virus (BDSwiss, R8540/11_ch149) nachgewiesen. Da das Tier zum Zeitpunkt der Diagnose noch nicht euthanasiert worden war, wurde es am 26. Oktober 2011 für weiterführende Untersuchungen im Quarantänestall des Departements für Nutztiere der Universität Zürich eingestallt. Um den Infektionsursprung zu finden, wurden alle Tiere im Ursprungsbetrieb getestet (SCHENK, 2012; BRAUN et al., 2013b). Die Abklärungen im Betrieb ergaben, dass von 24 Rindern und 20 Schafen die Mehrheit

der 12 positiven Rinder (9) und alle positiven Schafe (18) höhere Antikörpertiter gegen BDV als gegen BVDV aufwiesen. Pestivirale RNA war jedoch bei keinem Tier nachzuweisen. Trotzdem wurde davon ausgegangen, dass ein pi-BDV-Schaf zum Zeitpunkt der Trächtigkeit des Muttertiers des pi-BDV-Kalbes auf dem Betrieb gewesen war. Diese Vermutung wurde unterstützt durch das grosse Vorkommen von BDV-Antikörpern in der Schafgruppe dieses Betriebs.

5.1.2. Gruppe A: Kontaktinfektion von frühträchtigen Rindern

Die Gruppe A bestand aus sechs frühträchtigen Rindern, die zum Zeitpunkt der Infektion 382 bis 748 Tage alt waren (506 ± 126 Tage) und aus fünf Betrieben stammten. Drei Tiere gehörten der Fleckviehrasse an und bei zwei Tieren handelte es sich um Gebrauchskreuzungen (Fleckvieh x Braunvieh bzw. Fleckvieh x Gebrauchskreuzung). Alle Tiere waren zum Zeitpunkt des Ankaufs nicht trächtig. Sie wurden während der Akklimatisationsphase brunstsynchronisiert und besamt bzw. mit einem virusfreien Stier (BVD-, BD-, IBR-negativ) gedeckt.

5.1.3. Gruppe B: Besamung von Kühen mit infiziertem Sperma

Die Gruppe B bestand aus sechs nichtträchtigen Braunvieh-Kühen, die zum Zeitpunkt der Infektion 972 bis 1320 Tage alt waren (1102 ± 137 Tage) und aus sechs verschiedenen Betrieben stammten. Die Kühe wurden während der Akklimatisationsphase brunstsynchronisiert; fünf davon wurden darauf mit virushaltigem Sperma des pi-BDV Jungstiers besamt. Eine Kuh diente als Kontrolle und wurde nicht besamt.

5.2. Pestivirusstatus der beiden Tiergruppen A und B

Alle Tiere waren bereits früher mittels Ohrstanze negativ auf Pestivirus-Antigen getestet worden (THÜR et al., 1996; HILBE et al., 2007a). Zudem waren sie vor Beginn der Akklimatisationsphase zweimal im Abstand von 20 (Gruppe A) bzw.

14 Tagen (Gruppe B) mittels ELISA negativ auf das Vorhandensein von Pestivirus-Antikörpern getestet worden.

5.3. Untersuchungsort und -zeitraum

5.3.1. Haltung der Tiere

Die Untersuchungen während der Infektionsphase wurden in einem Rinderstall des Alten Strickhofs der Universität Zürich durchgeführt. Es handelte sich dabei um einen betonierten Anbindestall, welcher mit Gittern zu einem Laufstall umgebaut wurde und Zugang zu einem betonierten Auslauf aufwies. Die Tiere der Gruppe A mussten aufgrund verschiedener Besamungsdaten gestaffelt mit dem pi-BDV-Kalb eingestallt werden. In der Zeit bis zum Eintritt in den Infektionsversuch wurden die Tiere daher separiert in den Stallungen des Tierspitals der Universität Zürich gehalten. Während des Infektionsversuchs wurden die Tiere der Gruppe A über Nacht angebunden, damit allfällige Aborte nicht übersehen wurden. Während des Tages konnten sie sich frei im Laufstall und im Auslauf bewegen. Der Laufstall wurde täglich mit frischem Stroh eingestreut. Die Tiere der Gruppe B wurden in Anbindehaltung gehalten und konnten nur am Nachmittag in den Auslauf. Die Fütterung bestand bei beiden Gruppen aus Heu ad libitum, Kraftfutter und einem Ergänzungsfuttermittel (Totalin®, Werner Stricker AG, Zollikofen, Schweiz). Wasser stand den Tieren über Wassertränken zur freien Verfügung. Die Tiere der Gruppe A hatten zusätzlich freien Zugang zu zwei mineralisierten Salzleckschalen (UFA 999, Zollikofen, Schweiz) im Laufstall.

5.3.2. Untersuchungszeitraum

Die Untersuchungen der Gruppe A fanden zwischen dem 12. Januar und dem 24. Juli 2012, diejenigen der Gruppe B zwischen dem 14. Januar und dem 2. Mai 2013 statt.

5.3.3. Phasen der Untersuchung

Bei beiden Gruppen ging den Untersuchungen in der Infektionsphase eine Akklimatisationsphase voraus.

5.3.3.1. Akklimatisationsphase

Die Akklimatisationsphase diente als Quarantänephase und zur Eingewöhnung, Brunstsynchronisation und Besamung der Tiere. Um diese an das Handling zu gewöhnen, wurden sie während dieser Zeit angebunden gehalten. Die Tiere durften in dieser Quarantänezeit den serologischen Status, der durch serologische Untersuchungen am Anfang und Ende der Akklimatisationsphase überprüft wurde, nicht verändern. Um das Infektionsrisiko zu minimieren, wurden die Rinder räumlich getrennt von anderen Wiederkäuern und vom pi-BDV-Kalb gehalten. Es wurden separate Schutzkleidung und Stiefel getragen, und die Hände wurden vor und nach dem Kontakt mit Seife (Baktolin®) und Propanol (Sterillium®) (beides Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) desinfiziert.

Gruppe A

Die Akklimatisationsphase dauerte bei den Tieren der Gruppe A zwischen 55 und 97 Tagen (78 ± 15 Tage). Vier der sechs Rinder wurden mit einem 5-Tage-Co-Synch-Verfahren (PETERSON et al., 2011) synchronisiert. Dazu erhielten sie am Tag 0 (16 Uhr) 0.1 mg Gonadorelin (Fertagyl®, MSD Animal Health, Luzern, Schweiz) i.m. und ein Progesteronpessar (Eazi-Breed™ CIDR® B, Zoetis Animal Health, Zürich, Schweiz) intravaginal verabreicht. Am Tag 5 (16 Uhr) erfolgte die Entfernung des Pessars und die intramuskuläre Injektion von 7.5 mg Luprostiol (Prosolvin®, Virbac, Glattbrugg, Schweiz) sowie eine erneute intramuskuläre Injektion von 7.5 mg Luprostiol 6 Stunden später. Am Tag 8 (16 Uhr) wurden die Tiere mit 0.1 mg Gonadorelin (Fertagyl®, MSD Animal Health) i.m. behandelt. Danach wurden sie mit Sperma eines Pestivirus-negativen Stiers besamt. Die Besamung musste bei zwei Rindern nach 8 und bei

den anderen zwei Rindern nach 18 Tagen wiederholt werden, da sie wieder brünstig wurden. Zwei der sechs Rinder wurden mit einem Pestvirus-negativen Stier im Natursprung gedeckt. Ein Rind davon musste dazu zuvor mit 7.5 mg Luprostiol (Prosolvon[®], Virbac) i.m. behandelt werden.

Gruppe B

Bei der Gruppe B dauerte die Akklimatisationsphase zwischen 32 und 52 Tagen (48 ± 8 Tage). Der Zyklus der Kuh wurde mit einem modifizierten Co-Synch-Verfahren (KASIMANICKAM et al., 2006) synchronisiert. Dazu erhielten alle Tiere am Tag 0 (16 Uhr) 0.25 mg Gonadorelin (Fertagyl[®], MSD Animal Health) i.m. und ein Progesteronpessar (Eazi-BreedTM CIDR[®] B, Zoetis Animal Health) intravaginal verabreicht. Am Tag 7 (16 Uhr) erfolgte die Entfernung des Pessars und die intramuskuläre Injektion von 15 mg Luprostiol (Prosolvon[®], Virbac) sowie zwei Tage später (Tag 9, 16 Uhr) eine weitere intramuskuläre Injektion von 0.25 mg Gonadorelin. Nach der Brunstsynchronisation wurden fünf Tiere an zwei aufeinander folgenden Tagen dreimal mit Sperma des persistent mit BDV infizierten Tieres besamt. Die erste Besamung erfolgte am Tag 0 (16 Uhr), die zweite und dritte Besamung wurden am Tag 1 (7 Uhr und 16 Uhr) durchgeführt. Für alle Besamungen wurde kryokonserviertes Sperma vom 19. November 2012 verwendet. Dieses Sperma wies von allen untersuchten Spermaproben den höchsten Virustiter auf (Tab. 1).

5.3.3.2. Infektionsphase

Gruppe A

Bei der Gruppe A begann die Infektionsphase am 50. Tag der Trächtigkeit. An diesem als Tag 0 definierten Tag wurden die Tiere mit dem pi-BDV-Kalb zusammen im Laufstall eingestallt. Da bis auf zwei Rinder alle an verschiedenen Tagen besamt worden waren, fand die Zusammenführung mit dem pi-BDV-Kalb gestaffelt statt. Die Rinder, welche noch nicht 50 Tage trächtig waren,

wurden in dieser Zeit strikt separat vom pi-Kalb und den Rindern im Infektionsversuch gehalten. Die gemeinsame Haltung mit dem pi-Tier dauerte 60 Tage, das heisst bis zum 110. Trächtigkeitstag.

Gruppe B

Bei den Kühen der Gruppe B begann die Infektionsphase bei allen gleichzeitig zum Zeitpunkt der ersten künstlichen Besamung mit Sperma des pi-BDV-Jungstiers und dauerte 56 Tage. Die Kontrollkuh wurde zum selben Zeitpunkt in den Infektionsversuch miteingebracht.

5.4. Sperma des pi-BDV-Jungstiers

Die Samengewinnung erfolgte, als der Skrotalumfang des Stiers 28 cm betrug, was als Kriterium für die Geschlechtsreife gewertet wurde (WOLF et al., 1965; LUNSTRA et al., 1978). Da eine Samengewinnung trotz guter Libido und Anwesenheit eines brünstigen Rindes mit der künstlichen Scheide nicht möglich war (*Impotentia coeundi*), wurden während acht Wochen mehrere Ejakulate mittels Elektroejakulation gewonnen. Dazu wurde der Stier in einem Behandlungsstand fixiert, und es wurde eine Epiduralanästhesie mit 0.3 ml Xylazin (0.02 mg/kg Xylazin Streuli®, Uznach, Schweiz) und 1.7 ml Lidocain (0.02 mg/kg Lidocain 2% Streuli®) angelegt. Dann wurden die Samenblase und die Samenleiterampulle transrektal massiert (PALMER, 2005). Danach erfolgte die Samengewinnung mit Hilfe eines Elektroejakulators (Lane Pulsator IV, Lane Manufacturing, Denver, Colorado, USA) und einer Rektalsonde mit 6 cm Durchmesser unter Anwendung des Standardprogramms für Stiere.

Unmittelbar nach der Samengewinnung wurde das Ejakulatvolumen anhand der Graduierung auf dem Auffangröhren bestimmt und der Samen wurde für weitere Untersuchungen bei 37 °C im Wärmebad inkubiert. Die Bestimmung von Spermiedichte, Gesamtspermienzahl und Spermienmotilität erfolgte mittels computerassistierter Spermienanalyse (CASA, Hamilton Thorne IVOS, Version

12, Beverly, Massachusetts, USA). Für die Messungen fanden die Analyse-Einstellungen für Stierensperma gemäss Vorgaben des Geräteherstellers Anwendung, und es wurden standardisierte Messkammern (Standard Count Analysis Chambers SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) verwendet. Für die Beurteilung der Spermienmorphologie wurden 1 bis 2 Tropfen Samen in ein Röhrchen mit 2 ml Phosphat-gepufferter Formalinlösung (HANCOCK, 1957) gegeben. Das fixierte Sperma wurde auf einen Objektträger pipettiert und anschliessend zum Trocknen senkrecht auf ein Löscheblatt gestellt. Die abgetrockneten Ausstriche wurden während 5 Minuten unter fliessendem Wasser gewaschen und anschliessend an der Luft getrocknet. Zur morphologischen Beurteilung wurden die so erhaltenen Ausstriche mit einem kleinen Tropfen Wasser versehen, ein Deckglas darübergelegt und mindestens 200 Spermien bei 1000facher Vergrösserung und Ölimmersion ausgezählt, abweichende Formen protokolliert und der Prozentsatz an normalen Spermien bestimmt.

Von jedem Ejakulat wurde 1 ml Samen für die BDV-Bestimmung verwendet. Die Proben wurden dazu in 10-er Stufen verdünnt und jeweils 6 Dellen einer Zellkulturplatte mit einer Verdünnung beimpft. Das restliche Sperma wurde mit dem Gefriermedium AndroMed® (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) in einem Verhältnis von mindestens 1:2 auf eine Endkonzentration von 80 Millionen Spermien/ml verdünnt. Anschliessend erfolgten das Abkühlen und die Äquilibrierung während 4 bis 5 Stunden bei 4 °C im Kühlraum. Das äquilierte Sperma wurde in 0.5 ml Pailletten abgepackt (MPP Uno, Minitüb), mit einem computergesteuerten Einfriergerät (Micro-Digitcool, IMV Technologies, Saint Ouen Sur Iton, Frankreich) auf -140 °C tiefgefroren und dann in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

5.5. Methodik der Untersuchungen

5.5.1. Klinische Untersuchungen

Gruppe A

Die Rinder wurden vor Beginn und am Ende der Akklimatisationsphase klinisch untersucht. Dazwischen wurden täglich der Allgemeinzustand, das Verhalten, die Fresslust und die Kotbeschaffenheit kontrolliert.

Während der Infektionsphase wurden die Tiere täglich klinisch untersucht. Es wurden der Allgemeinzustand, die Fresslust und der Nährzustand beurteilt sowie das Herz-/Kreislaufsystem, der Atmungs- und Verdauungsapparat untersucht. Zusätzlich wurden die Schleimhäute und die äussere Haut kontrolliert. Die rektale Temperatur wurde täglich morgens und abends gemessen. Aus den am Morgen und am Abend gemessenen rektalen Temperaturen wurden Mittelwerte für jeden Infektionstag und für jedes Tier berechnet.

Gruppe B

Die Kühe wurden vor Beginn und am Ende der Akklimatisationsphase klinisch untersucht. Während der Akklimatisations- und der Infektionsphase wurden täglich der Allgemeinzustand, das Verhalten, die Fresslust und die Kotbeschaffenheit kontrolliert. Zusätzlich wurde während der Infektionsphase täglich die rektale Temperatur gemessen und es wurde zweimal täglich auf Brunstsymptome geachtet.

5.5.2. Trächtigkeitsuntersuchungen

Gruppe A

Die Rinder wurden während der Infektionsphase in 10-tägigen Abständen mittels Ultraschalluntersuchung auf Trächtigkeit untersucht. Zudem wurde täglich auf allfällige Symptome eines Aborts geachtet.

Gruppe B

Nach der künstlichen Besamung am Tag 0 wurde zusätzlich zur täglichen Brunstbeobachtung am Tag 28 nach der letzten Besamung eine Trächtigkeitsuntersuchung mittels Ultraschall durchgeführt.

5.5.3. Entnahme von Blutproben

Gruppe A

Am Tag 0 der Infektionsphase wurden Blutproben zur Untersuchung auf Pestivirus-Antigen und -Antikörper entnommen. Während der Infektionsphase wurden bis zum Tag 20 in zweitägigen Abständen Blutproben für den Pestivirus-Antigennachweis sowie in zehntägigen Abständen bis zum Tag 60 Blutproben für den Pestivirus-Antikörpernachweis entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten aus der Schwanzvene (*V. caudalis mediana*). Die Haut wurde dazu mit einem alkoholgetränkten Tupfer gereinigt und mit Hilfe von Vakuumröhrchen (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) wurden jeweils 9 ml EDTA-Blut und 9 ml Vollblut in Serumröhrchen entnommen. Die 9 ml EDTA-Blut wurden zum Antigennachweis und die 9 ml Serum zum Antikörpernachweis verwendet.

Gruppe B

Am Tag 0 der Infektionsphase wurden Blutproben zur Untersuchung auf Pestivirus-Antikörper entnommen. Während der Infektionsphase wurden bis zum Tag 56 in siebentägigen Abständen Blutproben zum Pestivirus-Antikörpernachweis entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten gleich wie bei der Gruppe A.

5.6. Virologische Blutuntersuchungen

Die Blutproben wurden zur Untersuchung an das Institut für Veterinär-Virologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern geschickt.

5.6.1. Nachweis viraler RNA im Blut

Der Nachweis viraler RNA im EDTA-Blut erfolgte mittels real-time RT-PCR. Jede Probe wurde einzeln untersucht. Für die Untersuchung mittels RT-PCR wurde die RNA vorgängig mit Hilfe des Bio-Robot-Universal-Systems und dem QIAamp-Virus-BioRobot-MDx-Kit, beide von QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Schweiz), aus antikoaguliertem Vollblut isoliert. Die gewonnene RNA wurde daraufhin entsprechend dem Anweisungsprotokoll des Cador-BVDV-RT-PCR-Kits (QIAGEN) mit dem Master-Mix, welcher alle Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und die spezifische Amplifikation beinhaltete, und der internen Kontrolle, die eine Hemmung der RT-PCR durch möglicherweise in der Probe vorhandene Inhibitoren anzeigen, gemischt. Für die Reaktion wurde der Thermocycler ABI 7300 (Applied Biosystems, Rotkreuz, Schweiz) verwendet. Die RNA-Isolation wurde räumlich getrennt von der RT-PCR-Präparation in einem speziell dafür vorgesehenen Labor durchgeführt. Da die im Master-Mix enthaltenen Primer und Proben eine bei Pestiviren konservierte Genom-Sequenz erkennen (sogenannte pan-pesti Primer resp. Probe), konnten diese auch für die Detektion von Border-Disease-Virus verwendet werden. Nach Auswertung der Rohdaten wurde die in der Probe vorhandene virale RNA-Menge in Ct-Werten ausgedrückt, wobei ein Ct-Wert < 45 als positiv bewertet wurde. Proben mit Ct-Werten zwischen 30 und 45 galten als schwach positiv. Proben, welche ein positives Resultat ergaben, wurden nach Abschluss aller initialen Untersuchungen noch einmal getestet, um den Befund zu bestätigen.

5.6.2. Antikörernachweis im Blut

Für die serologische Untersuchung der Rinderseren wurde ein am Institut für Veterinär-Virologie der Vetsuisse-Fakultät Universität Bern entwickelter Antikörper-ELISA („in-house ELISA“) verwendet. Dieser detektiert wie die meisten konventionell erhältlichen Antikörper-ELISAs vor allem Antikörper gegen das immun-dominante Nicht-Strukturprotein NS2-3/NS3, da dieses Protein recht gut konser-

viert ist und daher die humorale Immunantwort nicht sehr stamm-spezifisch ist (M. Schweizer, persönliche Mitteilung). Um die Interassay-Variabilität zu vermeiden und somit den Verlauf des Antikörper-Titers beim jeweiligen Tier abschliessend besser beurteilen zu können, wurden jeweils alle Seren von einem Tier am gleichen Tag auf der gleichen Platte gemessen. Mikrotiterplatten (Maxisorp, A/S Nunc, Kamstrup, Dänemark) wurden dazu kolonnenweise alternierend mit je 100 µl/Delle Virusantigen (mit dem cp BVD-1a Virus R1935/72 infizierte, Tween 20 behandelte Zellkulturen) respektive negativem Kontrollantigen (nicht infizierte Zellkulturen) in einer definierten Verdünnung mit Beschichtungspuffer (0.1 M Natriumcarbonat-Bicarbonat, pH 9.6) beschichtet und während 16 Stunden bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschliessend wurde die beschichtete Platte dreimal mit Waschpuffer (0.5 M NaCl; 0.02 M Tris; 0.005 % Tween 20, pH 8.0) gewaschen. Zur Vorbereitung der Serumproben wurden die Vollblutproben (nicht antikoaguliert) während 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, wodurch sich das Serum vom Blutkoagulum abtrennte und abpipettiert werden konnte. Danach wurden die Seren 1:10 in 1 % Milchpuffer (Bio-Magermilchpulver gelöst in Waschpuffer) verdünnt und in die Platten verteilt (100 µl/Delle). Es folgten eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaliges Waschen der Platten mit Waschpuffer. Um die gebundenen Antikörper der Rinderseren nachzuweisen, wurde an Peroxidase gebundene Ziegen-anti-Rinder IgG (KPL Kirkegaard & Perry Lab, Produkt Nummer 14-12-06, bezogen via BioConcept, Allschwil, Schweiz) in jede Delle pipettiert und während 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden die Platten erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Sichtbarmachung der konjugierten Antikörper wurde die Chromogenlösung ABTS (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) zugegeben und die Färbung mittels eines ELISA-Platten-Lesers gemessen. Dabei wurde die optische Dichte bei $\lambda = 405$ nm bestimmt und als OD-Wert (optical density) in Prozent relativ zum OD-Wert des verwendeten Standardserums angegeben. Relative OD-Werte über 20 % wurden als verdächtig, solche über 30 % als positiv beurteilt.

5.6.3. Serumneutralisationstest (SNT)

Um herauszufinden, gegen welche Spezies von Pestiviren die Antikörper gerichtet waren, wurden von jedem Rind, das im ELISA positiv reagierte, zusätzlich ausgewählte Serumproben in einem Serumneutralisationstest (SNT) analysiert. Dazu wurde das zu untersuchende Serum in 2-er Stufen verdünnt und anschliessend wurde die eine Hälfte des Volumens mit einer festgelegten Menge (100 TCID₅₀/Delle) von BDV (BDSwiss, R8540/11_ch149; siehe auch Kapitel 5.1.1.), die andere Hälfte mit einer solchen von BVDV (R1935/72) gemischt. Die Virus-Serum-Mischungen wurden 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, damit die Antikörper an die Viren binden konnten. Anschliessend wurde jede Verdünnung in 6 Dellen (100 µl/Delle) einer 96-er Mikrotiterplatte verteilt, deren Boden mit embryonalen Kälbernasen-Epithelzellen (EKaNaEp) beschichtet war. Damit wurde überprüft, welches Virus das Serum besser neutralisieren konnte. Danach wurden die Platten während 5 Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und die mit Pestivirus infizierten Zellen (= keine Neutralisation des Virus durch Antikörper) mittels polyklonaler Immunperoxidase (IPO)-Färbung sichtbar gemacht. Der dabei ermittelte neutralisierende Antikörper-Titer wurde als reziproker Wert derjenigen Serum-Verdünnung ausgedrückt, bei welcher die Antikörper in 50 % der infizierten Dellen eine Infektion zu verhindern vermochten (REED und MUENCH, 1938).

Um die aufgrund der genetischen Verwandtschaft von BVDV und BDV auftretenden Kreuzreaktionen nicht in die Ergebnisse miteinzubeziehen (BECHER et al., 2003), wurden nur Rinder, deren Titer gegen BDV mindestens viermal so hoch waren wie diejenigen gegen BVDV, als sicher mit BDV infiziert beurteilt. Titer, die zwar klar höher, aber nicht viermal so hoch waren, wurden als „BDV-Infektion vermutet“ beurteilt. Fälle, bei denen ein Titer nicht mit Sicherheit höher war als der andere oder bei denen eine Titration nicht beurteilbar war, wurden als „nicht differenzierbar“ eingestuft.

5.7. Untersuchungen an Uterus, Plazenta und Fetus in der Gruppe A

5.7.1. Pathologisch-anatomische Untersuchung

Nach der Schlachtung der Rinder der Gruppe A wurden die trächtigen Uteri zur weiteren Untersuchung an das Institut für Veterinärpathologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich verbracht. Die Uteri, Plazenten, Ovarien und Feten wurden makroskopisch untersucht.

5.7.2. Histologische Untersuchung

Die histologische Untersuchung umfasste die Uteri, Plazenten und Ovarien der Versuchsrinder und die Organe der Feten (Dickdarm, Dünndarm, Gehirn, Haut, Herz, Leber, Lunge, Milz, Nabel, Niere, Schilddrüse, Thymus, Vormägen, Zunge). Dazu wurden die Organproben zugeschnitten, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt.

5.7.3. Immunhistochemische Untersuchung

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden bei den Feten Proben von Schilddrüse, Zunge und Haut (Ohr) sowie Proben der Plazentome entnommen. Die Proben von Schilddrüse, Zunge und Haut wurden bei -196 °C in Flüssigstickstoff schockgefroren und danach mithilfe des Kryostats zugeschnitten. Von jedem Organ wurden jeweils drei 5 bis 6 µm dicke Schnitte angefertigt, welche während 10 Minuten in -20 °C kaltem Aceton fixiert wurden. Ab diesem Schritt wurde auch immer eine Positivkontrolle mitgeführt. Um die endogenen Peroxidasen zu blockieren, wurde anschliessend jeder Schnitt mit 100 µl (2 Tropfen) 3 % H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) gelöst in H₂O plus 0.2 % NaN₃ (Natriumazid) behandelt. Nach 10 Minuten Einwirkungszeit bei Raumtemperatur wurden die Schnitte zuerst fünfmal mit H₂O (Leitungswasser) und danach einmal mit PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 8.0) gewaschen. Die Plazentomstücke wurden im Gegensatz zu Schilddrüse, Zunge und Haut in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschliessend zugeschnitten. Es wurden ebenfalls jeweils drei Schnitte angefertigt,

welche entparaffiniert und mittels Proteinase K (DAKO REAL™ S2019, Baar, Schweiz) vorbehandelt wurden. Danach wurden die Schnitte mit Wasserstoffperoxid, wie die Kryostatschnitte, und einem Proteinblock (DAKO Protein Block Serum-Free, Ready-to-use Code X0909) für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Zwischen jedem Schritt wurden sie mit PBS gespült.

Anschliessend erfolgte die Inkubation mit 100 µl (2 Tropfen) primärem Antikörper pro Schnitt (monoklonaler mouse-anti-BVD in PBS, pH 8.0) für 60 Minuten bei 37 °C. Die verwendeten Antikörper C42, CA3 und CA34 (Lösung 1:100; Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz) waren BVDV-spezifisch und wurden daher in einer Mischlösung für den jeweils ersten Schnitt verwendet. Während CA3 und CA34 gegen das Glykoprotein E2 gerichtet waren, band C42 an das Glykoprotein gp48 (E^{rns}). Der zweite Schnitt von Schilddrüse, Zunge und Haut wurde mit dem Pestivirus-spezifischen Antikörper C16 (Lösung 1:100; Labor Dr. Bommeli AG) behandelt. C16 war dabei gegen das Nichtstrukturprotein p125/80 (NS2-3/NS3) gerichtet. Der zweite Schnitt des Plazentoms wurde über Nacht mit dem primären monoklonalen Pestivirus-spezifischen Antikörper 15C5 in einer Verdünnung von 1:10'000 (E. Dubovi, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA) behandelt. 15c5 band an das hochkonservierte Glykoprotein gp48 (E^{rns}). Der dritte Schnitt jeder Probeentnahmestelle wurde als Negativkontrolle mitgeführt und daher nur mit PBS behandelt. Um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte mit PBS gespült. Darauf folgte die Inkubation mit 100 µl sekundärem Antikörper pro Schnitt (EnVision-Peroxidase, Mouse, DAKO K4001) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Wiederum wurden die nicht-gebundenen Antikörper mittels PBS abgespült, bevor die jeweiligen Schnitte zur Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper mit 100 µl des Chromogens AEC (Aminoethyl Carbazole Peroxidase Substrat Kit, DAKO REAL™ K5003) behandelt wurden. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur konnte die Reaktion am Mikroskop kontrolliert werden. Nach einem weiteren PBS-Waschgang wurden die Schnitte mit Glycerin-Gelatine (Kaisers Glyce-

ringelatine, 1.09242.0100, Merck, Zug, Schweiz) eingedeckt und im Lichtmikroskop beurteilt.

5.7.4. Virologische Untersuchung

Zum Nachweis viraler RNA im Fetus und in der Plazenta der geschlachteten Rinder wurden Proben der Haut, des Thymus und des Dünndarms sowie Proben der Plazenta und der Ovarien des Muttertiers bei -20 °C gefroren und zum Pestivirus-Nachweis an das Institut für Veterinär-Virologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern geschickt. Dort wurden die Proben homogenisiert. Haut und Thymus wurden dazu mechanisch mit dem Gewebezerkleinerer (Tissue Lyser, Qiagen) und Dünndarm und Plazenta enzymatisch mit dem QIAamp cador Pathogen Mini Kit gemäss den Angaben des Herstellers (Qiagen) aufgeschlossen. Die dadurch gewonnene Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand wurde zur RNA-Isolation mittels RT-PCR (Qiagen One-Step RT-PCR Kit) gemäss den Anweisungen des Herstellers verwendet. Um die gewünschte 5'-UTR-RNA-Sequenz zu amplifizieren, wurde als Primer das pan-pesti Primer-Paar 324/326 verwendet (VILČEK, 1994). Um die gewonnenen RT-PCR-Produkte zu sequenzieren, mussten diese zuerst in einem 1 % Agarose Gel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente mit Hilfe des QIA-quick PCR Purification Kits (Qiagen) isoliert werden. Eine bestimmte Menge dieser Fragmente (22.5 ng pro 100 Basen) wurde anschliessend in einer Mischung mit Wasser und Primer an Microsynth AG (Balgach, Schweiz) zur Sequenzierung geschickt.

5.8. Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe des Programms Office Excel 2007 (Microsoft Inc.) erfasst. Die kontinuierlichen Daten wurden danach mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics 20 (IBM Schweiz AG, Zürich) deskriptiv analysiert. Die Daten wurden mit dem Wilk-Shapiro-Test auf ihre Normalverteilung überprüft. Die Ergebnisse der zwei Tiergruppen wurden bei normalverteilten Daten als Mittelwerte

± Standardabweichungen angegeben. Bei nicht normalverteilten Daten wurden die Mediane mit Minimal- und Maximalwerten angegeben. Die weiterführenden statistischen Analysen der Antikörpertiter (OD-Werte) wurden mit dem Programm Stata durchgeführt (StataCorp., 2011, Stata Statistical Software, Texas, USA). Um signifikante Veränderungen der Variable OD-Wert im Zusammenhang mit dem Tag nach der Infektion und dem Vorkommen eines pi-Fetus zu prüfen, wurden ein t-Test, ein generalisiertes lineares Modell und eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Das zugrundeliegende Stata Modell lautete für den t-Test <by Probe_d_, sort : ttest OD_Wert, by (pi_Fetus2)>, für das generalisierte lineare Modell <xtrmixed OD_Wert pi_Fetus2##Probe_d_ || Probe_d:> und für die ANOVA <OD_Wert Probe c.pi_Fetus, repeated (Probe) bse (Tier)>. Grundsätzlich wurden P-Werte ≤ 0.05 als signifikant angesehen.

5.9. Zusammenarbeit mit anderen Instituten

Am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit waren ausser der Klinik für Wiederkäuer der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun) die folgenden Institute und Abteilungen der Vetsuisse-Fakultäten Zürich und Bern beteiligt:

- Institut für Veterinär-Virologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern (Prof. Dr. R. Zanoni): Organisation der Durchführung der virologischen und serologischen Untersuchungen durch Herrn PD Dr. M. Schweizer und die Mitarbeiterinnen des Labors.
- Institut für Veterinärpathologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. A. Pospischil): Durchführung der Sektionen, der histologischen und der immunhistochemischen Untersuchungen durch Frau Dr. M. Hilbe und die Mitarbeiterinnen des Labors.
- Klinik für Reproduktionsmedizin der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. H. Bollwein): Durchführung der andrologischen und gynäkologischen

Eingriffe durch Herrn Prof. Dr. F. Janett und der entsprechenden Untersuchungen durch Herrn Prof. Dr. F. Janett und die Mitarbeiter des Labors.

- Abteilung für Ambulanz und Bestandesmedizin der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. M. Hässig): Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse durch Herrn Prof. Dr. M. Hässig.

5.10. Tierversuchsbewilligung

Für die Versuche lag eine Tierversuchsbewilligung des Kantonalen Veterinäramts Zürich vor. Sie war unter der Nummer 31/2012 registriert und für die Zeit vom 28.3.2012 bis 28.4.2014 gültig.

6. Ergebnisse

6.1. pi-BDV-Rind

Das männliche pi-BDV-Rind wurde im Alter von 41 Tagen im Quarantänestall des Tierspitals der Universität Zürich eingestallt. Im Alter von 195 Tagen wurde das Tier mit dem ersten Rind der Gruppe A zusammen im Versuchslaufstall eingestallt und dort bis zum Abschluss der Versuchsreihe, das heisst bis zum Alter von 311 Tagen, gehalten. Das pi-BDV-Rind war während der gesamten Versuchsdauer in der Gruppe A klinisch gesund und fieberfrei. Es fiel jedoch auf, dass es nur langsam wuchs und die Geschlechtsreife erst mit knapp 400 Tagen erreichte. Im Alter von 392 Tagen betrug der Skrotalumfang 28 cm, was als Kriterium für die Geschlechtsreife gewertet wurde (WOLF et al., 1965; LUNSTRA et al., 1978). Normalerweise erreichen Jungtiere der Braunviehrasse diesen Skrotalumfang bereits im Alter von 264 ± 9 Tagen und solche der Angusrasse im Alter von 295 ± 9 Tagen (LUNSTRA et al., 1978). Bis zum Alter von 451 Tagen erreichte der Skrotalumfang 30 cm. Diese Grösse entsprach demjenigen eines 300 Tage alten Braunvieh-Stiers bzw. eines 330 Tage alten Angus-Stiers (LUNSTRA et al., 1978). Spezifische Daten zur Limousinrasse liegen keine vor. Bei Erreichen der Geschlechtsreife mit 392 Tagen wies der pi-BDV-Jungtier zwar eine gute Libido auf, er konnte aber den Penis nicht komplett erigieren (*Impotentia coeundi*). Die Spermagewinnung, welche an 9 verschiedenen Tagen erfolgte, musste mittels Elektroejakulation durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Spermaanalyse, insbesondere auch die Virustiter des Spermias, sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Ejakulatanalyse und Virusgehalt des Spermias des persistent mit BDV infizierten Stiers im Alter von 392 bis 451 Tagen (12. Oktober bis 10. Dezember 2012)

Ejakulat (Datum)	Volumen (ml)	Spermien- dichte ($\times 10^6$ /ml)	Gesamtsper- mienzahl ($\times 10^6$)	Motilität (%)	Normale Spermien (%)	Virustiter (TCID ₅₀ /ml)	Virustiter (TCID ₅₀ / 10^6 Spermien)
12.10.12	7.0	220.1	1414.6	7	5.0	3.98×10^7	1.81×10^5
22.10.12	3.0	168.0	504.0	21	9.4	3.16×10^7	1.88×10^5
29.10.12	5.6	246.2	1373.7	24	10.4	2.51×10^7	1.02×10^5
08.11.12	5.4	140.9	760.9	30	12.4	1.78×10^7	1.26×10^5
12.11.12	10.0	185.3	1852.5	16	NU	5.62×10^7	3.04×10^5
19.11.12	8.3	173.8	1442.2	23	10.3	2.51×10^8	1.44×10^6
26.11.12	6.0	176.4	1058.6	44	13.0	1.00×10^7	5.68×10^4
04.12.12	9.3	92.7	862.5	18	NU	5.62×10^6	6.05×10^4
10.12.12	6.8	27.8	392.9	22	NU	2.31×10^7	3.98×10^5

NU: Nicht untersucht

6.2. Kontaktinfektion von frühträchtigen Rindern (Gruppe A)

6.2.1. Klinische Befunde bei den Rindern der Gruppe A

Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand

Der Allgemeinzustand und die Fresslust der Rinder waren mit Ausnahme der Woche 4 nach Beginn der Infektionsversuche ungestört. In der Woche 4 erkrankten, kurz nach Einstallung des Rindes 4 in den Laufstall, vier Rinder (1 bis 4) an einer fieberhaften Bronchopneumonie. Alle vier Tiere erkrankten unabhängig von der Länge der bis dahin andauernden Infektionsphase. Die Rinder 5 und 6 waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht im Infektionsversuch. Der Nährzustand war stets gut.

Rektale Temperatur

Während der Akklimatisationsphase lag die rektale Temperatur zwischen 37.6 und 40.0 °C (Median = 38.5 °C). Das Rind 1 wies an einem Tag eine Temperatur von 40.0 °C auf. Der Allgemeinzustand und die Fresslust waren aber gut, und bei der Messung am folgenden Tag lag die Temperatur wieder im Normalbereich. Während der Infektionsphase lag die mittlere rektale Temperatur zwischen 37.9 und 40.1 °C (Median = 38.5 °C; Abb. 2). Das Rind 1 wies an den Tagen 14, 29 und 30 nach Eintritt in den Infektionsversuch Temperaturen zwischen 39.1 und 39.5 °C auf. Das Rind 2 wies am Tag 22 eine Temperatur von 40.3 °C und das Rind 4 an den Tagen 6, 7, 10 und 60 Temperaturen zwischen 39.1 und 39.4 °C auf. Bis auf die Temperaturanstiege beim Rind 1 am Tag 14 und beim Rind 4 am Tag 60 traten alle Temperaturanstiege in der vierten Woche nach Beginn des Infektionsversuchs auf. Das Rind 4 war eine Woche vor dem Auftreten der ersten Temperaturanstiege in die Gruppe integriert worden.

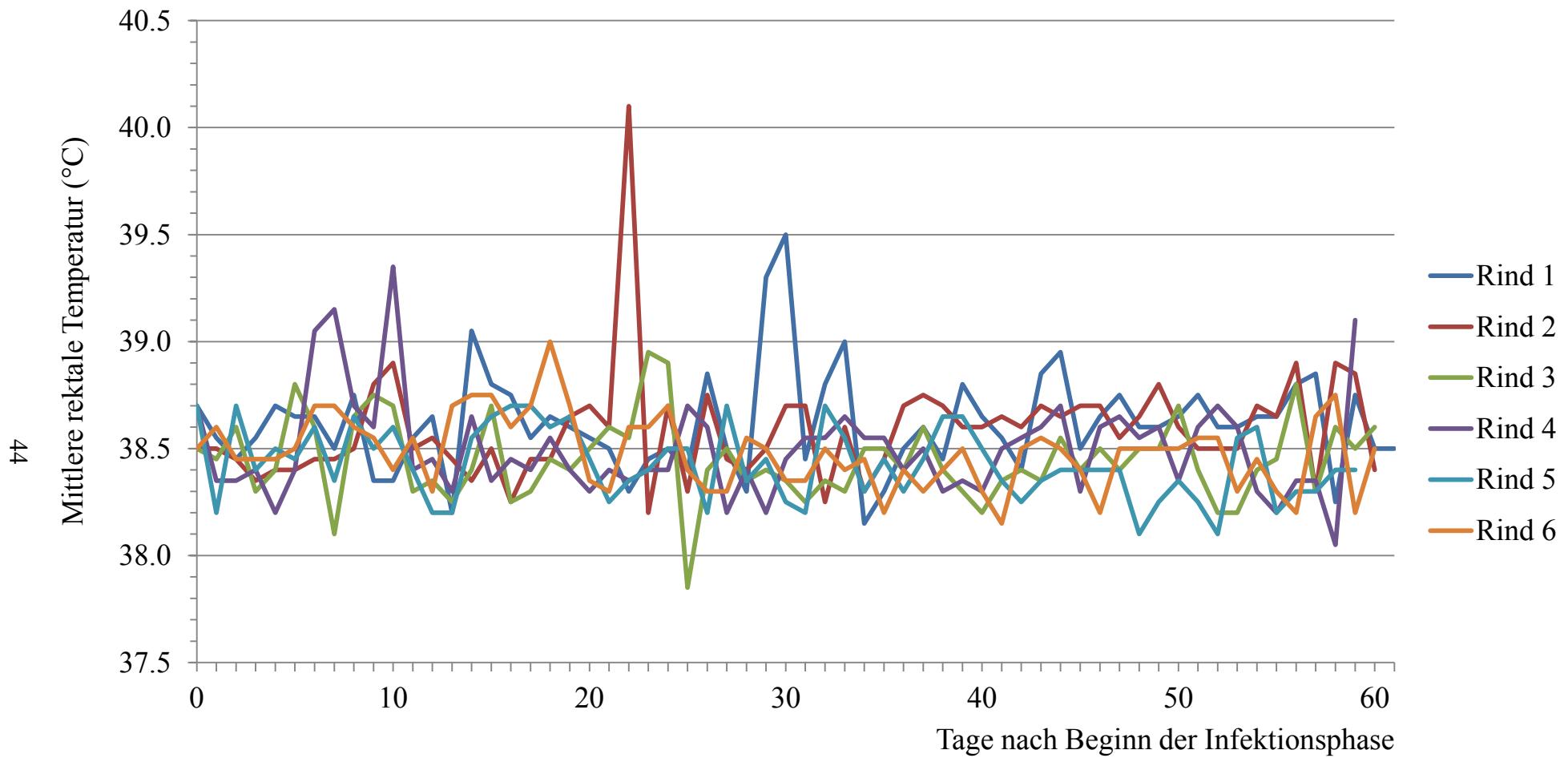


Abb. 2: Verlauf der rektalen Temperatur bei den 6 Rindern während der 60-tägigen Infektionsphase

Herz- und Kreislaufsystem

Die Herzfrequenz lag während der gesamten Infektionszeit zwischen 60 und 108 Schlägen pro Minute (Median = 76 Schläge pro Minute). Das Herz- und Kreislaufsystem aller Rinder wies während der Infektionsphase keine Auffälligkeiten auf.

Atemapparat

Die Atemfrequenz lag während der gesamten Infektionszeit zwischen 20 und 52 Atemzügen pro Minute (Median = 28 Atemzüge pro Minute). Der Atemtyp war stets kostoabdominal mit Ausnahme von Rind 2 an den Tagen 22, 23 und 24, Rind 3 am Tag 24 und Rind 4 an den Tagen 7, 8, 16, 20 und 30 nach Beginn der Infektionsphase. Die Auskultation der Lunge ergab bei 4 Rindern die folgenden abnormen Befunde:

- Rind 1: Verschärftes Vesikuläratmen an den Tagen 31 und 33
- Rind 2: Verschärftes Vesikuläratmen und teilweise Giemen an den Tagen 22 bis 32
- Rind 3: Verschärftes Vesikuläratmen an den Tagen 25 bis 30, leichtgradiges Gießen am Tag 27
- Rind 4: Verschärftes Vesikuläratmen an den Tagen 7 bis 17
- Die Rinder 5 und 6 zeigten während der gesamten Infektionsphase eine unauffällige Lungenauskultation. Zudem husteten die Rinder 1 und 4 an den Tagen mit abnormalen Auskultationsbefunden. Während der Husten bei den Rindern 1 bis 3 wieder verschwand, blieb er beim Rind 4 bis zur Schlachtung bestehen.

Veränderungen an den Schleimhäuten und Tränenfluss

Die Schleimhäute von Maulhöhle und Vestibulum vaginae waren stets rosafarben, feucht und glänzend. Während der gesamten Infektionsphase konnten keine Rötungen oder Erosionen beobachtet werden. Bei den Rindern 5 und 6 wurde in un-

regelmässigen Abständen seröser Tränenfluss gesehen, der jeweils spontan wieder verschwand.

Gastrointestinaltrakt

Die Pansen- und Darmmotorik war bei allen Rindern stets ungestört. Der Kot aller Tiere wies während der gesamten Infektionszeit eine normale Beschaffenheit auf, wobei diese zwischen dünn- und dickbreiig variierte.

Haut

An der Haut konnten während der gesamten Infektionsphase keine abnormen Befunde festgestellt werden.

Trächtigkeitsuntersuchungen

Die Rinder zeigten nie unüblichen Vaginalausfluss oder Symptome eines Abortgeschehens. Bei allen Rindern konnten die Trächtigkeiten bei jeder Untersuchung bestätigt und der Herzschlag des Fetus mittels Ultraschall dargestellt werden.

6.2.2. Virologische Blutuntersuchungen bei den Rindern der Gruppe A

Virusnachweis

Die Erstuntersuchung der Blutproben in den ersten 20 Tagen nach Beginn der Infektionsphase ergab bei drei Rindern (3, 4, 5) schwach positive, für einen Virusnachweis sprechende Ct-Werte (Tab. 2): Beim Rind 3 wurde bei der Erstuntersuchung am Tag 10 pestivirale RNA mit einem schwachen Ct-Wert von 40.7 nachgewiesen. Bei der nochmaligen Untersuchung (Nachuntersuchung) der gleichen Blutprobe war das Ergebnis negativ. Beim Rind 4 wurde am Tag 8 pestivirale RNA mit einem Ct-Wert von 37.8 nachgewiesen. Bei der Nachuntersuchung war der Ct-Wert mit 39.7 geringgradig höher. Die Sequenzierung ergab aber keine verwertbaren Resultate. Beim Rind 5 war das Ergebnis an vier aufeinanderfolgenden Untersuchungen (Tage 8, 10, 12, 14) positiv. Die Ct-Ergebnisse lagen mit

Werten zwischen 39.6 und 42.5 im leicht positiven Bereich. Die Nachuntersuchungen von den Tagen 8, 12 und 14 waren negativ, diejenige vom Tag 10 war mit einem Ct-Wert von 41.7 erneut positiv.

Serologische Untersuchung (ELISA)

Bis zum 10. Tag nach Infektionsbeginn waren alle Rinder seronegativ (Abb. 3). Zwischen den Tagen 11 und 19 stiegen die OD-Werte der Rinder 4, 5 und 6 langsam an, während diejenigen der Rinder 1, 2 und 3 erst ab dem Tag 20 zunahmen. Am Tag 20 wiesen die Rinder 4 und 5 einen für eine Serokonversion sprechenden OD-Wert von 35 bzw. 30 % auf. Bis zum Tag 30 hatten auch die Rinder 1 und 6 und bis zum Tag 40 die Rinder 2 und 3 serokonvertiert (OD-Werte 39, 71, 61, 104 %). Bei allen Rindern stiegen die OD-Werte bis zum Tag 60 weiter an. Die höchsten OD-Werte wurden an diesem Tag bei den Rindern 3, 4 und 5 mit 274, 182 und 216 % gemessen (Tab. 3). Bei den Rindern 1, 2 und 6 lagen die OD-Werte am Tag 60 bei 119, 89 und 110 %.

Tab. 2: Nachweis von viraler RNA aus EDTA-Blut von 6 Rindern der Gruppe A während der Infektionsphase

Tag	Probe	Rind 1	Rind 2	Rind 3	Rind 4	Rind 5	Rind 6
0	Erstuntersuchung						
	Nachuntersuchung						
2	Erstuntersuchung						
	Nachuntersuchung						
4	Erstuntersuchung						
	Nachuntersuchung						
6	Erstuntersuchung						
	Nachuntersuchung						
8	Erstuntersuchung				37.8	40.6	
	Nachuntersuchung				39.7		
10	Erstuntersuchung			40.7		39.6	
	Nachuntersuchung					41.7	
12	Erstuntersuchung					42.5	
	Nachuntersuchung						
14	Erstuntersuchung					40.8	
	Nachuntersuchung						
16	Erstuntersuchung						
	Nachuntersuchung						
18	Erstuntersuchung						
	Nachuntersuchung						
20	Erstuntersuchung						
	Nachuntersuchung						

Hellgraue Felder: Kein Nachweis von viraler RNA

Dunkelgraue Felder: Positiver Nachweis von viraler RNA + Ct-Wert

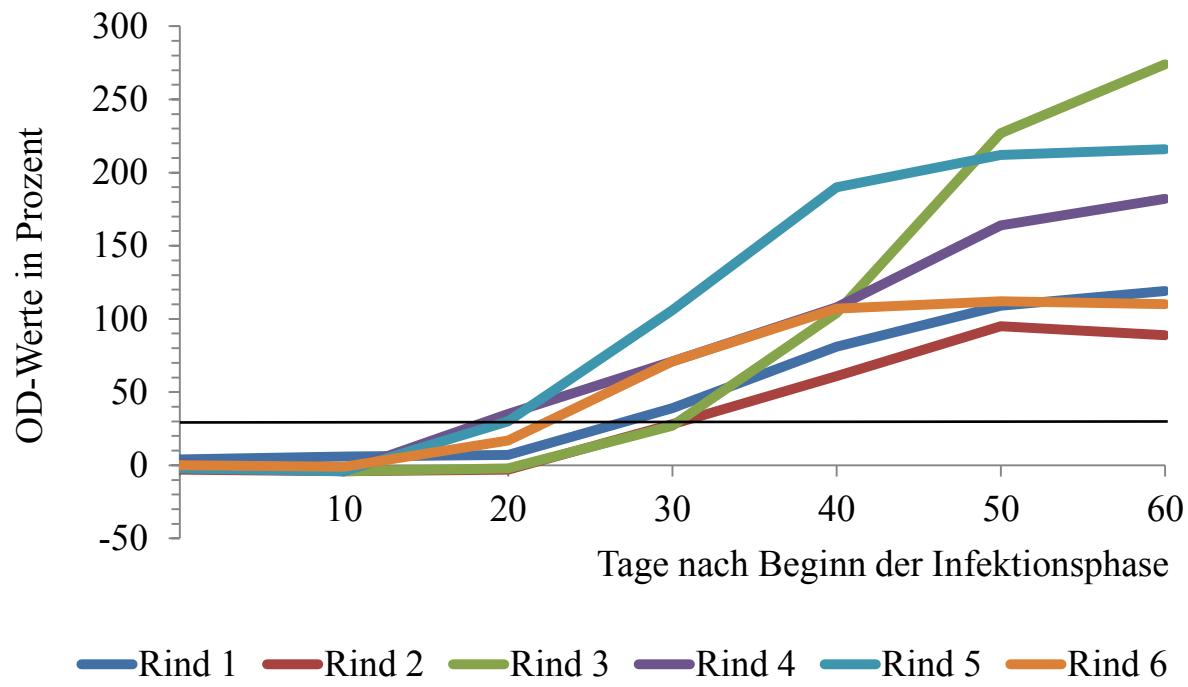


Abb. 3: Verlauf der OD-Werte in Prozent bei 6 Rindern der Gruppe A an den Tagen 0 bis 60 der Infektionsphase. OD-Werte über 30 % (schwarze Linie) gelten als positiv

Serumneutralisationstest

Der am Tag 60 nach Beginn der Infektionsphase durchgeführte Serumneutralisationstest (SNT) war in Bezug auf BDV positiv, da alle Tiere hohe Werte an spezifischen, neutralisierenden Antikörpern aufwiesen (Tab. 3). Die Titer variierten zwischen 152 und > 512. In Bezug auf BVDV war der SNT bei zwei Rindern (1 und 2) negativ, während die restlichen vier Rinder nur sehr geringe Antikörpermengen gegen das BVD-Virus auf. Bei allen sechs Rindern lag der Quotient BDV- zu BVDV-Antikörper-Titer über 4, was für eine Antikörperbildung aufgrund einer Infektion mit BDV sprach.

Tab. 3: OD-Werte, SNT-Titer und Quotienten der BDV-/BVDV-SNT-Titer der 6 Rinder der Gruppe A

Rind	OD-Wert (%)	SNT BDV	SNT BVDV	Quotient BDV-/BVDV-Titer*
1	119	152	Negativ*	≥ 38
2	89	215	Negativ	≥ 53
3	274	304	8	38
4	182	431	27	16
5	216	> 512	16	> 32
6	110	> 512	8	> 64

* Detektionsgrenze SNT ≤ 4

6.2.3. Untersuchungen an Uterus, Plazenta und Fetus in der Gruppe A

Pathologisch-anatomische Untersuchung

Alle Rinder wiesen makroskopisch unauffällige Uteri, Plazenten und Feten auf. Die Gewichte der Feten lagen zwischen 533 und 700 g (582.2 ± 62.26 g) und die Scheitelsteissbeinlängen variierten zwischen 19 und 24 cm (20.8 ± 2.48 cm).

Histologische Untersuchung der fetalen Organe

Die histologische Untersuchung der fetalen Organe war bei allen sechs Feten unauffällig. Bei den Rindern 3, 4 und 5 wurden jedoch in den Plazentomen Entzündungszellen (Plasmazellen, Lymphozyten) und Anzeichen von Fibrose, bei den Rindern 4 und 5 auch nekrotische Veränderungen nachgewiesen (Tab. 4).

Immunhistochemische Untersuchung

Bei der immunhistochemischen Untersuchung mittels Pestivirus-spezifischen Antikörpern (C16, 15C5) reagierten die Proben der fetalen Organe und Plazentome der Rinder 3, 4 und 5 immer positiv (Tab. 4), während die Untersuchung mit

BVDV-spezifischen Antikörpern (C42, CA3, CA34) immer negativ war. Auffällig war, dass Pestivirus-spezifische Antikörper in den Plazentomen vorwiegend in deren fetalnen Zellen gebunden wurden (also Pestivirus vorhanden war), während in den maternalen Zellen kaum Antigen nachgewiesen werden konnte (Abb. 4). Die Proben der Rinder 1, 2 und 6 ergaben sowohl mit Pestivirus- als auch mit BVDV-spezifischen Antikörpern negative Resultate.

Virologische Untersuchung

In den untersuchten Proben der fetalnen Organe und der Plazentome der Rinder 3, 4 und 5 wurden mit Hilfe der RT-PCR pestivirale RNA-Sequenzen nachgewiesen (Tab. 4). Die Sequenzen der 5'-UTR entsprachen bei den Rindern 3 und 5 zu 100 % der beim pi-BDV-Kalb isolierten Sequenz. Die beim Rind 4 isolierte Sequenz wies eine Veränderung der Base am Lokus 94 auf. Anstatt der Base Adenin (A) lag Thymin (T) vor. Beim Rind 1 wurde in keiner Probe pestivirale RNA nachgewiesen. Beim Rind 2 wurden im Plazentom, in der fetalnen Haut und im fetalnen Dünndarm Banden pestiviraler RNA gefunden, welche in der Sequenzierung zu 100 % dem Virus des pi-BDV-Kalbes entsprachen. Die RT-PCR der fetalnen Schilddrüse war nicht eindeutig. Beim Rind 6 konnten ebenfalls im Plazentom und im fetalnen Dünndarm wenige Banden pestiviraler RNA nachgewiesen werden. Die RNA in der Plazenta wies zu 100 % das gleiche Genom wie beim pi-BDV-Kalb auf und die RNA im Dünndarm enthielt die gleiche Mutation wie die beim Rind 4 isolierte.

Pi- und nicht-pi-Feten

Aufgrund der eindeutig positiven Befunde bei der immunhistochemischen und virologischen Untersuchung aller fetalnen Organe wurden die Feten der Rinder 3, 4 und 5 als persistent mit BDV infiziert diagnostiziert. Der Fetus vom Rind 1 wurde als nicht mit BDV infiziert eingestuft, da sowohl immunhistochemisch als auch virologisch kein Antigen bzw. Virus nachgewiesen werden konnte. Die Feten der

Rinder 2 und 6 wurden ebenfalls nicht als persistent infiziert angesehen. Bei diesen Feten konnte zwar in den fetalen Organen mittels RT-PCR teilweise Virus nachgewiesen werden; die immunhistochemische Untersuchung fiel jedoch immer negativ aus. Es kann sich bei denen daher um eine transiente Infektion handeln.

Tab. 4: Histologische, immunhistochemische und virologische Untersuchungen der Plazentome bei 6 Rindern der Gruppe A und der Organe ihrer Feten sowie deren Status

Nr.	Rind / Fetus	Histologie	IHC ¹⁾ C16/15C5	RT-PCR	Status Fetus
1	Rind	Negativ	Negativ	Negativ	-
	Fetus	Negativ	Negativ	Negativ	Nicht infiziert
2	Rind	Negativ	Negativ	Positiv	-
	Fetus	Negativ	Negativ	Teilweise positiv	Transient infiziert
3	Rind	E, F ²⁾	Positiv	Positiv	-
	Fetus	Negativ	Positiv	Positiv	Persistent infiziert
4	Rind	E, N, F	Positiv	Positiv	-
	Fetus	Negativ	Positiv	Positiv	Persistent infiziert
5	Rind	E, N, F	Positiv	Positiv	-
	Fetus	Negativ	Positiv	Positiv	Persistent infiziert
6	Rind	Negativ	Negativ	Teilweise positiv	-
	Fetus	Negativ	Negativ	Teilweise positiv	Transient infiziert

¹⁾ IHC = Immunhistochemie

²⁾ E Entzündung, N Nekrose, F Fibrose

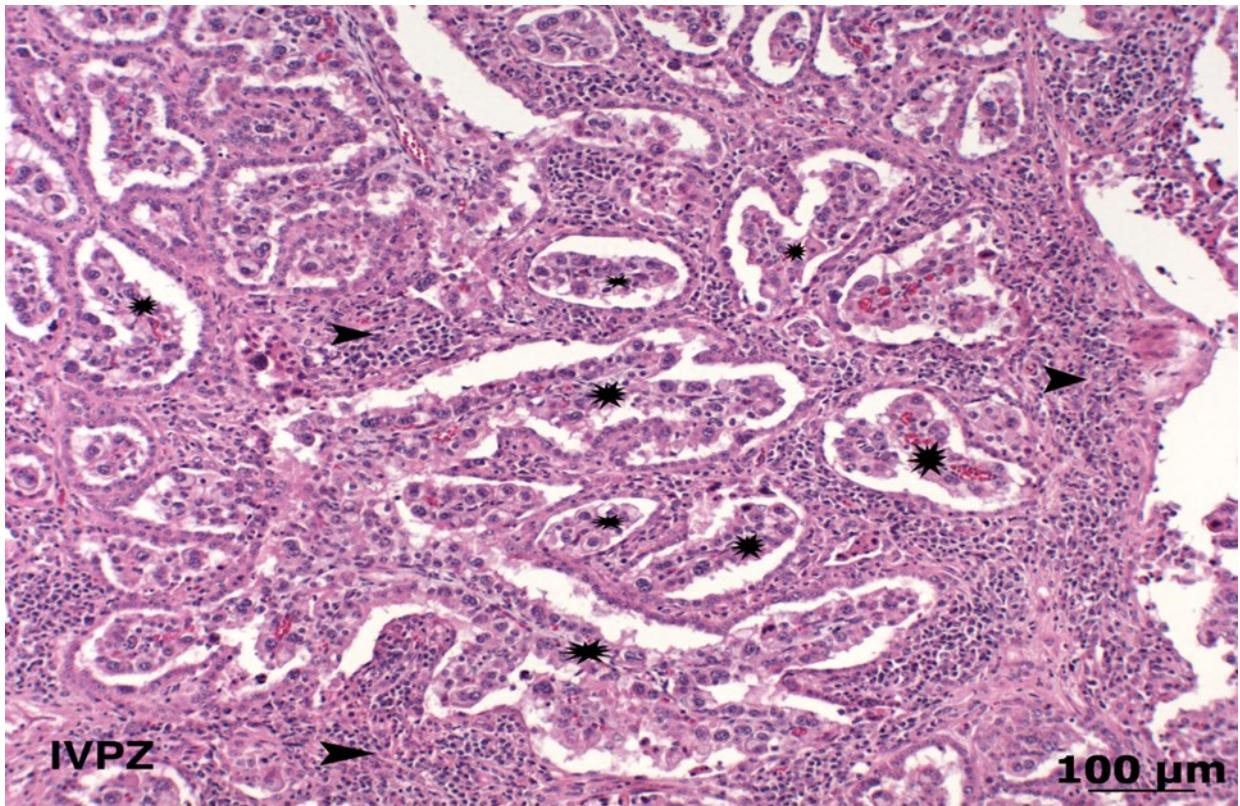


Abb. 4: Immunhistochemische Untersuchung eines Plazentoms von Rind 5 (En-Vision-Methode mit Antikörper 15C5 und HE-Färbung). Die rot gefärbten Zellen sind Pestivirus positiv. Mit einem Stern markiert = fetale Zellen, mit einem Pfeil markiert = maternale Zellen

6.2.4. Beziehung zwischen der Serokonversion und den klinischen Befunden der Gruppe A

Zwischen dem Tag der Serokonversion und den jeweiligen klinischen Befunden konnte kein zeitlicher Zusammenhang festgestellt werden.

6.2.5. Beziehung zwischen der Serokonversion und den pathologischen Befunden der Gruppe A

Die statistische Analyse der durchschnittlichen OD-Werte über die 60 Tage (7 Proben x 6 Tiere) ergab sowohl im generalisierten linearen Modell als auch in der Varianzanalyse (ANOVA) eine signifikante Abhängigkeit der OD-Werte vom Tag nach der Infektion und vom Infektionsstatus des Fetus. Mittels t-Tests wurde an

den Tagen 50 und 60 ein signifikanter Unterschied in der Höhe des durchschnittlichen OD-Werts zwischen den Rindern mit persistent-BDV-infizierten und denjenigen mit nicht persistent infizierten Feten festgestellt (Abb. 5). Mittels des generalisierten linearen Modells wurden bereits ab dem Tag 40 nach Beginn der Infektionsphase signifikant höhere Mittelwerte der OD-Werte bei Rindern mit persistent infizierten im Vergleich zu nicht persistent infizierten Feten ermittelt. Am Tag 40 nach der Infektion überschnitten sich die Konfidenzintervalle noch leicht, an den Tagen 50 und 60 gingen die durchschnittlichen OD-Werte wie auch die dazugehörigen Konfidenzintervalle deutlich auseinander.

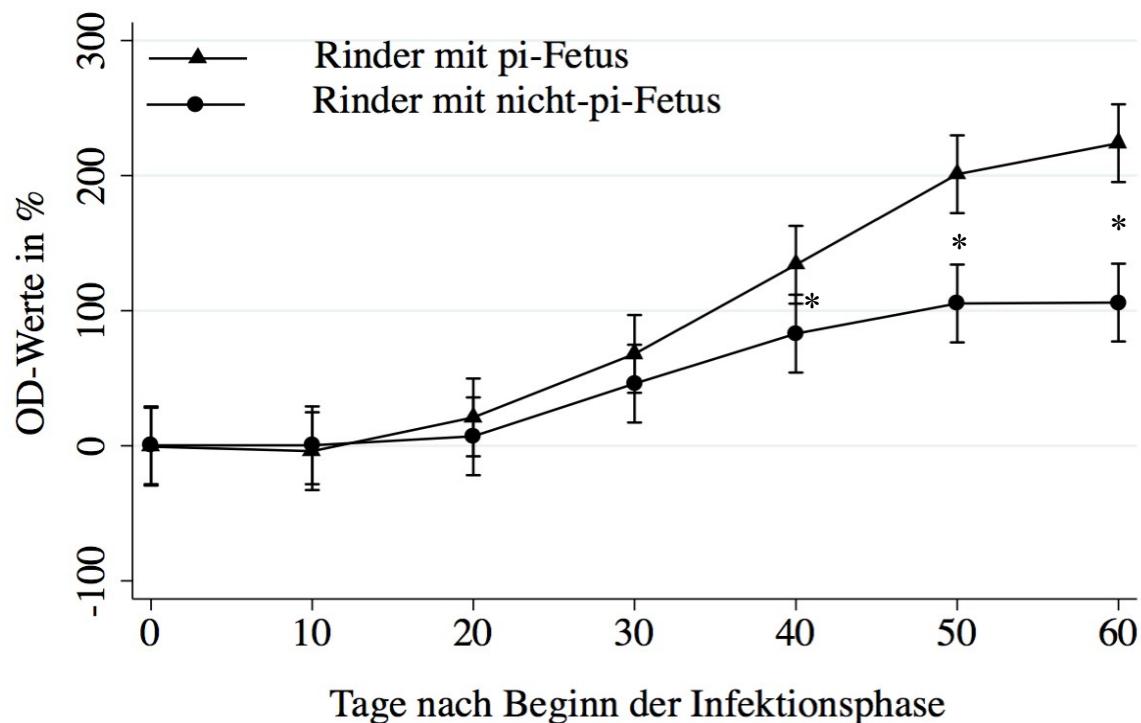


Abb. 5: Mittelwerte der OD-Werte im ELISA für Pestivirus-Antikörper mit 95 % Konfidenzintervall für drei Rinder mit pi-Feten (\blacktriangle) und drei Rinder mit nicht-pi-Feten (\bullet); * signifikanter Unterschied zwischen den durchschnittlichen OD-Werten der Rinder mit pi- bzw. nicht-pi-Feten ($P \leq 0.05$)

6.3. Besamung von Kühen mit infiziertem Sperma (Gruppe B)

6.3.1. Klinische Befunde bei den Kühen der Gruppe B

Allgemeinzustand, Fresslust und Nährzustand

Der Allgemeinzustand und die Fresslust der Kühne waren während der gesamten Untersuchungszeit ungestört und alle Tiere wiesen stets einen guten Nährzustand auf.

Rektale Temperatur

Die rektale Temperatur der fünf besamten Kühe lag vom Tag 0 bis zum Tag 55 nach der Besamung zwischen 37.4 und 40.3 °C (Median = 38.3 °C; Abb. 6), diejenige der nicht besamten Kontrollkuh zwischen 37.4 und 39.1°C (38.3 ± 0.36 , Abb. 6). Zwei der besamten Kühe und die Kontrollkuh wiesen während des Untersuchungszeitraums Temperaturen über 39.0 °C auf: die Kuh 1 am Tag 49 mit 39.3 °C, die Kuh 2 an den Tagen 49 und 51 mit 40.3 °C und 39.1 °C und die Kontrollkuh am Tag 49 mit 39.1 °C.

Trächtigkeitsuntersuchung

Die fünf besamten Kühe und die Kontrollkuh wurden 20 bis 23 Tage nach der letzten Besamung wieder brünstig. Bei der Ultraschalluntersuchung 28 Tage nach der Besamung erwies sich, wie aufgrund des Umrinderns bereits vermutet, keine Kuh als trächtig.

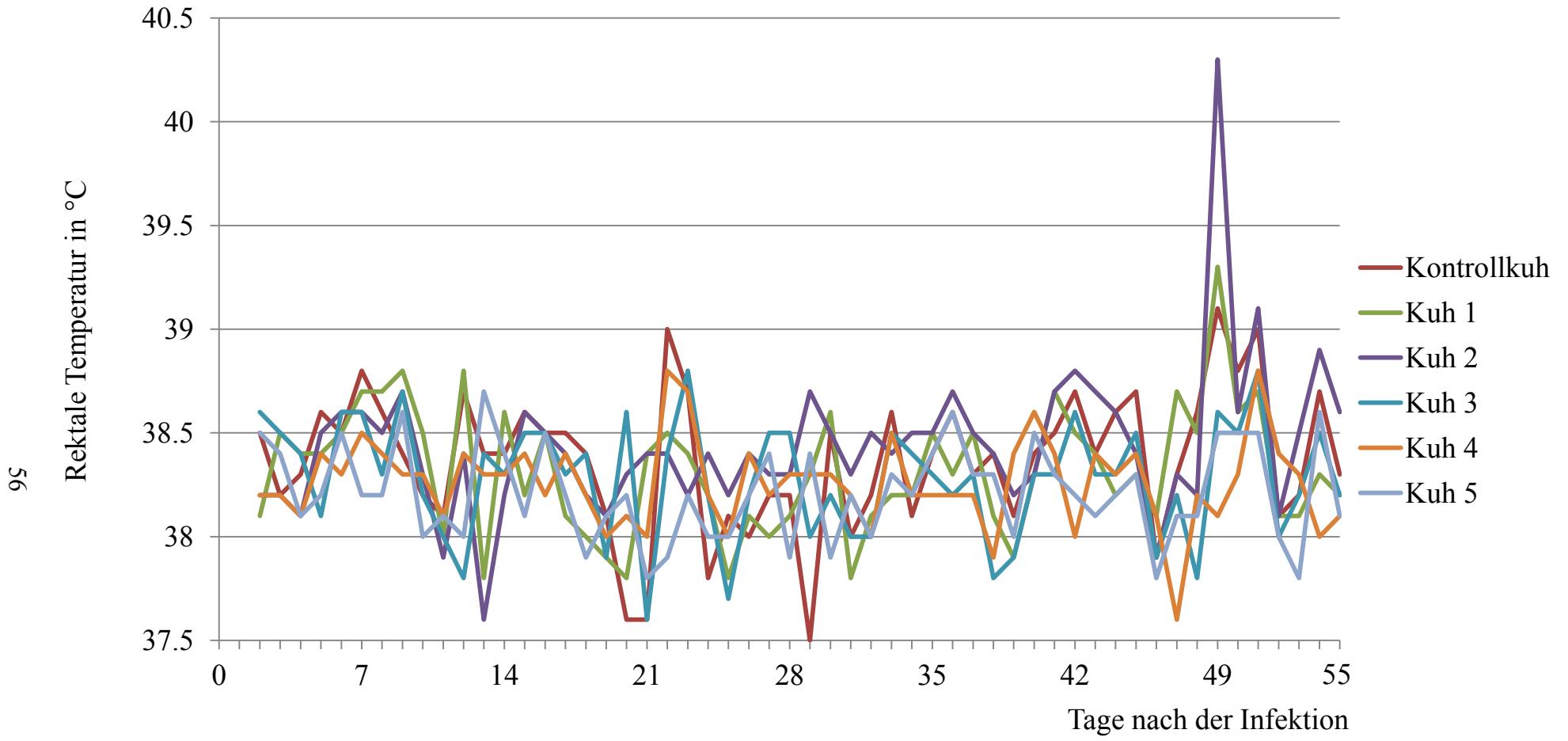


Abb. 6: Rektale Temperatur der 5 Kühe nach Insemination mit Border-Disease-Virus-infiziertem Sperma und der nicht besamten Kontrollkuh über 55 Tage

6.3.2. Virologische Blutuntersuchungen bei den Kühen der Gruppe B

Serologische Untersuchung (ELISA)

Bis zum Tag 7 nach der Besamung mit virushaltigem Sperma waren alle fünf Kühe seronegativ (Abb. 7). Als erstes wiesen die Kühe 3 und 4 am Tag 14 eine Serokonversion mit OD-Werten über 30 % auf (62 bzw. 51%). Am Tag 21 folgten die Kühe 2 und 5 mit Werten von 71 und 55 %. Am Tag 28 serokonvertierte als letztes Tier die Kuh 1 mit einem OD-Wert von 61 %. Die OD-Werte aller fünf Tiere stiegen bis zum Tag 42 stark an und verblieben dann bei den letzten beiden Untersuchungen zwischen 136 (Kuh 2) und 237 % (Kuh 5). Das Kontrolltier war bei allen neun Untersuchungen seronegativ. Es wies OD-Werte zwischen -1 und 2 % auf.

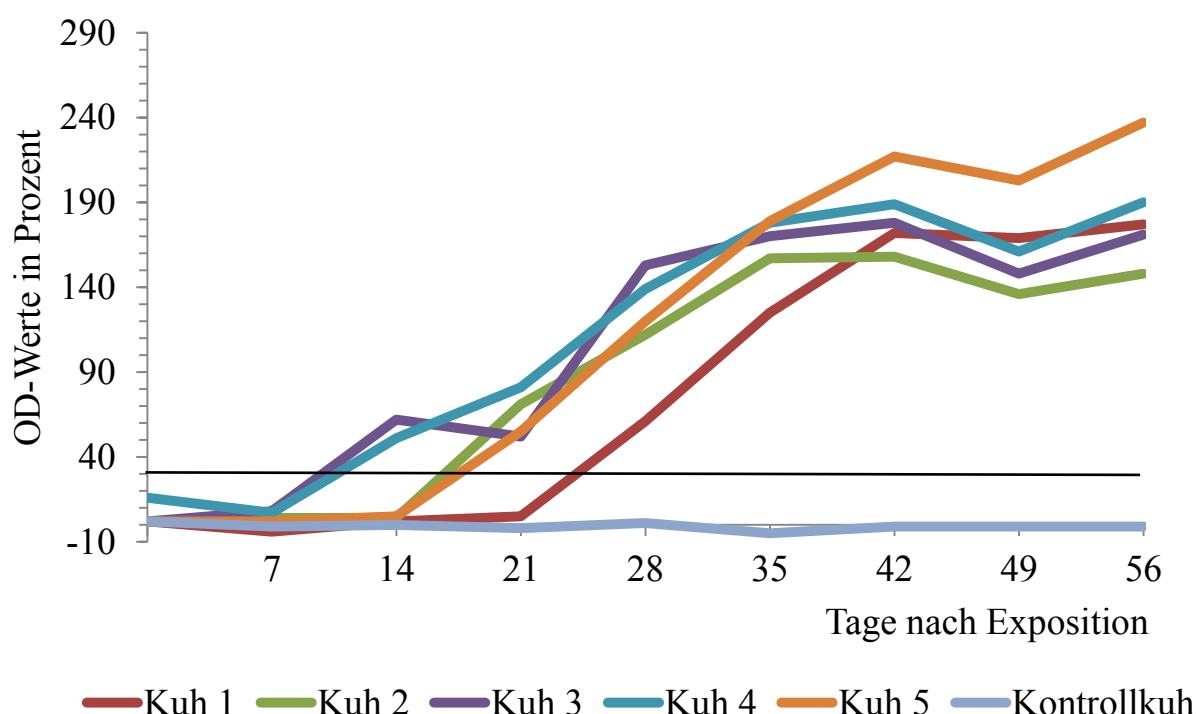


Abb. 7: Verlauf der OD-Werte in Prozent bei 5 infizierten Kühen nach der Besamung mit virushaltigem Sperma und der nicht besamten Kontrollkuh über 56 Tage. OD-Werte über 30% (schwarze Linie) wurden als positiv bewertet

Serumneutralisationstest

Der am Tag 56 nach der Besamung durchgeführte Serumneutralisationstest (SNT) war in Bezug auf BDV bei allen 5 Kühen positiv: Alle Kühe wiesen Titer von 215 bis 512 auf (Tab. 5). Bei allen fünf Kühen konnten dagegen nur sehr geringe Mengen Antikörper gegen das BVD-Virus gefunden werden und der Quotient BDV- zu BVDV-Antikörpertiter lag über 4, was für eine Antikörperbildung aufgrund einer Infektion mit BDV sprach. Bei der Kontrollkuh war der SNT in Bezug auf beide Viren negativ.

Tab. 5: OD-Werte, SNT-Titer und Quotienten der BDV-/BVDV-SNT-Titer bei 5 mit virushaltigem Sperma besamten Kühen und der Kontrollkuh 56 Tage nach der Besamung

Kuh	OD-Wert (%)	SNT BDV	SNT BVDV	Quotient BDV-/BVDV-Titer
1	177	431	27	16
2	148	304	11	28
3	171	215	16	13
4	190	256	11	23
5	237	512	27	19
Kontroll-kuh	-1	< 6	< 6	n.a.

n.a. nicht anwendbar

6.3.3. Beziehung zwischen der Serokonversion und den klinischen Befunden der Gruppe B

Zwischen dem Tag der Serokonversion und den jeweiligen klinischen Befunden bestand kein zeitlicher Zusammenhang.

7. Diskussion

7.1. Übersicht

Es wurde schon mehrfach berichtet, dass das Border-Disease-Virus bei Rindern vorkommt und dass die Interspeziesübertragung des Border-Disease-Virus von Schafen auf Rinder möglich ist (CARLSSON und BELÁK, 1994; BECHER et al., 1997; CRANWELL et al., 2007; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008a; HORNBERG et al., 2009; STRONG et al., 2010; McFADDEN et al., 2012). Dies konnte ebenso experimentell bestätigt werden (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008b; REICHLE, 2009). Im Weiteren wurde nachgewiesen, dass eine BDV-Infektion der Rinder während der frühen Trächtigkeit in über 50 % der Fälle aufgrund einer intrauterinen Infektion des Fetus zum frühzeitigen Abbruch der Trächtigkeit führen kann (GIBBONS et al., 1974; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a). Es liegen jedoch bisher keine Daten darüber vor, ob eine Übertragung des Border-Disease-Virus innerhalb der Rindergattung möglich ist und falls ja, ob solch eine Infektion unter natürlichen Bedingungen vonstatten geht. Bis heute berichteten einzig McFADDEN et al. (2012) von einer Rinderherde, in welcher ein persistent mit BDV infizierter Deckstier entdeckt wurde und zur gleichen Zeit alle Rinder seropositiv waren. Dabei wiesen die Rinder höhere Antikörpertiter gegen BDV als gegen BVDV auf. Die Autoren vermuteten eine vom Stier ausgehende Infektion. Sie konnten dies retrospektiv allerdings nicht beweisen. Ebenso wie über die Übertragung ist bis heute wenig über die klinische Erkrankung von Rindern mit einer BDV-Infektion bekannt. Bei zwei an Border-Disease erkrankten Rindern wurden Symptome beschrieben, die sich ähnlich wie diejenigen bei der Bovinen-Virus-Diarrhoe-Virus-Infektion und der Mucosal Disease manifestierten (CRANWELL et al., 2007). Der von McFADDEN et al. (2012) beschriebene 3-jährige Galloway-Deckstier fiel aufgrund eines verzögerten Wachstums und einer verminderten Fertilität auf. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals eine Infektion seronegativer Rinder und Kühe durch ein persistent mit BDV infiziertes Tier der Rindergattung beschrieben.

7.2. Kontaktinfektion von frühträchtigen Rindern (Gruppe A)

7.2.1. Klinische Befunde bei den Rindern der Gruppe A

Die Rinder 1, 2, 3 und 4 wiesen innerhalb derselben Woche, aber an unterschiedlichen Tagen nach Infektionsbeginn, einen verminderten Allgemeinzustand und eine verminderte Fresslust auf. Bei den Rindern 1, 2 und 4 wurden im gleichen Zeitraum rektale Temperaturen über 39.0 °C gemessen. Dazu kamen bei allen vier Rindern respiratorische Symptome. Da sich die Symptome unabhängig von der Länge der bis dahin andauernden Infektionsphase bei allen vier Tieren innerhalb derselben Woche manifestierten, ist es eher unwahrscheinlich, dass es sich dabei um eine klinische Erkrankung infolge einer Border-Disease-Infektion handelte. Auffällig war, dass das Rind 4 eine Woche nach dem Einstallen in den Laufstall als erstes Tier respiratorische Symptome und Fieber zeigte. Die Tiere 1, 2 und 3 erkrankten dann gleichzeitig 3 bis 4 Tage später an den gleichen Symptomen. Da die Tiere aus verschiedenen Betrieben stammten und auch während der Akklimatisationsphase getrennt voneinander gehalten wurden, kam es vermutlich aufgrund der Umgruppierung und des transportbedingten Stresses zum Ausbruch einer enzootischen Bronchopneumonie. Diese Vermutung unterstützt die Tatsache, dass bei den Rindern 1, 2 und 3 kein Zusammenhang zwischen den Symptomen und dem Auftreten von Virus oder Antikörpern im Blut gesehen werden konnte. Beim Rind 4 traten die ersten Symptome drei Tage vor Beginn der Serokonversion auf. Da dieses Tier aber auch nach der Serokonversion bis zum Ende des Versuchs immer wieder hustete und Erkrankungen der Lunge aufgrund einer Border-Disease-Infektion bis heute nie beschrieben wurden, kann die BDV-Infektion als Ursache für die klinischen Symptome als eher unwahrscheinlich angesehen werden. Dazu kommt, dass die Tiere 5 und 6, welche erst einige Wochen später eingestallt wurden, nie respiratorische Symptome und Fieber zeigten.

Ausserhalb dieser einen Woche wiesen die Rinder 1, 2, 4 und 6 bei einzelnen Messungen Temperaturen über 39.0 °C auf, ohne dass gleichzeitig klinische Symptome beobachtet wurden. Allerdings traten diese Temperaturanstiege bei den

Rindern 1 und 6 sechs bzw. zwei Tage vor der Serokonversion auf. Auch andere Autoren (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a) beschrieben bei einem Infektionsversuch mit trächtigen Rindern und persistent infizierten BDV-Schafen leichtgradige Temperaturerhöhungen im Zeitraum von 10 Tagen vor der Serokonversion. Bei Schafen wurde die Temperaturerhöhung als einziges Symptom einer akuten BDV-Virämie beschrieben (NETTLETON et al., 1998). Das Fieber entwickelte sich bei Lämmern in einem Infektionsversuch von THABTI et al. (2002) 10 bis 18 Tage vor der Serokonversion.

Die bei den Rindern 2 und 4 beobachteten Temperaturanstiege an den Tagen 58 und 33 können in keinen Zusammenhang mit klinischen Symptomen oder Blutbefunden gebracht werden und deren Ursache ist daher unklar.

Ein Abortgeschehen wie bei 60 % der Rinder im Versuch von KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2010a) konnte nicht beobachtet werden. Eine Ursache könnte in einer unterschiedlichen Virulenz des Genotyps BDV-3 im Versuch dieser Autorengruppe im Vergleich zum Virus der BDSwiss-Untergruppe im vorliegenden Versuch liegen. GIBBONS et al. (1974) konnten bei 90 % der trächtigen Rinder durch intramuskuläre Infektion mit BD-Viren einen Abort auslösen. Bei diesen Unterschieden muss in Betracht gezogen werden, dass bei einer Kontaktinfektion weder die Infektionsdosis noch der Infektionszeitpunkt genau bekannt sind. Im Weiteren ist auch nicht bekannt, ob persistent infizierte Schafe und Rinder gleich viel Virus ausscheiden. In der vorliegenden Untersuchung wie auch im Versuch von KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2010a) sollten die Tiere über Kontaktinfektion mit einem pi-BDV-Tier infiziert werden. Die Tiere wurden bei beiden Versuchen in einem Stall mit Auslauf gehalten, wobei aber bei KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2010a) 9 persistent infizierte Schafe auf 8 Rinder kamen; in der vorliegenden Studie wurde aber nur ein persistent infiziertes Kalb mit 6 Rindern zusammengehalten. Auch der Versuch von GIBBONS et al. (1974) lässt sich mit dem vorliegenden nicht genau vergleichen, da die genannten Autoren allen Tieren am gleichen Tag dieselbe Virusdosis injizierten.

Der Vorteil unserer Versuchsanordnung liegt darin, dass sie einer solchen im Feld vermutlich am nächsten kommt, wo ein pi-Tier zusammen mit vielen anderen gehalten wird und diese nach und nach infiziert. Schliesslich muss als vermutlich entscheidend aufgeführt werden, dass die Rinder der genannten Autoren erst 54 bis 202 (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a) bzw. 66 bis 213 Tage (GIBBONS et al., 1974) nach der Infektion abortierten. Unsere Rinder wurden aber bereits nach 60 Tagen geschlachtet, sodass die Zeitspanne für das Auftreten eines Aborts vermutlich zu kurz war.

7.2.2. Virologische Blutuntersuchungen bei den Rindern der Gruppe A

Virusnachweis

Bei drei Rindern (3, 4 und 5) wurde bei der Erstuntersuchung der Blutproben mittels RT-PCR pestivirale RNA nachgewiesen. Bei der Nachuntersuchung derselben Blutproben konnten diese Ergebnisse nur bei den Rindern 4 und 5 bestätigt werden. Es handelte sich immer um schwache Ct-Werte ($35 < Ct < 45$). Solche Werte befinden sich an der Grenze der Nachweisbarkeit und schon nur eine geringe Veränderung der Ausgangsmenge der RNA, z. B. durch die Lagerung, kann dazu führen, dass in der später folgenden Nachuntersuchung der gleichen Blutprobe keine RNA mehr nachweisbar ist. So schwache Ct-Werte können infolge einer echten Virämie oder aber auch infolge von Kontaminationen während der Probenentnahme oder aber bei der Arbeit im Labor entstehen (VILČEK und BÉLAK, 1996). Die Probenentnahmen wurden so sauber wie möglich durchgeführt. Es wurde für jedes Tier jeweils eine neue Kanüle verwendet, und die Proben wurden mittels Vakuumröhrchen entnommen, um den Kontakt und damit Kreuzkontaminationen zwischen den einzelnen Blutproben zu vermeiden. Die angewendete Methode der real-time RT-PCR ermöglichte es, dass keine Prozesse nach der Amplifikation durchgeführt werden mussten und verringerte auf diese Weise die Gefahr von Kontaminationen bei der Probenübertragung (HURTADO et al., 2009). Im Weiteren wurden die Schritte der RNA-Isolierung, der PCR-Vorbereitung und der RNA-

Amplifikation in verschiedenen, speziell dafür vorgesehenen Labors durchgeführt, was das Risiko einer Kontamination bei der Laborarbeit weiter verminderte. Die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination der Proben bei der Entnahme oder der Bearbeitung im Labor ist daher als gering zu bewerten. Auch wären durch Kontamination hervorgerufene Ct-Werte > 35 nur gelegentlich zu erwarten und nicht, wie in der vorliegenden Untersuchung, gebündelt bei verschiedenen Tieren an den gleichen Tagen vor der Serokonversion. Obschon die positiven Ergebnisse der Erstuntersuchung nicht bei allen Nachuntersuchungen der Blutproben bestätigt werden konnten, gibt es verschiedene Punkte, die für eine echte, wenn auch nur schwache, Virämie sprechen. Zum einen ist dies der Zeitpunkt des Virusnachweises an den Tagen 8, 10, 12 und 14 vor Beginn der Serokonversion. REICHERT (2009) konnte in seiner Dissertation bei 3 von 7 Kälbern zwischen den Tagen 8 und 21 nach der Infektion virale RNA im Blut nachweisen. HURTADO et al. (2009) konnten bei Schafen mit einer transienten BDV-Infektion zwischen dem 2. und 21. Tag nach der Infektion Virus im Blut nachweisen, wobei die Virämie ihren Höhepunkt an den Tagen 6 bis 7 post infectionem erreichte, dann sank, um an den Tagen 11 bis 12 wieder anzusteigen. Auch THABTI et al. (2002) fanden bei intratracheal mit BDV infizierten Lämmern bereits an den Tagen 4 bis 9 nach der Infektion Virus im Blut. Bei Kälbern wurde bei einer Infektion mit BVD-Viren ein ähnlicher Zeitpunkt der Virämie festgestellt. Mittels RT-PCR wurde im Blut der Kälber zwischen dem 3. und 12. Tag nach der Infektion pestivirale RNA nachgewiesen (PEDRERA et al., 2009; KELLING und TOPLIFF, 2013). Bei Kühen führte eine intranasale Infektion mit BVDV am Tag 82 der Trächtigkeit zwischen dem 7. und 15. Tag nach der Infektion zu einer Virämie, die mittels RT-PCR nachweisbar war (SMIRNOVA et al., 2008). Ebenfalls für den Nachweis einer echten Virämie spricht, dass nur bei denjenigen Tieren Virus-RNA identifiziert wurde, welche die höchsten Antikörpertiter aufwiesen und bei welchen nach der Schlachtung persistent mit BDV infizierte Feten nachgewiesen wurden. Dies ist somit die erste Arbeit, die eine Virämie bei Rindern mit einer durch Kontakt her-

vorgerufenen Border-Disease-Infektion beschreibt. So wurde zwar bei Infektionsversuchen von Kälbern und Rindern, welche mit persistent BDV infizierten Schafen zusammengehalten wurden, bereits eine Serokonversion der Tiere gegen das BD-Virus nachgewiesen; das Virus selber aber konnte nie aus den Blutproben isoliert werden (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008b; REICHLE, 2009; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a). Es wurde jedoch bereits bei peroral mit BDV infizierten Kälbern virale RNA aus dem Blut isoliert (REICHERT, 2009).

Serologische Untersuchung (ELISA)

Bereits früher wurde in einem ersten Infektionsversuch von Rindern mit dem Border-Disease-Virus gezeigt, dass die Tiere nach der intramuskulären Injektion des aus Schafen gewonnen Virus Antikörper bildeten (GIBBONS et al., 1974). Im vorliegenden Versuch hatten bis zum 40. Tag alle sechs Rinder serokonvertiert. Die ersten beiden Rinder (4 und 5) erreichten bereits am Tag 20 einen OD-Wert > 30 %. Dieses Resultat entspricht demjenigen von KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2010a), die trächtige Rinder zusammen mit persistent mit BDV infizierten Schafen hielten. Die Rinder serokonvertierten zwischen den Tagen 23 und 38. Bei Lämmern trat die Serokonversion bei Kontaktinfektion mit einem persistent infizierten Lamm erst nach 60 bis 126 Tagen ein (BRAUN et al., 2004). Am Tag 82 waren vier Lämmer seropositiv und am Tag 126 waren bei sechs der acht Lämmer Antikörper nachweisbar. Die Tiere waren aber in der ersten Zeit des Versuchs auf der Weide und die Kontakte zwischen ihnen waren vermutlich geringer als im vorliegenden Versuch, wo die Tiere zwar über einen Auslauf verfügten, aber die meiste Zeit im Stall verbrachten. Bei der direkten intratrachealen Infektion entwickelten auch Lämmer bereits nach 16 bis 21 Tagen Antikörper gegen das BD-Virus (THABTI et al., 2002). Auch bei Infektionsversuchen mit dem BVD-Virus während der Trächtigkeit konnte eine Serokonversion bei den Muttertieren nachgewiesen werden. So bildeten Rinder, welche in der frühen Trächtigkeit (72. Tag)

infiziert wurden, bereits 15 Tage später Antikörper. Rinder, welche erst in der späten Trächtigkeit (175. Tag) infiziert wurden, bildeten ebenfalls Antikörper, aber erst zu einem späteren Zeitpunkt (SMIRNOVA et al., 2008). In zwei ähnlichen Versuchen wurden trächtige Ziegen intramuskulär bzw. intranasal mit BVDV bzw. BDV infiziert und serokonvertierten ab der zweiten (DEPNER et al., 1991) bzw. dritten Woche unabhängig davon, ob die Infektion in einem frühen oder späten Trächtigkeitsstadium stattfand (LØKEN und BJERKÅS, 1991).

In der vorliegenden Untersuchung ergab die statistische Auswertung, dass die Rinder 3, 4 und 5, welche mit einem persistent infizierten Fetus trächtig waren, ab dem Tag 40 nach Infektionsbeginn signifikant höhere Serumantikörpertiter aufwiesen als die Rinder 1, 2 und 6. Bereits frühere Untersuchungen zeigten, dass Muttertiere, welche mit einem persistent mit BVDV infizierten Fetus tragend waren, höhere Antikörpertiter aufwiesen als solche mit einem nicht persistent infizierten Fetus (BROWNLIE et al., 1998; LINDBERG et al., 2001; STOKSTAD et al., 2003). Bereits am 180. Tag der Trächtigkeit konnte ein Grossteil der Trächtigkeiten mit einem persistent mit BVDV infizierten Kalb anhand der Höhe des Antikörpertiters des Muttertiers vorhergesagt werden (BROWNLIE et al., 1998). Die Diskrepanz zwischen den Antikörpertitern verstärkte sich mit zunehmender Trächtigkeit und erreichte in den letzten zwei Trächtigkeitsmonaten eine Sensitivität von 100 % bei einem Testtrennwert von 90 % OD (STOKSTAD et al., 2003). Im vorliegenden Versuch wurden die Rinder nur bis zum 60. Tag nach Infektionsbeginn (110. Trächtigkeitstag) serologisch untersucht. Bereits ab dem 40. Infektions-tag unterschieden sich die OD-Werte der mit und ohne pi-Fetus trächtigen Rinder signifikant.

Serumneutralisationstest

Alle sechs Rinder wiesen am Tag 60 nach Infektionsbeginn hohe Werte an BDV-neutralisierenden Antikörpern auf, während bei den Rindern 1 und 2 keine und bei den Rindern 3 bis 6 nur eine geringe Anzahl Antikörper gegen das BVDV gefun-

den wurden. Der Nachweis von geringen Titern BVDV-neutralisierender Antikörper beruht auf einer gewissen Kreuzneutralisation innerhalb des Genus Pestivirus. Dabei neutralisieren aber induzierte, spezifische Antikörper das Border-Disease-Virus bis zu hundertfach besser als das Bovine-Virus-Diarrhoe-Virus (BECHER et al., 2003; REICHERT, 2009; REICHLE, 2009). In der vorliegenden Untersuchung waren die Titer der Rinder gegen das Border-Disease-Virus zwischen 16 und 64 Mal höher als gegen das BVD-Virus. Da Tiere mit einem mindestens vierfach höheren Titer als mit BDV infiziert angesehen werden (BRAUN et al., 2013b), lässt sich daraus schliessen, dass es sich bei allen Rindern um eine spezifische Antikörperbildung gegen eine Infektion mit dem Border-Disease-Virus handelte.

7.2.3. Untersuchungen an Uterus, Plazenta und Fetus in der Gruppe A

Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Alle sechs Uteri, Plazenten und Feten waren, soweit makroskopisch beurteilbar, unauffällig. Die Größen und Scheitelsteissbeinlängen (SSL) variierten relativ stark, wobei aber ein direkter Vergleich aufgrund der verschiedenen Rassen und der unterschiedlichen Genetik der Tiere nicht möglich war. Grundsätzlich lagen, gemessen am Alter der Feten, beide Merkmale innerhalb der Normwerte (RÜSSE und GRUNERT, 1993) und es bestand kein Zusammenhang zwischen tiefen Gewichten oder kurzen Scheitelsteissbeinlängen und dem Infektionsstatus der Feten. Im Gegensatz dazu stellten KRAMETTER-FRÖTSCHER et al. (2010a) bei fünf abortierten Rinderfeten deutliche makroskopische Veränderungen und zu geringe Größen fest. So waren bei zwei Rindern, welche zwischen dem 113. und 116. Tag der Trächtigkeit (54 bis 59 Tage nach der ersten Exposition) abortierten, die Feten (ein Einling und ein Zwillingsspaar) mumifiziert und besasssen eine Scheitelsteissbeinlänge (SSL) von nur 11 bis 12 cm. Der vierte Fetus, welcher am 132. Tag der Trächtigkeit (70 Tage nach erster Exposition) tot geboren wurde, besass eine SSL von 21 cm. Ein weiteres Rind abortierte erst 202 Tage nach der ersten Exposition

(267. Trächtigkeitstag) und der Fetus wies ein untypisch langes Fell und massive Läsionen in Gehirn und Herz auf. Er besass zwar eine SSL von 70 cm, wog dabei aber nur 16 kg. In den Untersuchungen von GIBBONS et al. (1974) an Rinderfeten war das anhand von Gewicht, Scheitelsteissbein- und Knochenlänge errechnete Alter in sechs von sieben Fällen tiefer als das effektive Alter des Fetus. Drei Feten konnten nicht weiter untersucht werden, da es sich ebenfalls um Mumien handelte. Die Autoren konnten in weiterführenden Untersuchungen bei drei Feten eine abnorme Knochenbildung als Grund für das retardierte Wachstum feststellen. Auch bei Schaf-Feten war das BD-Virus als Ursache für ein verminderteres Knochenwachstum erkannt worden (GIBBONS et al., 1974), und es liess sich röntgenologisch eine veränderte Knochenstruktur erkennen (CAFFREY et al., 1997). Derartige Knochenveränderungen wurden bei persistent mit BVDV infizierten Kälbern schon mehrfach beschrieben (O'CONNOR und DOIGE, 1993; SCRUGGS et al., 1995; HILBE et al., 2000; NUSS et al., 2005; WEBB et al., 2012). Im vorliegenden Versuch wurden die fetalnen Knochen aufgrund der normalen Größenverhältnisse nicht weiter untersucht. Das nicht retardierte Wachstum der persistent infizierten Feten zum Zeitpunkt der Schlachtung lag vermutlich an der zu kurzen Versuchsdauer. So waren bei persistent mit BVDV infizierten bovinen Feten die typischen Knochenveränderungen erst ab dem 192. Trächtigkeitstag röntgenologisch und histologisch zu erkennen (WEBB et al., 2012). Die Organe der Feten waren ebenfalls alle unauffällig. Es konnten keine Gehirnveränderungen, zum Beispiel eine Kleinhirnhypoplasie/-aplasie oder eine Hydranenzephalie wie dies bei persistent mit BDV infizierten Lämmern bzw. mit BVDV infizierten Kälbern beschrieben wurde, festgestellt werden (NETTLETON et al., 1998; RADOSTITS et al., 2007a, 2007b). Die vorliegenden Untersuchungen lassen keine Aussage darüber zu, ob es zu einem späteren Zeitpunkt noch zu Veränderungen der Knochen und des Wachstums gekommen wäre.

Histologische Befunde

Die fetalen Organe waren histologisch bei allen sechs Feten unauffällig. Eine Hypomyelinisation des Nervensystems, wie dies bei persistent mit BDV infizierten Lämmern (SAWYER, 1992) und bei einem bovinen Fetus beschrieben wurde (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a), konnte nicht gefunden werden. Auch konnten im Gehirn keine Läsionen, wie dies bei Rindern mit BDV- bzw. BVDV-Infektionen gefunden wurde, nachgewiesen werden (GIBBONS et al., 1974; GROOMS, 2004).

Bei den 3 Rindern, welche mit pi-BDV-Feten tragend waren, wurden histologisch in den makroskopisch unauffälligen Plazenten Anzeichen einer Plazentitis festgestellt. Diese stellten sich ähnlich wie die bei BDV-Infektionen von trächtigen Schafen (OSBURN and CASTRUCCI, 1991) und Rindern (GIBBONS et al., 1974; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a) sowie BVDV-Infektionen von trächtigen Rindern (OSBURN and CASTRUCCI, 1991) beobachteten dar. Es ist anzunehmen, dass die Entzündungen in den Plazenten den Ausgangspunkt für die Infektion der Feten darstellen.

Immunhistochemische Untersuchung

Die immunhistochemische Untersuchung von Zunge, Haut, Schilddrüse und Plazenta stellt erwiesenermassen eine sensitive Methode dar, um eine persistente Infektion mit Pestiviren in einem Fetus zu entdecken (THÜR et al., 1997). Von den sechs Feten und Plazenten reagierten die Proben von drei Rindern jeweils mit den Pestivirus-spezifischen Antikörpern C16 und 15C5 positiv, während es mit den BVDV-spezifischen Antikörpern C42, CA3 und CA34 zu keiner Reaktion kam. Das bedeutet, dass es in den Feten mit grosser Wahrscheinlichkeit zu einer persistenten Infektion mit dem Border-Disease-Virus gekommen war. Auffällig war, dass die Antikörper praktisch nur auf der fetalen Plazentomseite an Antigen binden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Muttertiere 3, 4 und 5 zwischen den Tagen 20 und 40 nach Infektionsbeginn sehr hohe Antikörpertiter gegen das BD-

Virus gebildet hatten und somit das Virus im maternalen Kreislauf während der Trächtigkeit neutralisieren konnten. Da die Plazentarschranke bei Wiederkäuern aber sehr dicht ist (Placenta epitheliochorialis) konnten die Antikörper nicht in den Kreislauf des Fetus übertreten und das Virus konnte den Fetus infizieren (RÜSSE und GRUNERT, 1993).

Virologische Untersuchung

Mit Hilfe der RT-PCR konnte der Verdacht einer Border-Disease-Virus-Infektion der Feten 3, 4 und 5 bestätigt werden. Bei den Tieren 3 und 5 wurde zu 100 % die gleiche Sequenz wie beim pi-Kalb nachgewiesen. Die Tatsache, dass sich die Sequenz beim Rind 4 an einem Lokus um eine Base unterschied, lässt sich mit einer spezifischen Eigenschaft der RNA-Viren erklären. Diese besteht darin, dass innerhalb einer infizierten Zelle nicht immer identische Nachkommen, sondern auch sogenannte Varianten durch Mutation, Rekombination und Neuordnungen innerhalb des Genoms produziert werden (DOMINGO et al., 2012). Eine solche Ansammlung von Varianten wird auch als Quasispezies bezeichnet (DOMINGO et al., 2012). Solche Sequenzveränderungen über die Zeit und somit das Vorkommen von solchen viralen Varianten wurden auch schon bei zwei persistent mit BVDV infizierten Kälbern nachgewiesen (COLLINS et al., 1999). Vermutlich kommen diese Varianten aber viel häufiger vor als dass sie nachgewiesen werden. Beim Menschen werden solche Quasispezies stärker erforscht, da Varianten bekannter Viren, wie zum Beispiel des Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV), des Hepatitis-B- und des Hepatitis-C-Virus, die Entwickler von Vakzinen aufgrund der häufigen Resistenzbildung immer wieder vor Probleme stellen (DOMINGO et al., 2012).

Der Nachweis pestiviraler RNA in den Proben der Feten und in den Plazentomen der Rinder 2 und 6 könnte sowohl auf einer echten Infektion als auch auf einer Kontamination während der Probenentnahme, dem Versand oder der Probenverarbeitung beruhen. Davon ausgehend, dass sich eine persistente Infektion mit dem

Border-Disease-Virus ähnlich wie eine solche mit dem BVD-Virus verhält, hätten die Organproben von persistent infizierten Tieren auch in der immunhistochemischen Untersuchung auf Virusantigen positiv ausfallen müssen. Es konnte bei mit BVDV infizierten Feten gezeigt werden, dass die Untersuchung einzelner Organe mittels Immunhistochemie genau so sensitiv wie die Virusisolation (THÜR et al., 1997; NJAA et al., 2000) und die RT-PCR ist (HILBE et al., 2007b). Daher besteht auch die Möglichkeit, dass es sich bei den Feten der Rinder 2 und 6 um transiente Infektionen handelte. Beide Muttertiere hatten Antikörper gegen BDV gebildet und waren somit erfolgreich infiziert worden. Es hätte somit zur Virusübertragung auf den Fetus kommen können, wobei dabei, aus noch unbekannten Gründen, nicht immer ein persistent infizierter Fetus entstehen muss. Der Nachweis von RNA in den Organen von transient mit BVDV infizierten Feten ist möglich (HILBE et al., 2007b; HANSEN et al., 2010) und es könnte somit sein, dass bei diesen beiden Feten transient vorkommendes Virus in der RT-PCR nachgewiesen wurde. Für eine transiente Infektion der Feten 2 und 6 spricht, dass immunhistochemisch in den Hautproben vom Ohr bei beiden kein Virusantigen nachgewiesen werden konnte und dass diese Methode heute allgemein als Mittel zur Diagnostik von persistent infizierten Feten und Kälbern akzeptiert ist (NJAA et al., 2000; HILBE et al., 2007b).

In den Proben des Fetus und des Plazentoms von Rind 1 konnte keine pestivirale RNA nachgewiesen werden. Wie bei den Rindern 2 und 6 muss aufgrund der Antikörerbildung gegen BDV im Blut des Muttertiers nach Infektionsbeginn von einer erfolgreichen Infektion ausgegangen werden. Der Grund, weshalb es in diesem Fall zu keiner Virusübertragung auf den Fetus gekommen ist, ist jedoch unbekannt. Möglich wäre, dass das Muttertier das Virus, aufgrund eines besseren Immunstatus oder einer geringeren Virusmenge im Blut, neutralisieren konnte, bevor es zu einer Infektion des Fetus kam.

7.2.4. Beziehung zwischen der Serokonversion und den pathologischen Befunden der Gruppe A

Die statistische Analyse der durchschnittlichen relativen OD-Werte der Rinder mit bzw. ohne pi-Fetus über die 60 Tage während des Infektionsversuchs ergab eine signifikante Abhängigkeit der relativen OD-Werte von der Infektionsdauer und vom Infektionsstatus der Feten. Solche Abhängigkeiten der Antikörpertiter vom Vorkommen eines persistent infizierten Fetus wurden bei einer Border-Disease-Infektion noch nicht beschrieben. Das Phänomen ist jedoch bei Infektionen mit dem Virus der Bovinen-Virus-Diarrhoe bereits bekannt. So wurden bei Kühen am 180. Tag der Trächtigkeit im Vergleich zu einem nicht infizierten Fetus im Durchschnitt zehnmal höhere Antikörpertiter gemessen, wenn die Tiere mit einem mit BVDV persistent infizierten Fetus trächtig waren (BROWNIE et al., 1998). Ein Vergleich der OD-Werte der Mütter von persistent bzw. nicht infizierten Feten über die gesamte Trächtigkeitsdauer ergab eine signifikante Beziehung dieser Werte mit der Dauer der Trächtigkeit, dem Zeitpunkt der Probenentnahme und dem Infektionsstatus der Feten (LINDBERG et al., 2001; STOKSTAD et al., 2003). Die Antikörpertiter stiegen bei einer Trächtigkeit mit einem BVDV persistent infizierten Fetus deutlich stärker an und ab dem 135. Tag der Trächtigkeit unterschieden sich die OD-Werte der beiden Gruppen signifikant (STOKSTAD et al., 2003). Auffällig in den Studien von LINDBERG et al. (2001) und STOKSTAD et al. (2003) war, dass die durchschnittlichen Antikörpertiter der Muttertiere mit persistent infizierten Feten deutlich unter denjenigen der Tiere in der vorliegenden Untersuchung lagen. So variierten die Werte im dritten bis vierten Trächtigkeitsmonat zwischen 70 und 85 (LINDBERG et al., 2001) bzw. 40 und 60 % (STOKSTAD et al., 2003). Gegen Ende der Trächtigkeit lagen sie bei 140 (LINDBERG et al., 2001) bzw. knapp 160 % (STOKSTAD et al., 2003). Beide Autorengruppen empfahlen, die Antikörpertiter erst in den letzten zwei bis drei Trächtigkeitsmonaten als Kriterium für die Trächtigkeit mit einem pi-Feten anzuwenden. Bei den Antikörpertitern im vorliegenden Versuch mit Border-Disease-

Virus lag bei einer Trächtigkeit mit pi-Feten zwar auch eine grosse Streuung vor. Im Durchschnitt erreichten diese aber bereits am 90. Trächtigkeitstag einen OD-Wert von 134 ± 48.5 und am Ende des Experiments am 110. Trächtigkeitstag einen solchen von 224 ± 46.5 . Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass bereits ab dem 100. Tag der Trächtigkeit ein signifikanter Unterschied zwischen den OD-Werten der mit und ohne pi-Fetus trächtigen Rindern zu sehen war. Im Weiteren muss aber bedacht werden, dass die Antikörpertiter der genannten Autorengruppen nicht direkt mit den in dieser Studie gemessenen relativen OD-Werten zu vergleichen sind, da andere Testkits verwendet wurden.

7.3. Besamung von Kühen mit infiziertem Sperma (Gruppe B)

7.3.1. Klinische Befunde bei den Kühen der Gruppe B

Die erhöhten Körpertemperaturen der Kuh 1 und 2 an den Tagen 49 und 50 nach der Insemination stehen in keinem Zusammenhang mit den Blutbefunden. Die Tiere hatten bereits viel früher, am Tag 21 (Kuh 2) bzw. am Tag 28 (Kuh 1) serokonvertiert. Nach der Untersuchung am Tag 42 stagnierten (Kuh 1) bzw. sanken (Kuh 2) die OD-Werte. Der starke Temperaturanstieg lässt sich damit erklären, dass die Tiere an diesen Tagen erstmals auf die Weide gelassen wurden und sich beim Auslauf dementsprechend übermütig benahmen. Diese Annahme unterstützt, dass auch beim Kontrolltier, welches nicht infiziert wurde, am Tag 49 ein leichter Temperaturanstieg (39.1°C) gemessen wurde.

7.3.2. Virologische Blutuntersuchungen bei den Kühen der Gruppe B

Serologische Untersuchung (ELISA)

Es existieren bisher keine Angaben darüber, ob eine Insemination von seronegativen Kühen mit Sperma, das BD-Virus enthält, zu einer Infektion mit Bildung von spezifischen Antikörpern führt. Im vorliegenden Versuch wurde nachgewiesen, dass alle fünf Kühe, welche mit virushaltigem Sperma besamt wurden, bis spätestens 28 Tage nach der Insemination serokonvertiert hatten und dass die Titer bis zum Tag 42 stetig angestiegen waren. Darauf blieben sie während 14 Tagen in etwa auf diesem Niveau. Währenddessen blieb das Kontrolltier trotz Kontakt zu den infizierten Tieren stets seronegativ.

Ähnliche Anstiege der Antikörpertiter wurden nach der Besamung von seronegativen Schafen mit BDV-infiziertem Sperma und nach dem Decken mit einem pi-Schafbock beobachtet (GARDINER und BARLOW, 1981). Innerhalb von 10 bis 30 Tagen nach der Besamung bzw. nach dem Deckakt wiesen im Blut alle Mutterschafe Antikörper gegen das BD-Virus auf. Rinder, welche mit Sperma eines pi-BVDV-Stiers besamt wurden, serokonvertierten bereits innerhalb von 14 Tagen nach der Insemination. Rinder, welche mit Virus-freiem Sperma besamt wurden,

blieben seronegativ, obschon sie wie im vorliegenden Experiment Kontakt zu den infizierten Tieren hatten (MEYLING und MIKÉL JENSEN, 1988).

Serumneutralisationstest

Alle fünf Kühe wiesen am Tag 56 nach der Besamung hohe Werte an BDV-neutralisierenden Antikörpern auf, während nur geringgradige Titer BVDV-neutralisierender Antikörper gefunden wurden. Der Nachweis von geringen Titern BVDV-neutralisierender Antikörper lässt sich analog der Gruppe A mit der partiellen Kreuzneutralisation innerhalb des Genus der Pestiviren erklären. In der vorliegenden Untersuchung waren die Titer der Kühe gegen das Border-Disease-Virus zwischen 13 und 28 Mal höher als diejenigen gegen das BVD-Virus. Da Tiere mit einem mindestens vierfach höheren Titer als mit BDV infiziert angesehen werden (BRAUN et al., 2013b), lässt sich daraus schliessen, dass es sich auch in diesem Versuch bei allen Kühen um eine spezifische Antikörperbildung gegen eine Infektion mit dem Border-Disease-Virus handelte.

Trächtigkeitsuntersuchung

Unbeantwortet bleibt die Frage, ob durch eine Besamung seronegativer Kühe persistent mit BDV infizierte Feten generiert werden können, da es bei keinem Tier zu einer Trächtigkeit kam. Aufgrund der schlechten Spermaqualität (Spermiedichte, Anteil normaler Spermien und Motilität) wurde die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Trächtigkeit als sehr gering beurteilt. Es ist bereits bekannt, dass eine persistente Infektion mit BDV beim Schafbock (GARDINER und BARLOW, 1981) bzw. BVDV beim Stier zu einer verminderten Spermaqualität führen kann (PATON et al., 1990) und dass dadurch die Fruchtbarkeitsrate einer Herde reduziert wird (KIRKLAND et al., 1994). Ein erster Hinweis für einen ähnlichen Einfluss einer persistenten BDV-Infektion eines Stiers auf die Fruchtbarkeit der Herde wurde erst kürzlich beschrieben (McFADDEN et al., 2012). Aufgrund der Erkenntnisse aus Inseminationsversuchen mit persistent mit BDV infiziertem Sper-

ma bei Mutterschafen (GARDINER and BARLOW, 1981) bzw. mit BVDV infiziertem Sperma bei Rindern (MEYLING and MIKÉL JENSEN, 1988; KIRKLAND et al., 1994) ist davon auszugehen, dass bei der Befruchtung von Rindern mit persistent mit BDV infiziertem Sperma mit pi-Feten gerechnet werden muss.

7.4. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein persistent mit Border-Disease-Virus infiziertes Rind Ursprung für weitere Infektionen bei Rindern ist und durch Kontaktinfektion während der Trächtigkeit pi-Tiere generiert werden können. Wie schon in früheren Arbeiten gezeigt, kommen in der schweizerischen Rinderpopulation transiente und persistente Infektionen mit dem BD-Virus natürlicherweise vor (BRAUN et al., 2013a, 2013b). In Anbetracht dessen, dass Rinder sowohl über persistent infizierte Schafe (KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2008b; REICHLE, 2009; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a) als auch über persistent infizierte Rinder mit BDV infiziert werden können und eine solche Infektion während der Trächtigkeit in viele Fällen zu einem Abortgeschehen führen kann (GIBBONS et al., 1974; KRAMETTER-FRÖTSCHER et al., 2010a) sollte das BD-Virus im Rahmen des BVDV-Eradikations- und Überwachungsprogramms in der Schweiz nicht ausser Acht gelassen werden. Es konnte zwar bis heute mit Hilfe des Eradikationsprogramms eine starke Verringerung der Prävalenz von pi-BVDV-Tieren erzielt werden. Es ist jedoch fraglich, ob das Ziel, die Seuche in der Schweiz auszurotten, erreicht wird, ohne die beiden Infektionen zu differenzieren und weitere empfängliche Tierarten wie Schafe, Ziegen und Wildruminanten in den Ausrottungsprozess miteinzubeziehen. Mit der Verringerung der Anzahl pi-BVDV-Rinder wird auch die Antikörperprävalenz in der Rinderpopulation sinken und die Empfänglichkeit für Pestivirus-Infektionen zunehmen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

BACHOFEN, C., H. R. VOGT, H. P. STALDER, T. MATHYS, R. ZANONI, M. HILBE, M. SCHWEIZER and E. PETERHANS (2013): Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Vet. Res.* 44:32.

BARLOW, R. M., J. T. VANTSIS, A. C. GARDINER, J. C. RENNIE, J. A. HERRING and F. M. M. SCOTT (1980): Mechanisms of natural transmission of border disease. *J. Comp. Pathol.* 90, 57-65.

BARLOW, R. M., P. F. NETTLETON, A. C. GARDINER, A. GREIG, J. R. CAMPBELL and J. M. BONN (1986): Persistent bovine virus diarrhoea virus infection in a bull. *Vet. Rec.* 118, 321-324.

BECHER, P., G. MEYERS, A. D. SHANNON and H.-J. THIEL (1996): Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J. Virol.* 70, 2992-2998.

BECHER, P., M. ORLICH, A. D. SHANNON, G. HORNER, M. KÖNIG and H.-J. THIEL (1997): Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J. Gen. Virol.* 78, 1357-1366.

BECHER, P., R. AVALOS RAMIREZ, M. ORLICH, S. CEDILLO ROSALES, M. KÖNIG, M. SCHWEIZER, H. STALDER, H. SCHIRRMEIER and H.-J. THIEL (2003): Genetic and antigenetic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96-104.

BOSTEDT, H. und K. DEDIÉ (1996): Border Krankheit. In: Schaf- und Ziegenkrankheiten, Hrsg. H. Bostedt und K. Dedié. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 487-491.

BRAUN, U., M. HILBE, F. EHRENSPERGER, F. SALIS, P. ALTHER, M. STRASSER, H. P. STALDER and E. PETERHANS (2002): Border disease in a flock of sheep. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 144, 419-426.

BRAUN, U., F. SALIS und M. HILBE (2004): Kontaktinfektion von Lämmern bei gemeinsamer Haltung mit einem persistent mit Border-Disease-Virus infizierten Lamm. *Tierärztl. Umschau* 59, 371-373.

BRAUN, U., C. BACHOFEN, R. BÜCHI, M. HÄSSIG and E. PETERHANS (2013a): Infection of cattle with border disease virus by sheep on communal alpine pastures. Schweiz. Arch. Tierheilk. 155, 123-128.

BRAUN, U., C. BACHOFEN, B. SCHENK, M. HÄSSIG and E. PETERHANS (2013b): Investigation of border disease and bovine virus diarrhoea in sheep from 76 mixed cattle and sheep farms in eastern Switzerland. Schweiz. Arch. Tierheilk. 155, 293-298.

BROADDUS, C. C., G. R. HOLYOAK, L. DAWSON, D. L. STEP, R. A. FUNK and S. KAPIL (2007): Transmission of bovine viral diarrhea virus to adult goats from persistently infected cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 545-548.

BROADDUS, C. C., C. G. LAMM, S. KAPIL, L. DAWSON and G. R. HOLYOAK (2009): Bovine viral diarrhea virus abortion in goats housed with persistently infected cattle. Vet. Pathol. 46, 45-53.

BROWNIE J. (1990): The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 9, 43-59.

BROWNIE, J., L. B. HOOPER, I. THOMPSON and M. E. COLLINS (1998): Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) – the bovine pestivirus. Clin. Diagn. Virol. 10, 141-150.

BÜCHI, R. (2009): Epidemiologische Untersuchungen über die Ansteckung von Rindern durch mit Border-Disease-Virus infizierte Schafe auf Alpweiden. Dissertation, Universität Zürich.

CAFFREY, J. F., A. M. DUDGEON, W. J. C. DONNELLY, B. J. SHEAHAN and G. J. ATKINS (1997): Morphometric analysis of growth retardation in fetal lambs following experimental infection of pregnant ewes with Border Disease virus. Res. Vet. Sci. 62, 245-248.

CAMPBELL, J. R., O. M. RADOSTITS, J. T. WOLFE and E. D. JANZEN (1995): An outbreak of border disease in a sheep flock. Can. Vet. J. 36, 307-309.

CARLSSON, U. (1991): Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. Vet. Rec. 128, 145-147.

CARLSSON, U. and K. BELÁK (1994): Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. Acta Vet. Scand. 35, 79-88.

CASAUBON, J., H. R. VOGT, H. STALDER, C. HUG and M. P. RYSER-DE-GIORGIS (2012): Bovine viral diarrhea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Vet. Res.* 8:204.

COLLINS M. E., M. DESPORT and J. BROWNLIE (1999): Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology* 259, 85-98.

CRANWELL, M. P., A. OTTER, J. ERRINGTON, R. A. HOGG, P. WAKELEY and T. SANDVIK (2007): Detection of border disease virus in cattle. *Vet. Rec.* 161, 211-212.

CRAVERO, G. C., R. FATZER and R. FANKHAUSER (1975): Border-Krankheit (Hypomyelogenesis congenita) bei Lämmern in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 117, 119-121.

DANUSER, R., H. R. VOGT, T. KAUFMANN, E. PETERHANS and R. ZANNONI (2009): Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 151, 109-117.

DEPNER, K., O. J. B. HÜBSCHLE and B. LIESS (1991): BVD-virus infection in goats – experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 253-256.

DOMINGO E., J. SHELDON and C. PERALES (2012): Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 159-216.

DÜNSER, M., M. ALTMANN, J. DENGG, M. EICHINGER, A. LOITSCH, S. REVILLA-FERNÁNDEZ und H. SCHWEIGHARDT (2005): Nachweis einer persistierenden Infektion des Genitaltraktes mit dem Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV) bei einem nicht immuntoleranten Besamungstier. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 92, 1-6.

FRAY, M. D., D. J. PATON and S. ALENIUS (2000): The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 615-627.

FRITZEMEIER, J., L. HAAS, E. LIEBLER, V. MOENNIG und I. GREISER-WILKE (1997): The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch. Virol.* 142, 1335-1350.

GARD, J. A., M. D. GIVENS and D. A. STRINGFELLOW (2007): Bovine viral diarrhea virus (BVDV): Epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology* 68, 434-442.

GARDINER, A. C. and R. M. BARLOW (1981): Vertical transmission of Border disease infection. *J. Comp. Pathol.* 91, 467-470.

GIAMMARIOLI, M., S. A. LA ROCCA, F. STEINBACH, C. CASCIARI and G. M. DE MIA (2011): Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Vet. Microbiol.* 147, 231-236.

GIANGASPERO, M. (2011): Genetic variation of Border disease virus species strains. *Vet. Ital.* 47, 415-435.

GIBBONS, D. F., C. E. WINKLER, I. G. SHAW, S. TERLECKI, C. RICHARDSON and J. T. DONE (1974): Pathogenicity of the border disease agent for the bovine foetus. *Br. Vet. J.* 130, 357-361.

GIVENS, M. D., A. M. HEATH, K. V. BROCK, B. W. BRODERSEN, R. L. CARSON and D. A. STRINGFELLOW (2003): Detection of bovine viral diarrhea virus in semen obtained after inoculation of seronegative postpubertal bulls. *Am. J. Vet. Res.* 64, 428-434.

GIVENS, M. D., K. P. RIDDELL, P. H. WALZ, J. RHOADES, R. HARLAND, Y. ZHANG, P. K. GALIK, B. W. BRODERSEN, A. M. COCHRAN, K. V. BROCK, R. L. CARSON and D. A. STRINGFELLOW (2007): Noncytopathic bovine viral diarrhea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peripubertal bulls but prevents subsequent infection. *Vaccine* 25, 867-876.

GIVENS, M. D., K. P. RIDDELL, M. A. EDMONDSON, P. H. WALZ, J. A. GARD, Y. ZHANG, P. K. GALIK, B. W. BRODERSEN, R. L. CARSON and D. A. STRINGFELLOW (2009): Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 139, 42-51.

GIVENS, M. D. and M. S. MARLEY (2013): Immunology of chronic BVDV infections. *Biologicals* 41, 26-30.

GROOMS, D. L. (2004): Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20, 5-19.

HANSEN, T. R., N. P. SMIRNOVA, H. VAN CAMPEN, M. L. SHOEMAKER, A. A. PTITSYN and H. BIELEFELDT-OHMANN (2010): Maternal and fetal re-

sponse to fetal persistent infection with bovine viral diarrhea virus. Am. J. Reprod. Immunol. 64, 295-306.

HANCOCK, J. L. (1957): The morphology of boar spermatozoa. J. R. Microsc. Soc. 76, 84-97.

HILBE, M., P. OSSENT, K. ZLINSZKY and F. EHRENSPERGER (2000): Abnormal bone development associated with bovine virus diarrhea virus (BVDV) infection in a newborn calf. Eur. J. Vet. Pathol. 6, 115-119.

HILBE, M., A. ARQUINT, P. SCHALLER, K. ZLINSZKY, U. BRAUN, E. PETERHANS and F. EHRENSPERGER (2007a): Immunohistochemical diagnosis of persistent infection with bovine viral diarrhea virus (BVDV) on skin biopsies. Schweiz. Arch. Tierheilk. 149, 337-344.

HILBE, M., H. STALDER, E. PETERHANS, M. HAESSIG, M. NUSSBAUMER, C. EGLI, C. SCHELP, K. ZLINSZKY and F. EHRENSPERGER (2007b): Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhea virus infection in calves. J. Vet. Diagn. Invest. 19, 28-34.

HILBE, M., U. CAMENISCH, U. BRAUN, E. PETERHANS, H. P. STALDER, K. ZLINSZKY and F. EHRENSPERGER (2009): Mucosal lesions in a sheep infected with border disease virus (BDV). Schweiz. Arch. Tierheilk. 151, 391-396.

HORNBERG, A., S. R. FERNÁNDEZ, C. VOGL, S. VILČEK, M. MATT, M. FINK, J. KÖFER and K. SCHÖPF (2009): Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. Vet. Microbiol. 135, 205-213.

HURTADO, A., I. SANCHEZ, F. BASTIDA, E. MINGUIJÓN, R. A. JUSTE and A. L. GARCÍA-PÉREZ (2009): Detection and quantification of pestivirus in experimentally infected pregnant ewes and their progeny. Virol. J. 6:189.

KASIMANICKAM, R., J. C. COLLINS, J. WUENSCHELL, J. C. CURRIN, J. B. HALL and D. W. WHITTIER (2006): Effect of timing of prostaglandin administration, controlled internal drug release removal and gonadotropin releasing hormone administration on pregnancy rate in fixed-time AI protocols in crossbred Angus cows. Theriogenology 66, 166-172.

KELLING, C. L. and C. L. TOPLIFF (2013): Bovine maternal, fetal and neonatal response to bovine viral diarrhea virus infections. Biologicals 41, 20-25.

KIRKLAND, P. D., S. G. RICHARDS, J. T. ROTHWELL and D. F. STANLEY (1991): Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract

and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 128, 587-590.

KIRKLAND, P. D., S. G. MACKINTOSH and A. MOYLE (1994): The outcome of widespread use of semen from a bull persistently infected with pestivirus. *Vet Rec.* 135, 527-529.

KIRKLAND, P. D., M. R. McGOWAN, S. G. MACKINTOSH and A. MOYLE (1997): Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet. Rec.* 140, 124-127.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., A. LOITSCH, H. KOHLER, A. SCHLEINER, P. SCHIEFER, K. MÖSTL, F. GOLJA and W. BAUMGARTNER (1996): Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. *J. Vet. Med. B* 53, 48-50.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., C. SCHMITZ, V. BENETKA, Z. BAGÓ, K. MÖSTL, E. VANEK and W. BAUMGARTNER (2008a): First descriptive study of an outbreak of border disease in a sheep flock in Austria – a high risk factor for bovine viral diarrhea virus free cattle herds: a case report. *Vet. Med. (Praha)* 53, 625-628.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., V. BENETKA, K. MÖSTL and W. BAUMGARTNER (2008b): Transmission of border disease virus from sheep to calves – a possible risk factor for the Austrian BVD eradication programme in cattle? *Wien. Tierärztl. Mschr.* 95, 200-203.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., N. MASON, J. RÖTZEL, V. BENETKA, Z. BAGÓ, K. MÖSTL and W. BAUMGARTNER (2010a): Effects of border disease virus (genotype 3) naturally transmitted by persistently infected sheep to pregnant heifers and their progeny. *Vet. Med. (Praha)* 55, 145-153.

KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., M. DÜNSER, B. PREYLER, A. THEINER, V. BENETKA, K. MÖSTL and W. BAUMGARTNER (2010b): Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Vet. J.* 186, 342-346.

LEBLANC, N., M. LEIJON, M. JOBS, J. BLOMBERG and S. BELÁK (2010): A novel combination of TaqMan RT-PCR and a suspension microarray assay for the detection and species identification of pestivirus. *Vet. Microbiol.* 142, 81-86.

LINDBERG, A., H. GROENENDAAL, S. ALENIUS and U. EMANUELSON (2001): Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral diarrhoea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. *Prev. Vet. Med.* 51, 199-214.

LØKEN, T., I. BJERKÅS and B. HYLLSETH (1982): Border disease in goats in Norway. Res. Vet. Sci. 33, 130-131.

LØKEN, T. and I. BJERKÅS (1991): Experimental pestivirus infections in pregnant goats. J. Comp. Pathol. 105, 123-140.

LØKEN, T., J. KROGSRUD and I. BJERKÅS (1991): Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. J. Comp. Pathol. 104, 195-209.

LUNSTRA D. D., J. J. FORD and S. E. ECHTERNKAMP (1978): Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. J. Anim. Sci. 46, 1054-1062.

MARCO, I., J. R. LÓPEZ-OLVERA, R. ROSELL, E. VIDAL, A. HURTADO, R. JUSTE, M. PUMAROLA and S. LAVÍN (2007): Severe outbreak of disease in the Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) associated with border disease virus infection. Vet. Microbiol. 120, 33-41.

MARCO, I., R. ROSELL, O. CABEZÓN, G. MENTABERRE, E. CASAS, R. VELARDE, J. R. LÓPEZ-OLVERA, A. HURTADO and S. LAVÍN (2008): Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). Vet. Microbiol. 127, 29-38.

MAYR, A. und O.-R. KAADEN (2007): Viruskrankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Hrsg. M. Rolle und A. Mayr. Enke Verlag, Stuttgart, 136-343.

McFADDEN, A. M. J., D. J. TISDALL, F. I. HILL, P. OTTERSON, D. PULFORD, J. PEAKE, C. J. FINNEGANT, S. A. LA ROCCA, T. KOK-MUN and A. M. WEIR (2012): The first case of a bull persistently infected with border disease virus in New Zealand. New Zeal. Vet. J. 60, 290-296.

MEYLING, A. and A. MIKÉL JENSEN (1988): Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull. Vet. Microbiol. 17, 97-105.

MOENNIG, V. (1990): Pestiviruses: a review. Vet. Microbiol. 23, 35-54.

MUDRY, M., M. MEYLAN, G. REGULA, A. STEINER, R. ZANONI and P. ZANOLARI (2010): Epidemiological study of pestiviruses in South American camelids in Switzerland. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 1218-1223.

NAGAI, M., M. HAYASHI, M. ITOU, T. FUKUTOMI, H. AKASHI, H. KIDA and Y. SAKODA (2008): Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes* 36, 135-139.

NETTLETON, P. F. (1987): Pathogenesis and epidemiology of border disease. *Ann. Rech. Vet.* 18, 147-155.

NETTLETON, P. F. (1990): Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9, 131-150.

NETTLETON, P. F. and G. ENTRICAN (1995): Ruminant pestiviruses. *Br. Vet. J.* 151, 615-642.

NETTLETON, P. F., J. A. GILRAY, P. RUSSO and E. DLISSI (1998): Border disease of sheep and goats. *Vet. Res.* 29, 327-340.

NETTLETON, P. and K. WILLOUGHBY (2008): Border Disease. In: *Encyclopedia of Virology*, Eds. B. W. J. Mahy and M. H. V. Van Regenmortel. Academic Press, Oxford, 335-341.

NJAA, B. L., E. G. CLARK, E. JANZEN, J. A. ELLIS and D. M. HAINES (2000): Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 393-399.

NUSS, K., A. SPIESS, M. HILBE, K. STERR, M. REISER and U. MATIS (2005): Transient benign osteopetrosis in a calf persistently infected with bovine virus diarrhea virus. *Vet. Comp. Orthopaed.* 18, 100-104.

O'CONNOR, B. P. and C. E. DOIGE (1993): Abnormal modelling of trabecular bone in calves. *Can. J. Vet. Res.* 57, 25-32.

OGUZOGLU, T. C., M. T. TAN, N. TOPLU, A. B. DEMIR, S. BILGE DAĞALP, T. KARAOGLU, A. OZKUL, F. ALKAN, I. BURGU, L. HAAS and I. GREISER-WILKE (2009): Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: a new BDV subgroup? *Vet. Microbiol.* 135, 374-379.

OSBURN, B. I. and G. CASTRUCCI (1991): Diaplacental infections with ruminant pestiviruses. *Arch. Virol. Suppl.* 3, 71-78.

PALMER, C.W. (2005): Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology* 64, 469-479.

PATON, D., S. BROCKMANN and L. WOOD (1990): Insemination of susceptible and preimmunized cattle with bovine viral diarrhoea virus infected semen. *Br. Vet. J.* 146, 171-174.

PEDRERA, M., P. J. SÁNCHEZ-CORDÓN, J. L. ROMERO-TREVEJO, M. A. RISALDE, I. GREISER-WILKE, A. NÚÑEZ and J. C. GÓMEZ-VILLAMANDOS (2009): Morphological changes and virus distribution in the ileum of colostrum-deprived calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype-1. *J. Comp. Pathol.* 141, 52-62.

PETERHANS, E., C. BACHOFEN, H. STALDER and M. SCHWEIZER (2010): Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.* 41:44.

PETERSON C., A. ALKAR, S. SMITH, S. KERR, J. B. HALL, D. MOORE and R. KASIMANICKAM (2011): Effects of one versus two doses of prostaglandin F2alpha on AI pregnancy rates in a 5-day, progesteron-based, CO-Synch protocol in crossbred beef heifers. *Theriogenology* 75, 1536-1542.

PIOZ, M., A. LOISON, P. GIBERT, D. DUBRAY, P. MENAUT, B. LE TALLEC, M. ARTOIS and E. GILOT-FROMONT (2007): Transmission of a pestivirus infection in a population of Pyrenean chamois. *Vet. Microbiol.* 119, 19-30.

PLETNEV, A., E. GOULD, F. X. HEINZ, G. MEYERS, H.-J. THIEL, J. BUKH, K. STIASNY, M. S. COLLETT, P. BECHER, P. SIMMONDS, C. M. RICE and T. P. MONATH (2011): Flaviviridae. In: *Virus Taxonomy*. Eds. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz, Academic Press, Oxford, 1003-1020.

PRATELLI, A., V. MARTELLA, F. CIRONE, D. BUONAVOGLIA, G. ELIA, M. TEMPESTA and C. BUONAVOGLIA (2001): Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. *J. Virol. Methods* 94, 81-85.

RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, K. W. HINCHCLIFF and P. D. CONSTABLE (2007a): Bovine virus diarrhea, mucosal disease. Bovine pestivirus disease complex. In: *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*. Saunders Elsevier, Philadelphia, 1248-1277.

RADOSTITS, O. M., C. C. GAY, K. W. HINCHCLIFF and P. D. CONSTABLE (2007b): Border disease (hairy shaker disease of lambs, hairy shakers, hypomyelogenesis congenital). In: Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats. Saunders Elsevier, Philadelphia, 1414-1418.

REED, L. J. and H. MUENCH (1938): A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-497.

REICHERT, C. (2009): Infektion von Kälbern, Schafen und Ziegen mit Border-Disease-Virus. Dissertation, Universität Zürich.

REICHLE, S. F. (2009): Untersuchungen bei Kälbern, die mit Border-Disease infizierten Lämmern zusammengehalten werden. Dissertation, Universität Zürich.

RÜSSE I. und E. GRUNERT (1993): Die normale Gravidität. In: Tiergeburtshilfe, J. Richter und R. Götze, Hrsg. E. Grunert und K. Arbeiter. Paul Parey, Berlin und Hamburg, 29-82.

SAWYER, M. M. (1992): Border disease of sheep: The disease in the newborn, adolescent and adult. Comp. Immunol. Microb. 15, 171-177.

SCHENK, B. (2012): Border-Disease-Infektionen in Betrieben mit gleichzeitiger Schaf- und Rinderhaltung. Dissertation, Universität Zürich.

SCRUGGS, D. W., S. A. FLEMING, W. R. MASLIN and A. W. GRACE (1995): Osteopetrosis, anemia, thrombocytopenia, and marrow necrosis in beef calves naturally infected with bovine virus diarrhea virus. J. Vet. Diagn. Invest. 7, 555-559.

SMIRNOVA, N. P., H. BIELEFELDT-OHMANN, H. VAN CAMPEN, K. J. AUSTIN, H. HAN, D. L. MONTGOMERY, M. L. SHOEMAKER, A. L. VAN OLPHEN and T. R. HANSEN (2008): Acute non-cytopathic bovine viral diarrhea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. Virus Res. 132, 49-58.

STALDER, H. P., P. MEIER, G. PFAFFEN, C. WAGECK-CANAL, J. RÜFENACHT, P. SCHALLER, C. BACHOFEN, S. MARTI, H. R. VOGT and E. PETERHANS (2005): Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. Prev. Vet. Med. 72, 37-41.

STOKSTAD, M., R. NISKANEN, A. LINDBERG, P. THORÉN, S. BELÁK, S. ALENIUS and T. LØKEN (2003): Experimental infection of cows with bovine vi-

ral diarrhoea virus in early pregnancy – findings in serum and foetal fluids. *J. Vet. Med. B* 50, 424-429.

STRONG, R., S. A. LA ROCCA, G. IBATA and T. SANDVIK (2010): Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle. *Vet. Microbiol.* 141, 208-215.

THABTI, F., L. FRONZAROLI, E. DLISSI, J. M. GUIBERT, S. HAMMAMI, M. PEPIN and P. RUSSO (2002): Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet. Res.* 33, 35-45.

THÜR, B., K. ZLINSKY and F. EHRENSPERGER (1996): Immunhistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in skin biopsies: A reliable and fast diagnostic tool. *J. Vet. Med. B* 43, 163-166.

THÜR, B., M. HILBE, M. STRASSER and F. EHRENSPERGER (1997): Immunhistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1371-1375.

VALDAZO-GONZÁLEZ, B., M. ALVAREZ-MARTÍNEZ and T. SANDVIK (2007): Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Vet. J.* 174, 316-324.

VILČEK, S. (1994): Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses. *Vet. Med. (Praha)* 39, 687-700.

VILČEK, S. and S. BELÁK (1996): Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J. Virol. Methods* 60, 103-108.

VILČEK, S., D. J. PATON, B. ĎURKOVIČ, L. STROJNY, G. IBATA, A. MOUSSA, A. LOITSCH, W. ROSSMANITH, S. VEGA, M. T. SCICLUNA and V. PAIFI (2001): Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 146, 99–115.

VILČEK, S. and P. F. NETTLETON (2006): Pestivirus in wild animals. *Vet. Microbiol.* 116, 1-12.

VOGES, H., G. W. HORNER, S. ROWE and G. J. WELLENBERG (1998): Persistent bovine pestivirus infection localized in the testes of an immuno-competent, non-viraemic bull. *Vet. Microbiol.* 61, 165-175.

WEBB, B. T., R. W. NORRDIN, N. P. SMIRNOVA, H. VAN CAMPEN, C. M. WEINER, A. Q. ANTONIAZZI, H. BIELEFELDT-OHMANN and T. R. HANSEN (2012): Bovine viral diarrhea virus cyclically impairs long bone trabecular modeling in experimental persistently infected fetuses. *Vet. Pathol.* **49**, 930-940.

WOLF, F. R., J. O. ALMQUIST and E. B. HALE (1965): Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J. Anim. Sci.* **24**, 761-765.

WOLF, G. und M. BÜTTNER (1994): Klinik und Diagnostik der Border disease. *Tierärztl Prax.* **22**, 35-38.

9. LEBENSLAUF

Sandra Frei

15. Juli 1986	geboren in Hendschiken (AG)
Heimatort	Ehrendingen (AG)
1993 - 1998	Primarschule in Hendschiken (AG)
1998 - 2002	Bezirksschule in Dottikon (AG)
2002 - 2003	Alte Kantonsschule in Aarau (AG)
2003 - 2004	The Blake Upper School in Minneapolis, Minnesota, USA
2004 - 2006	Alte Kantonsschule in Aarau (AG)
2006 - 2011	Studium der Veterinärmedizin an der Uni- versität Zürich
12.2011 – 1.2014	Assistentin und Doktorandin am Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
ab 2.2014	Assistentin am gleichnamigen Departement der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zü- rich.

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigebragen haben, ganz herzlich bedanken:

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun für die Vergabe des interessanten Themas, die Übernahme des Referats, die stete Hilfsbereitschaft und die wertvollen Anregungen.

Herrn PD Dr. M. Schweizer für die Übernahme des Korreferats.

Herrn PD Dr. M. Schweizer und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Virologie der Universität Bern für die virologischen und serologischen Untersuchungen der verschiedenen Proben. Im Speziellen danke ich Herrn Schweizer für die stets geduldige und kompetente Unterstützung und Hilfestellung in fachlichen Belangen und Fragen.

Herrn Prof. Dr. F. Janett für die unersetzliche Hilfe bei der Beschaffung der Tiere und deren Betreuung in allen gynäkologischen und andrologischen Belangen. Ich danke Herrn Janett für die Zeit, die er sich während der gesamten Projektdauer für mich genommen hat.

Frau Dr. M. Hilbe und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Veterinärpathologie für die Durchführung der Sektionen und die weiterführenden histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der Proben. Ich danke Frau Hilbe für die stets geduldige und kompetente Beantwortung aller fachlichen Fragen.

Herrn Prof. Dr. M. Hässig für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Herrn Dr. J. Risi und Herrn Dr. T. Linggi, Veterinäramt der Urkantone, für die Vermittlung des persistent mit BDV infizierten Kalbes.

Herzlichen Dank an Herrn Hanspeter Müller für die hervorragende und stets zuverlässige Pflege und Betreuung der Tiere am Alten Strickhof und die geduldige Hilfestellung bei den Probeentnahmen.

Den Studierenden Patricia Hirsiger, Lara Heimgartner, Roman Ruf, sowie den ehemaligen Studenten Rolf Figi und Adrian Schweizer für die Hilfe bei der Betreuung der Tiere am Alten Strickhof.

Allen Tierpflegerinnen und Tierpflegern für die Haltung und Fütterung des pi-BDV-Kalbes Erich während seines Aufenthalts am Tierspital Zürich.

Frau Dr. Luzia Trösch, Frau Dr. Julia Ruf-Ritz, Frau Theresa Tschaner und Frau Carina Brammertz für die wertvolle Unterstützung in der Zeit der Probenentnahmen und die stets aufmunternden und bereichernden Gespräche.

Meinem Vater Urs Frei und seiner Lebensgefährtin Juliette Urech für die unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen und den steten Glauben an mich.

Meiner Mutter Irène Denzler-Wirz und meiner Grossmutter Vreni Stalder-Estermann für die liebevolle Unterstützung und die stets aufmunternden Worte während dem Erstellen der Dissertation und zu allen Zeiten. An dieser Stelle möchte ich meines verstorbenen Grossvaters Bruno Stalder gedenken und ihm für alles danken.

Meinen Geschwistern Melanie Christen-Frei und Patrick Frei für die geschwisterliche Liebe und Unterstützung.

Meinem Freund Michel Woodtli danke ich von ganzem Herzen für seine Liebe, Unterstützung und Geduld während der gesamten Dissertationszeit.