

Institut für Virologie und Immunologie

In Kooperation mit der Vetsuisse-Fakultät Universität Bern

Leiter: Prof. Dr. Volker Thiel

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von

Prof. Dr. Reto Zanoni und PD Dr. Matthias Schweizer

**Einfluss des Border Disease Virus bei Kleinwiederkäuern auf die serologische
Überwachung und Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhoe bei Rindern in der Schweiz**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Vetsuisse-Fakultät Universität Bern

vorgelegt von

Vanessa Lisa Kaiser

Tierärztin

von Leuzigen, BE

2016

Von der Vetsuisse-Fakultät als Dissertationsschrift genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Reto Zanoni, Referent

Prof. Dr. Gertraud Schüpbach, Korreferentin

Bern,

Der Dekan der
Vetsuisse-Fakultät
Universität Bern

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	3
2. SUMMARY	4
3. EINLEITUNG	5
3.1. Wiederkäuer-Pestiviren.....	5
3.1.1. Pathogenese.....	5
3.1.2. Genotypen und Subgenotypen von BVDV und BDV	6
3.1.3. Kreuzneutralisationen	7
3.1.4. Border Disease	7
3.1.5. Interspeziesübertragung von Border Disease Virus	8
3.2. Bedeutung für das BVD-Eradikations- und Überwachungsprogramm der Schweiz	9
3.3. Ziel der Arbeit.....	10
4. MATERIAL UND METHODEN	11
4.1. Serumproben	11
4.2. Zellen	11
4.3. Anzucht der Challenge-Virusstämme für den SNT	12
4.4. Homologe Seren	14
4.5. Serumneutralisationstest.....	16
4.6. Kreuzserumneutralisationstest.....	17
4.7. Virustitration	17
4.8. Immunperoxidase-Färbung.....	18
4.9. Fall-Kontroll-Studie.....	19
4.9.1. Datenerhebung	21
4.10. Statistik	21
5. RESULTATE	22
5.1. Virusanzucht und Titerbestimmung.....	22
5.2. Quantitativer Einfluss der Virusdosen auf den AK-Titer im Kreuz-SNT	22
5.3. Selektion von BD- und BVD-Viren für den Kreuz-SNT	24
5.3.1. Koeffizient der antigenetischen Verwandtschaft (R).....	26
5.3.2. Quotienten der Kreuzneutralisationstiter	28
5.4. Geografische Verteilung der bestätigt-seropositiven Feldseren	31
5.5. Altersverteilung der untersuchten Rinder.....	33
5.6. Neutralisation und Kreuzneutralisation mit Feldseren.....	34
5.6.1. Serumtiterhöhen	34
5.6.2. Korrelation der SNT-Titer mit den OD-Werten des ELISAs	36
5.6.3. Identifikation der Infektionsquelle mittels Kreuzneutralisation	36

5.7.	Verteilung der Proben mit BDV als Infektionsquelle	39
5.8.	Fall-Kontroll-Studie.....	41
5.8.1.	Deskriptive Statistik	44
5.8.1.1.	<i>Betriebsstrukturen</i>	44
5.8.1.2.	<i>Rasse der Rinder</i>	45
5.8.1.3.	<i>Betriebe mit kleinen Wiederkäuern</i>	46
5.8.1.4.	<i>Direkte Kontakte zu betriebseigenen kleinen Wiederkäuern</i>	46
5.8.1.5.	<i>Direkte Kontakte zu nicht-betriebseigenen (Wild-) Wiederkäuern</i>	47
5.8.1.6.	<i>Indirekte Kontakte</i>	48
5.8.1.7.	<i>Zukäufe (Tierverkehr)</i>	48
5.8.2.	Univariable Analyse.....	48
5.8.3.	Logistische Regression.....	52
6.	DISKUSSION	53
7.	REFERENZEN	56
8.	DANKSAGUNG	64
9.	CURRICULUM VITAE	65
10.	ANHANG	66
10.1.	Fragebogen für Fall- und Kontrollbetriebe	66

1. Zusammenfassung

Vetsuisse-Fakultät Universität Bern 2016

Vanessa Lisa Kaiser

Institut für Virologie und Immunologie, Bern

Einfluss des Border Disease Virus bei Kleinwiederkäuern auf die serologische Überwachung und Bekämpfung der Bovinen Virusdiarrhoe bei Rindern in der Schweiz

Die serologische Überwachung der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) im Rahmen des Eradikationsprogramms in der Schweiz ist seit 2012 etabliert. Bei stetiger Abnahme der Seroprävalenz in der Rinderpopulation muss damit gerechnet werden, dass die Empfänglichkeit der Rinder für (Re-) Infektionen mit dem Border Disease (BD) Virus der kleinen Wiederkäuer zunimmt. Wegen serologischer Kreuzreaktivität von Pestiviren kann jedoch mittels ELISA nicht zwischen BVD- und BD-Virus als Infektionsquelle unterschieden werden.

In dieser Arbeit wurde die Trennschärfe des Kreuz-Serumneutralisationstests (SNT) durch die Verwendung von drei Virusstämmen BVDV-1a, BVDV-1h und BDV Swiss a optimiert. Auf dieser Basis wurde erstmals die BDV-Seroprävalenz bei seropositiven Rindern in der Schweiz bestimmt. Von 1'555 überprüften Blutproben aus dem Überwachungsprogramm wiesen 104 Proben (6,7%) aus 65 Betrieben aus 15 Kantonen signifikant höhere Titer gegen BDV als gegen BVDV auf. Die höchste BDV-Seroprävalenz wurde in der Zentralschweiz gefunden. Aufgrund von epidemiologischen Daten, die mittels Fragebogen in Fall- und Kontrollbetrieben erhoben wurden, konnte mittels logistischen Modell die gemeinsame Stallhaltung von Rindern und Schafen als bedeutendsten Risikofaktor für eine BDV-Infektion bei Rinder identifiziert werden (OR = 167; KI95%: 15 – 1'819).

Schlüsselwörter: BVDV, BDV, Serumneutralisationstest (SNT), Seroprävalenz, kleine Wiederkäuer

2. Summary

Vetsuisse Faculty University of Bern 2016

Vanessa Lisa Kaiser

Institute of Virology and Immunology, Bern

Influence of border disease virus of small ruminants on the serological surveillance and eradication of bovine virus diarrhea of cattle in Switzerland

Serological surveillance of bovine virus diarrhea (BVD) in the frame of the eradication program in Switzerland was initiated in 2012. In view of steadily decreasing pestivirus seroprevalence in the cattle population, the susceptibility for (re-) infection by border disease (BD) virus of small ruminants might increase. Due to serological cross-reactivity of pestiviruses, serological surveillance of BVD by ELISA does not distinguish between BVD- and BD-virus as source of infection.

In this work the cross serum-neutralization test (SNT) procedure was improved by the use of three strains representing the subgenotype BVDV-1a, BVDV-1h and BDV Swiss a. Thereby the BDV-seroprevalence in seropositive cattle in Switzerland was determined for the first time. Out of 1'555 tested seropositive blood samples from the surveillance program a total of 104 samples (6.7%) originating from 65 farms of 15 cantons reacted with significantly higher titers against BDV than BVDV. The highest BDV-seroprevalence was found in central Switzerland. On the base of epidemiological information collected by questionnaire in case- and control farms common housing of cattle and sheep was identified as the most significant risk factor for BDV infection in cattle (OR = 167; CI95%: 15 – 1'819) by logistic regression.

Keywords: BVDV, BDV, serum-neutralization test (SNT), seroprevalence, small ruminants

3. Einleitung

3.1. Wiederkäuer-Pestiviren

Die Gattung *Pestivirus* der Familie *Flaviviridae* umfasst die vier etablierten Spezies Border Disease Virus (BDV), Bovines Virusdiarrhoe Virus 1 (BVDV-1), Bovines Virusdiarrhoe Virus 2 (BVDV-2) und Klassisches Schweinepest-Virus (KSPV). Als mögliche weitere Spezies wurden Isolate aus Giraffen („Giraffe“), Rindern („atypical pestiviruses“), Antilopen („Pronghorn“) und Schweinen („Bungowannah“) beschrieben (Giangaspero und Harasawa, 2011; Liu et al., 2009; Ridpath, 2013; Ridpath, 2015). Pestiviren sind behüllte einzel- und positivsträngige RNA-Viren mit einem Durchmesser von 40 bis 60 nm und sphärischer Gestalt. Sie kommen in zwei verschiedenen Biotypen als cytopathogene (cp) oder nicht-cytopathogene (ncp) Stämme vor (Modrow et al., 2010). Cythopathogene Viren führen in Zellkulturen zu morphologisch erkennbaren Schädigungen von infizierten Zellen, die als cytopathischer Effekt (CPE) bezeichnet werden. Die Wiederkäuer-Pestiviren BDV und BVDV sind wichtige Pathogene mit weltweiter Verbreitung (Nettleton und Entrican, 1995). Sie können in Nutztierhaltungen grosse wirtschaftliche Verluste verursachen (Houe, 1999).

3.1.1. Pathogenese

Eine akute Infektion seronegativer, immunkompetenter Tiere mit Wiederkäuer-Pestiviren führt zu einer transienten Infektion, die häufig symptomlos oder mit milden respiratorisch-enteralen Symptomen einhergeht. Infizierte Wiederkäuer entwickeln innert 2 – 3 Wochen eine mit der Bildung von neutralisierenden Antikörpern einhergehende Immunität, die zur Elimination des Virus und Schutz vor einer neuerlichen Infektion führt (Müller-Doblies et al., 2004). In dieser Phase wird insbesondere im Speichel und Nasensekret Virus ausgeschieden, sodass es bei oronasalem Kontakt zur Virusübertragung kommen kann (Nettleton und Entrican, 1995). Bei einer akuten Infektion eines trächtigen Tieres erfolgt aufgrund der Virämie eine transplazentare Infektion des Fetus. Dies führt zu Umrindern oder Aborten (insbesondere im ersten Monat), persistenter Infektion des Fetus mit nicht-cytopathogenem Virus (40. – 120. Tag) oder zu Missbildungen (90. – 160. Tag). Zu späteren Zeitpunkten der Trächtigkeit sind Rinderfeten immunkompetent und eliminieren das Virus (Brownlie, 1990). Die persistente Infektion ist eine Folge der immunologischen Unreife zum Zeitpunkt der Infektion, sodass diese Tiere gegenüber dem infizierenden Virusstamm lebenslänglich immuntolerant bleiben und als Virusträger in allen Sekreten und Exkreten

grosse Virusmengen ausscheiden. Persistent infizierte Tiere sind als Dauerausscheider das primäre Reservoir für diese Pestiviren (Lanyon et al., 2014; Peterhans und Schweizer, 2013; Schweizer und Peterhans, 2014). Die nachgewiesene Virusmenge ist bei persistent infizierten Tieren wesentlich höher als bei transient infizierten Tieren, die nur während kurzer Zeit Virus ausscheiden (Lindberg und Houe, 2005; Negron et al., 2012; Niskanen et al., 2000; Sarrazin et al., 2014).

3.1.2. Genotypen und Subgenotypen von BVDV und BDV

Wie andere RNA-Viren weisen auch Pestiviren aufgrund der nicht vorhandenen Fehlerkorrekturfunktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase hohe Mutationsraten auf (Modrow et al., 2010), was zur Entstehung eines Spektrums an genetischen Varianten führt. Mit Hilfe der phylogenetischen Analyse konnten BVD- und BD-Viren je in mehrere verschiedene Genotypen und diese wiederum in eine Reihe von Subgenotypen eingeteilt werden. Diese Zuordnung von Isolaten dient sowohl der Klassifizierung neuer Pestiviren wie auch der Klärung epidemiologischer Fragen (molekulare Epidemiologie; Giammarioli et al., 2011; Stalder et al., 2016; Vilcek et al., 2005). Innerhalb des Genotyps (Spezies) BVDV-1 wurden bisher bis zu 18 Subgenotypen (BVDV-1a bis BVDV-1r) und innerhalb von BVDV-2 vier Subgenotypen (BVDV-2a bis BVDV-2d) beschrieben (Alpay und Yesilbag, 2015). Die BVDV-Genotyp- und Subgenotyp-Prävalenzen variieren stark nach geografischer Lokalisation, wobei die meisten BVDV-Isolate zum Genotyp BVDV-1 gehörten. Der bei Rindern bisher am häufigsten beschriebene Subgenotyp war BVDV-1b, der in 16 Ländern vorkam (Ridpath, 2010b). In einer Studie aus der Schweiz wurden mehr als 150 BVDV-1-Isolate aus Rindern mit abnehmender Häufigkeit in die vier Subgenotypen e, h, k und b eingeteilt (Stalder et al., 2005). Das Vorkommen der vier Subgenotypen wurde in einer späteren Studie bestätigt, wobei die Isolate des Subgenotyps 1h häufiger vorkamen als diejenigen des Subgenotyps 1e (Bachofen et al., 2008). Auch Border Disease Viren weisen eine grosse genetische Heterogenität auf, mit einem stetigen Zuwachs an neu entdeckten phylogenetischen Linien (Dubois et al., 2008). Zurzeit werden bis zu 7 Genotypen (BDV-1 bis BDV-7) sowie atypische Stämme innerhalb der BDV-Gruppe unterschieden (Giammarioli et al., 2011). Isolate aus Tunesien, die eine separate Gruppe zwischen BDV und Schweinepestviren bilden, wurden jedoch den BDV zugeordnet (Thabti et al., 2005). Auch Isolate aus der Schweiz bilden eine eigene phylogenetische Gruppe (BDV Swiss; Peterhans et al., 2010). In der Schweiz wurden aus Schafen auch BD-Viren des Genotyps BDV-3 isoliert (Stalder et al., 2005).

3.1.3. Kreuzneutralisationen

Für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern sind die viralen Hüllen-Glykoproteine E^{RNS}, E1 und E2 verantwortlich, wobei E2 eine immundominante Rolle zukommt (Lazar et al., 2003; Ridpath, 2010a; Van Rijn et al., 1997; Wang et al., 2015; Weiland et al., 1990). Trotz der breiten serologischen Kreuzreaktion von Pestiviren untereinander lassen sich mittels Serum-Neutralisation deutliche quantitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen (Spezies) feststellen (Becher et al., 2003; Ridpath, 2010b). Das Ausmass der Kreuzneutralisation wird sowohl durch individuelle Unterschiede der Immunantwort wie auch durch die antigenetische und genetische Verwandtschaft zwischen Virusstämmen bestimmt (Paton, 1995). Deutliche antigenetische Unterschiede wurden sowohl zwischen BDV und BVDV (Becher et al., 2003; Ridpath, 2010b; Thabti et al., 2005) wie auch innerhalb der BVDV Stämme beschrieben (Alpay und Yesilbag, 2015; Bachofen et al., 2008; Couvreur et al., 2002; Minami et al., 2011; Nagai et al., 2008; Nagai et al., 2001; Pizarro-Lucero et al., 2006).

3.1.4. Border Disease

Wie bei BVD wird die typische Klinik der Border Disease bei Lämmern beobachtet, die während der Trächtigkeit transplazentar mit dem BD-Virus in Kontakt kamen. Persistent infizierte Lämmer, die auch als „hairy shaker“ bezeichnet werden, weisen Vliesveränderungen und tonisch-klonisch Muskelkrämpfe auf, was zum Tod an einem Mucosal-Disease-ähnlichen Syndrom führen kann (García-Pérez et al., 2009; Hilbe et al., 2009; Nettleton et al., 1998; Oguzoglu, 2012). Border Disease ist bei Kleinwiederkäuern weltweit verbreitet mit sehr variablen Seroprävalenzen in Abhängigkeit der geografischen Lokalisation und Formen der Tierhaltungen (Barlow, 1990; Berriatua et al., 2004; Celedón et al., 2001; Danuser et al., 2009; Graham et al., 2001; Krametter-Froetscher et al., 2010a; Krametter-Froetscher et al., 2006; Loken et al., 1991b; Nettleton und Entrican, 1995; O'Neill et al., 2004; Okur-Gumusova et al., 2006; Tabbaa et al., 1995; Tegmeier et al., 2000; Valdazo-González et al., 2008; Yilmaz et al., 2014). Im österreichischen Bundesland Vorarlberg wurden bei Schafen und Ziegen Seroprävalenzen von 22.1% (Theiner et al., 2009) respektive 5.6% (Preyler-Theiner et al., 2009) festgestellt. Im Bundesland Kärnten betrug die Pestivirus-Seroprävalenz bei Schafen 16.3% (Schleiner et al., 2006), im Tirol 34.9% (Schiefer et al., 2006). In spanischen Lämmern wurde anhand von Proben aus 2 Schlachthöfen eine Seroprävalenz von 17.6% gefunden. In 5 von insgesamt 2'089 getesteten Seren (0.24%) wurden BD-Viren nachgewiesen (Valdazo-González et al., 2008). In der Schweiz wurde das BD-Virus erstmals von Braun et al. aus einem Schaf isoliert

(2002). Die Seroprävalenz für Border Disease bei Schafen in der Schweiz betrug in einer Studie aus dem Jahr 1995 im Durchschnitt 20% in Herdebuchbetrieben, resp. 65% in grossen Schafbeständen (Schaller et al., 2000; Schaller et al., 1995). Neuere Daten zeigten eine leicht geringere Pestivirus-Seroprävalenz von 16.1% bei Schafen und eine solche von 25.4% bei Ziegen (Danuser et al., 2009). Mittels Kreuzneutralisation konnte gezeigt werden, dass es sich bei 9% der Schafe und bei 6% der Ziegen um eine BDV-Infektion handelte. In einer weiteren Studie aus der Schweiz betrug die Pestivirus-Seroprävalenz bei Schafen, die in Betrieben in vier Ostschweizer Kantonen mit Rindern gehalten wurden 13.5% (Braun et al., 2013b). Bei keinem der 2'384 untersuchten Schafe konnten im Blut Pestiviren nachgewiesen werden.

3.1.5. Interspeziesübertragung von Border Disease Virus

Die Pestiviren der Wiederkäuer sind nicht strikt speziesspezifisch. Sie können eine Vielzahl von Wirten der Ordnung Paarhufer (Artiodactyla) infizieren (Becher et al., 1997; Doyle und Heuschele, 1983; Larska, 2015; Nettleton, 1990). Es können sowohl gegenseitige Infektionen zwischen Rindern und Schafen (Braun et al., 2014; Campbell et al., 1995; Carlsson, 1991; Carlsson und Belák, 1993; Krametter-Froetscher et al., 2008; Paton et al., 1997) wie auch Ziegen (Bachofen et al., 2013; Broaddus et al., 2007; Broaddus et al., 2009; Loken et al., 1991a) beobachtet werden.

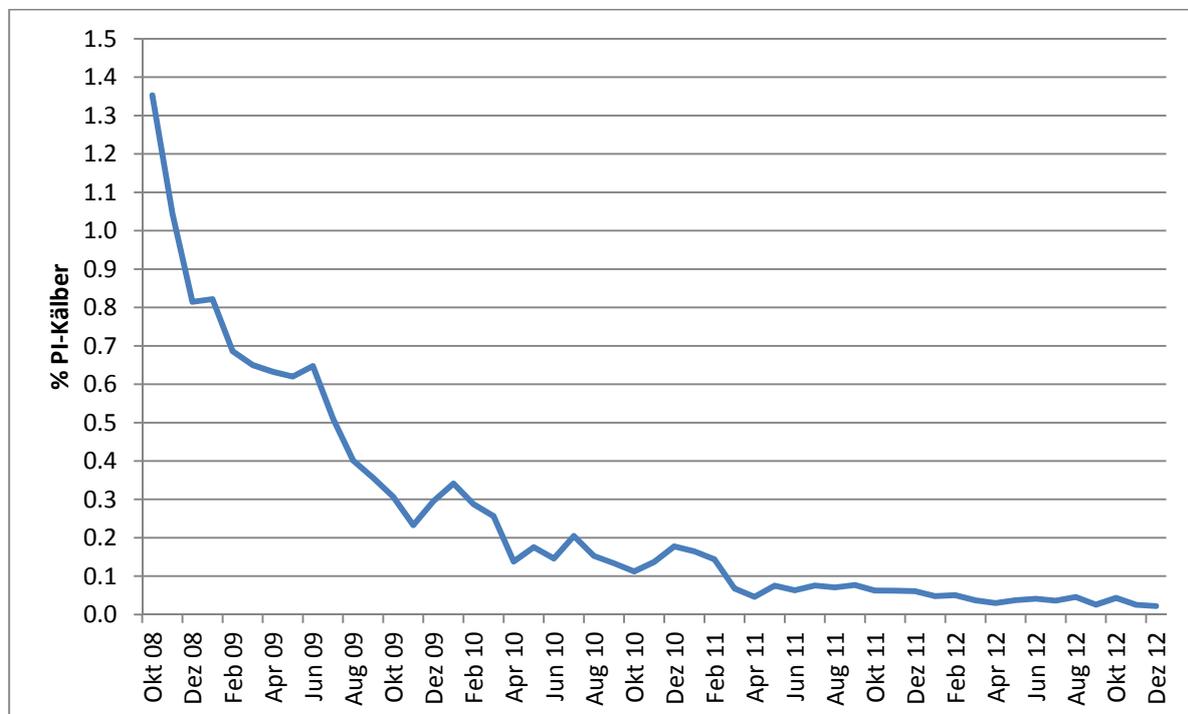
Natürliche Border Disease Virus Infektionen beim Rind wurden aus England und Wales (Cranwell et al., 2007; Strong et al., 2010), Österreich (Hornberg et al., 2009; Krametter-Froetscher et al., 2009), Italien (Schirrneier et al., 2008) und Neuseeland (McFadden et al., 2012) berichtet. Die gemeinsame Haltung von Rindern mit persistent infizierten Schafen führte zu Serokonversionen und bei trächtigen Tieren zu Aborten und verminderter Fertilität (Braun et al., 2014; Krametter-Froetscher et al., 2010b; Reichle, 2009; Strong et al., 2010). In der Schweiz wurden bislang im Rahmen der BVD-Eradikation 17 mit BD-Virus infizierte Rinder entdeckt (persönliche Mitteilung, H.P. Stalder). Nach gemeinsamer Sömmerung von Rindern mit BDV-positiven Schafen wurden BDV-spezifische Serokonversionen festgestellt (Braun et al., 2013a). Systematische Studien zur BDV-Seroprävalenz bei Rindern wurden bisher nicht publiziert.

3.2. Bedeutung für das BVD-Eradikations- und Überwachungsprogramm der Schweiz

Aufgrund der wirtschaftlichen Auswirkungen von BVDV-Infektionen bei Rindern wurden seit anfangs der 90-er Jahre in mehreren europäischen Ländern Eradikationsprogramme initiiert (Greiser-Wilke et al., 2003; Lindberg und Alenius, 1999). In der Schweiz wurde ein Eradikationsprogramm gegen BVD, das auf der Identifikation und Ausmerzung von persistent infizierten (PI-) Tieren, dem generellen Impfverbot gegen BVDV und der Anwendung von Einschränkungen des Tierverkehrs bestand, im Jahr 2008 in Angriff genommen (Zimmerli et al., 2009). Zu Beginn des Programms waren knapp 1.4% der neugeborenen Kälber persistent mit BVDV infiziert.

Nach flächendeckender Eliminierung von persistent infizierten Tieren durch systematische Kälberbeprobung betrug der Anteil der neugeborenen PI-Tiere im Dezember 2012 weniger als 0.02% (Abb. 1). Seither beruht die Bekämpfung vorwiegend auf risikobasierter, serologischer Überwachung mittels Tankmilch- und Blutproben (Di Labio, 2013). Die Seroprävalenz der Tankmilch- und Blutproben nahm seit Beginn der Untersuchungen kontinuierlich ab (Di Labio, 2015).

Abbildung 1: Prävalenz der neugeborenen persistent infizierten Kälber



Die Daten des Bundesamts für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV).

3.3. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Häufigkeit von BD-Virus Infektionen bei Rindern sowie deren möglichen Einfluss auf das serologische BVD-Überwachungsprogramm zu evaluieren. Zu diesem Zweck sollten die seropositiven Proben, die im Rahmen des BVD-Überwachungsprogramms in den Jahren 2012, 2013 und 2014 erhoben wurden, mittels Kreuz-Serumneutralisationstest (Kreuz-SNT) auf Antikörper gegen das BD-Virus überprüft werden. Der Kreuz-SNT musste zur Verbesserung der Trennschärfe modifiziert, validiert und an die epidemiologische Situation der Schweiz adaptiert werden. Parallel dazu sollten mittels einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie bedeutende Risikofaktoren für eine BDV Infektion beim Rind ermittelt werden.

4. Material und Methoden

4.1. Serumproben

Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Seren von Rindern, welche im Zeitraum von 2012 bis 2014 im nationalen Referenzlabor für BVDV – dem Institut für Veterinär-Virologie (IVV) / Virologie und Immunologie (IVI), Standort Bern – für das Vorhandensein von BVDV-Antikörpern (AK) positiv bestätigt wurden. Sie stammten von erstuntersuchenden Laboratorien, wo sie in einem BVDV-AK Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) „verdächtig“ oder „positiv“ reagierten. Als positiv bestätigt galten Proben, die im selbstentwickeltem "In-house"-ELISA (Canal et al., 1998) positiv reagierten oder andernfalls im BVDV-SNT positiv bewertet wurden. Es wurden ausschliesslich Proben von Tieren einbezogen, welche zum Zeitpunkt der Probenahme mindestens 6 Monate alt waren und nach dem 30.09.2009 geboren wurden. Falls vom selben Tier mehrere Proben im gleichen Jahr untersucht wurden, wurde nur diejenige Probe, welche im Referenzlabor chronologisch als Erste getestet wurde, in die Untersuchung einbezogen. Die Rinderseren wurden bei -20°C gelagert. Insgesamt entsprachen 1'568 Serumproben den genannten Kriterien (Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht Anzahl Serumproben (2012 - 2014)

Jahr	Anzahl Proben zu testen
2012	506
2013	536
2014	526
Total	1'568

4.2. Zellen

Für die Serumneutralisationstests sowie für die Virusrücktitrationen wurden Zellsuspensionen von embryonalen Kälber-Nasenepithelzellen (EKaNaEp, engl. "bovine turbinate cells") verwendet (Danuser et al., 2009; Mathys, 2007). Die Vermehrung von Virusisolaten in grossen Zellkulturflaschen (150 cm²) erfolgte ebenfalls auf EKaNaEp Zellen.

4.3. Anzucht der Challenge-Virusstämme für den SNT

Es wurden insgesamt 10 Wiederkäuer-Pestivirusisolate (4xBDV, 5xBVDV-1 und 1xBVDV-2) aus 10 verschiedenen Subgenotypen als Challenge-Virusstämme für den SNT ausgewählt und in Zellkultur vermehrt (Tab. 2). Alle in der Schweiz bisher isolierten Subgenotypen (BDV Swiss a, BDV Swiss b, BDV-3 und BVDV-1h, -1e, -1k, -1b) waren je mit einem Isolat vertreten. Mit Ausnahme des nordamerikanischen Stammes Oregon C24 (R1935/72, BVDV-1a, Steck et al., 1980) handelte es sich um nicht-cytopathogene Viren. Für jeden Challenge-Virusstamm wurde mittels Anzucht in grossen Zellkulturflaschen (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) mit einer Bodenfläche von 150 cm² (50 ml Zellkulturmedium mit 3 x 10⁶ EKaNäEp-Zellen bei der Aussaat) ein Virusstock hergestellt. Als Anzuchtmedium wurde E-MEM (Earle's minimal essential medium, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit 15% fötalem Kälberserum (FCS) verwendet. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit einer sterilen Pipette und Vakuumpumpe abgesaugt und der Zellrasen wurde mit 10 ml Virussuspension in E-MEM mit 7% FCS mit BVDV bzw. BDV mit einer Multiplizität der Infektion (engl. "Multiplicity of Infection"; MOI) von 0.01 beimpft. Die beimpften Zellkulturflaschen wurden anschliessend bei 37°C während einer Stunde inkubiert. Nach Zugabe von 40 ml Erhaltungsmedium mit 2% FCS wurden die Flaschen 5 Tage inkubiert und anschliessend bei -20°C eingefroren. Das cytopathogene (cp) BVDV-1a Isolat wurde gemäss mikroskopischer Beurteilung beim Auftreten eines cytopathogenen Effekts (CPE) von 80% eingefroren. Nach dem einmaligen Auftauen wurde der Inhalt 15 Minuten bei 4°C bei 10'000g zentrifugiert (HiCen® 21C Zentrifuge, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland; Rotor AS 4.13) und anschliessend wurden die Überstände aliquotiert. Die Aliquots à 0.5 ml wurden bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

Tabelle 2: Als Challenge-Virus für den SNT ausgewählte Pestivirusisolate aus Wiederkäuern

	Pestivirus	Subgenotyp	Isolat	Spezies	Quelle	Referenz
1	BDV	Swiss a	R9336/11	Rind	IVV / IVI BE	Peterhans et al., 2010
2	BDV	Swiss b	R4785/06 bzw. CH-BD4	Schaf	IVV / IVI BE	Reichert, 2009
3	BDV	3	R1343/01 bzw. CH-BD1	Schaf	IVV / IVI BE	Stalder et al., 2005
4	BDV	1a	Moredun	Schaf	G. Wolf ¹	Barlow, 1972
5	BVDV-1	1h	CH-04-01b	Rind	IVV / IVI BE	Bachofen et al., 2008
6	BVDV-1	1e	CH-Maria	Rind	IVV / IVI BE	Bachofen et al., 2008
7	BVDV-1	1k	CH-Suwa (ncp)	Rind	IVV / IVI BE	Bachofen et al., 2008
8	BVDV-1	1b	CH-04-05	Rind	IVV / IVI BE	Bachofen et al., 2008
9	BVDV-1	1a	R1935/72 (cp)	Rind	IVV / IVI BE	Steck et al., 1980
10	BVDV-2	2a	890	Rind	J. F. Ridpath ²	Bolin und Ridpath, 1992

¹Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, München, Deutschland

²National Animal Disease Center, Ames, Iowa, USA

cp = cytopathogen; ncp = nicht-cytopathogen; IVV / IVI BE = Institut für Veterinär-Virologie / Institut für Virologie und Immunologie Bern

4.4. Homologe Seren

Für jeden der 10 Subgenotypen wurde ein möglichst homologes Serum ausgewählt (Tab. 3). Bei 8 Seren handelte es sich um Schweizer Feldseren, das Antiserum gegen den Subgenotyp BVDV-1a stammte von einem Impfversuch in der Schweiz und das Antiserum gegen BVDV-2a aus Deutschland. Für den Subgenotyp BDV-1a, welcher in der Schweiz bisher nicht isoliert wurde, stand kein homologes Serum zur Verfügung. Es wurde deshalb ein hochtitriges Feldserum von einem BDV-Antikörper positivem Rind mit unbekannter Infektionsquelle verwendet. Die Seren gegen die Subgenotypen BVDV-1e und -1b waren homolog zu den jeweiligen Virusisolaten aus den Herkunftsbeständen. Die Seren wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Homologe Seren für den Kreuzneutralisationstest

	Pestivirus	Subgenotyp	Spezies	Beschreibung	Quelle
1	BDV	Swiss a	Rind	Mutter von PI-Tier	IVV / IVI BE
2	BDV	Swiss b	Rind	TI-Tier	IVV / IVI BE
3	BDV	3	Rind	Mutter von PI-Tier	IVV / IVI BE
4	BDV	1a	Rind	BDV-AK positives Tier	IVV / IVI BE
5	BVDV-1	1h	Rind	Kontakttier von PI-Tier	IVV / IVI BE
6	BVDV-1	1e	Rind	Kontakttier von PI-Tier CH-Maria	IVV / IVI BE
7	BVDV-1	1k	Rind	Mutter von PI-Tier	PTA
8	BVDV-1	1b	Rind	Mutter von PI-Tier 04-05	IVV / IVI BE
9	BVDV-1	1a	Rind	BVD-Antiserum aus Impfversuch	IVV / IVI BE
10	BVDV-2	2a	Rind	experimentelle Infektion mit CS8644	G. Wolf ¹

¹Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, München, Deutschland

AK = Antikörper; TI = transient infiziert; PI = persistent infiziert; PTA = Privattierarzt; IVV / IVI BE = Institut für Veterinär-Virologie / Institut für Virologie und Immunologie Bern

4.5. Serumneutralisationstest

Für den Nachweis und zur Quantifizierung von Pestivirus-spezifischen neutralisierenden Antikörpern in einem Serum wurde der Serumneutralisationstest (SNT) verwendet. Der SNT ist sehr spezifisch und sensitiv und gilt deshalb als Goldstandard in der BVDV-Serologie (Edwards, 1990; Sandvik, 1999). Der SNT wurde in einer Laminar-Flow Kabine (Gelaire Laminar Flow Pty Ltd, Kew, Australien) durchgeführt. Die zu untersuchenden Serumproben wurden in Erhaltungsmedium 1:10 verdünnt und anschliessend im Wasserbad bei 56°C während 30 Minuten inaktiviert. Seren mit wenig Material wurden 1:20 bzw. 1:40 mit Erhaltungsmedium verdünnt. Pro Serum wurden dann 100 µl verdünntes Serum in 4 Vertiefungen in der ersten Reihe einer 96-well Mikrotiterplatte (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) pipettiert. In die übrigen Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden für die Verdünnungsreihe je 50 µl Medium vorgelegt. Die Verdünnungsschritte zur Basis 2 wurden mittels einer elektronischen Mehrkanalpipette (Eppendorf Xplorer® 12-channel 15-300 µL; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt, indem jeweils 50 µl/Vertiefung abgenommen, in die nächste Reihe übertragen und viermal mechanisch gut durchmischt wurden. Dieses Vorgehen wurde von der ersten bis zur letzten Reihe der Mikrotiterplatte über 8 Stufen bis zu einer Verdünnung von 1:1'280 fortgesetzt. Nach dem letzten Verdünnungsschritt wurde ein Volumen von 50 µl/Vertiefung verworfen. Bei jedem Testansatz wurde ein positives und ein negatives Kontrollserum mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein Serum mit neutralisierenden Antikörpern gegen den BVDV Subgenotyp 1b verwendet. Für jedes Serum wurde ausserdem zur Kontrolle der Zellverträglichkeit 50 µl der Ausgangsverdünnung in eine zusätzliche Vertiefung pipettiert. Anschliessend wurde mit Ausnahme der Serumkontrollen in jede Vertiefung ein Volumen von 50 µl Virussuspension mit einem Soll-Titer von 100 TCID₅₀ pipettiert und durch leichtes Klopfen an die Platten gut mit dem Serum durchmischt. Danach wurden die Platten während einer Stunde im Brutschrank (Napco, Hettich AG, Bäch, Schweiz) bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. Dann erfolgte pro Vertiefung die Zugabe von 100 µl Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 2 x 10⁵ EKaNaeP/ml. Zu diesem Zweck wurden EKaNaeP-Zellen der siebten bis zur zehnten Passage verwendet. Die Zellsuspension, die immer am gleichen Tag hergestellt wurde, wurde wenn nötig für kurze Zeit auf einem Mini-Shaker (Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz) leicht geschüttelt, bevor sie verwendet wurde. Die Inkubation bis zur Auswertung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ während 4 bis 5 Tagen (Office International des Epizooties, 2015).

Der mittels Spearman-Kaerber (Kaerber, 1931; Spearman, 1908) berechnete Serum-Titer wurde als reziproker Wert der jeweiligen Serumverdünnung ausgedrückt, bei welcher 50% der Vertiefungen eine Virus-Neutralisation zeigen würde. Proben mit einem Titer > 8 wurden als positiv bewertet.

4.6. Kreuzserumneutralisationstest

Zur Differenzierung der Infektionsquelle wurden für jedes Serum mehrere Serumneutralisationstests mit verschiedenen Wiederkäuerpestiviren parallel durchgeführt. Zur Auswahl der punkto Trennschärfe am besten geeigneten Virusstämme wurden Kombinationen zwischen BVDV-Challengeviren und BDV-Challengeviren überprüft. Als signifikant im Sinne der Differenzierung zwischen BVDV und BDV galten mindestens 4-fache Titerunterschiede (Office International des Epizooties, 2015). Unter Berücksichtigung von Proben mit geringen Volumina (erste Verdünnung 1:20) galten die Seren als negativ, wenn sowohl der BVDV- wie auch der BDV-Titer kleiner als 15 war. Bei Quotienten < 4 galten Seren bezüglich Infektionsquelle als nicht differenzierbar.

4.7. Virustitration

Die Virustitration erfolgte in einer Verdünnungsreihe zur Basis 10, die in Kahrnörchen hergestellt wurde. Zu diesem Zweck wurden pro Rörchen 900 µl Erhaltungsmedium vorgelegt und jeweils 100 µl aus der vorherigen Verdünnungsstufe resp. vorverdünnte Virussuspension dazupipettiert. Bei jedem Verdünnungsschritt wurden die Pipettenspitzen gewechselt. In 6 Vertiefungen der Mikrotiterplatte pro Verdünnungsstufe wurde zunächst je 50 µl Erhaltungsmedium vorgelegt und anschliessend mit der höchsten Verdünnung beginnend je 50 µl der Virussuspension dazupipettiert. Die letzte Reihe der Platte wurde für die Zellkontrollen verwendet. Nach Zugabe der Virussuspension wurden die Platten während einer Stunde bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. Anschliessend wurde die EKaNäEp-Zellsuspension mit 2 x 10⁵ Zellen/ml beigegeben (100 µl/Vertiefung). Die Platten wurden dann während 4 bis 5 Tagen bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert. Der Titer wurde mittels der Methode von Spearman und Kaerber als "Tissue Culture Infectious Dose 50" (TCID₅₀) bestimmt. Bei jedem SNT-Testansatz wurde die verwendete Virusmenge des jeweiligen Virusstammes mittels Rücktitration über 4 Stufen überprüft. Als Toleranzgrenzen für den Sollwert der Dosis des Challengevirus von 100 (10²) TCID₅₀ galten Titer von 32 – 316 (10^{1.5} – 10^{2.5}) TCID₅₀ (Office International des Epizooties,

2015). Testansätze mit einem Virustiter ausserhalb dieses Bereichs mussten wiederholt werden.

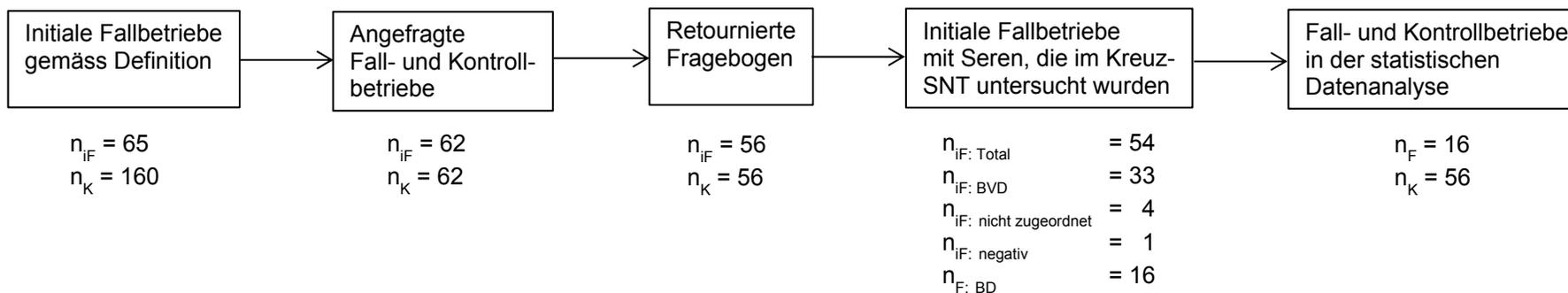
4.8. Immunperoxidase-Färbung

Die Virusinfektion in Zellkulturen, die mit nicht-cytopathogenen Pestiviren inokuliert worden waren, wurden mittels polyklonalen Immunperoxidase (IPO)-Färbung sichtbar gemacht (Adler et al., 1994). Nach mikroskopischer Kontrolle der Mikrotiterplatten wurde das Medium abgegossen und die Vertiefungen der Platten dreimal mit Phosphatpuffer (3.85 M NaCl, 0.2 M NaHPO₄ · 2H₂O, 0.042 M NaH₂PO₄ · H₂O in dest. H₂O) gewaschen und ausgeklopft. Zur Trocknung wurden die Platten für ca. eine Stunde in eine Laminar-Flow Kabine verbracht. Anschliessend wurden die Mikrotiterplatten für mindestens zwei Stunden in einem Trockenbrutschrank bei einer Temperatur von 80°C hitzefixiert. Sobald die Platten auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde der primäre Antikörper swine-α-BVDV (polyklonales in-house Hyperimmunserum) in einer Verdünnung von 1:750 in Waschpuffer (1.37 M NaCl, 0.06 M Na₂HPO₄ · 2H₂O, 0.02 M KH₂PO₄, 0.03 M KCl, 5% Tween 20 in dest. H₂O) in die Vertiefungen der Platten pipettiert (100 µl/Vertiefung) und bei Raumtemperatur während 90 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mittels Waschpuffer und gründlichem Ausklopfen wurde der Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper goat-α-swine IgG-PO (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA) in einer Verdünnung von 1:1'000 in Milchpuffer (5% Milchpulver w/v, Hochdorf Swiss Nutrition AG, Hochdorf, Schweiz) in Waschpuffer in die Vertiefungen der Platten pipettiert (100 µl/Vertiefung) und während 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Mikrotiterplatten mittels Waschpuffer zweimal und abschliessend mit destillierten H₂O einmal gewaschen und gründlich ausgeklopft. Es folgte die Zugabe der Substrat-Indikatorlösung (100µl/Vertiefung) mit folgender Zusammensetzung: 210.27 g/ml 3-Amino-9-ethylcarbazole (Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA), 6% Dimethylformamid (Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, USA), 0.1% H₂O₂ (Dr. Grogg Chemie AG, Stettlen, Schweiz) in Acetatpuffer (0.5 M CH₃COONa in dest. H₂O). Diese Färbung führte zu einem rot-braunen Farbumschlag im Cytoplasma infizierter Zellen. Die Färbung wurde gemäss optischer Kontrolle nach ca. 30 Minuten durch Abgiessen des Substrats und Zugabe von dest. H₂O gestoppt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch, wobei Vertiefungen mit rot-braun gefärbten Zellen als „positiv“ (infiziert) bewertet wurden. Die Berechnung des Titers erfolgte gemäss der Methode von Spearman und Kaerber.

4.9. Fall-Kontroll-Studie

Für das Ermitteln von Risikofaktoren einer Border Disease Virus Infektion in einem Rinderbestand wurde eine retrospektive epidemiologische Fall-Kontroll-Studie durchgeführt. Bei der Studienpopulation handelte es sich um Betriebe mit Rindergruppen, welche im Rahmen der serologischen Untersuchungen als Teil des BVD-Eradikationsprogramms der Schweiz und des Fürstentum Liechtensteins überprüft wurden (Presi et al., 2011). Rindergruppen dienen der Überwachung mittels Stichprobenauswahl (jährlich ein Drittel der Betriebe) bei nicht-milchlieferenden Betrieben, welche in den letzten 24 Monaten kein PI-Tier hatten. Solche Stichproben werden aber zusätzlich auch in Betrieben erhoben, welche in den letzten 24 Monaten ein PI-Tier hatten und in Betrieben mit auffälligem Tankmilch-Ergebnis. Rindergruppen (Jungtierfenster) bestehen grundsätzlich aus 5 Tieren eines Bestandes, die mindestens 6 Monate alt sind, nach dem 30.09.2009 und später als 1 Monat nach Eliminierung eines letzten PI-Tieres geboren wurden und im letzten Jahr mindestens 6 Monate auf dem Betrieb waren. Tiere, die früher auf einem Betrieb mit PI-Tier standen werden ausgeschlossen, da in der Rindergruppe nur Tiere sein sollten, die früher keinen Kontakt zu BVD-Virus hatten. Als initiale Fallbetriebe galten in dieser Arbeit Betriebe mit mindestens zwei bestätigten seropositiven Tieren aus einer Rindergruppe, die nach dem 1. Februar 2014 überprüft worden war. Als definitive Fallbetriebe wurden in der statistischen Datenanalyse Betriebe mit mindestens einem gemäss Kreuz-SNT BDV-seropositiven Serum berücksichtigt. Initiale Fallbetriebe ohne BDV-seropositive Testergebnisse im Kreuz-SNT wurden für die statistischen Auswertungen ausgeschlossen (Abb. 2). Die Kontrollbetriebe wurden aus einem Pool von 10'753 Betrieben (Datenerfassung des Veterinärdienstes Schweiz) ausgewählt. In diesen Betrieben, die ab 1. Januar 2012 mittels negativer Rindergruppe mit mindestens 5 Tieren überprüft worden waren, durfte seit Beginn des Eradikationsprogramms im Jahr 2008 kein seropositives Resultat vorliegen. Zur Minimierung von Störfaktoren (Confounders) wurden mit Hilfe der Tierverkehrsdatenbank (TVD; Schärler et al., 2015) jedem Fallbetrieb nach Möglichkeit bis zu 4 potentielle Kontrollbetriebe mit gut passender geografischer Lage (Kanton resp. Fürstentum Liechtenstein und Region) und Bestandesgrösse zugeordnet. Bei Vorhandensein von mehr als 4 passenden Betrieben wurde zusätzlich nach Nutzungsart (Milchproduktion, gemischte- oder andere Nutzung) gematcht (Tab. 4). Für die Befragung konnte von den bis zu 4 potenziellen Kontrollbetrieben ein Betrieb ausgewählt werden.

Abbildung 2: Auswahlverfahren der Fall- und Kontrollbetriebe



n_{IF} = Anzahl initiale Fallbetriebe; n_F = Anzahl Fallbetriebe; n_K = Anzahl Kontrollbetriebe

Tabelle 4: Zuordnungskriterien und Reihenfolge für individuelles Matching der Fall- und Kontrollbetriebe

Zuordnungskriterium	Beschreibung
1. Geografische Lage	1.a) Kanton / Fürstentum Liechtenstein 1.b) Region (erste zwei Ziffern der 4-stelligen Postleitzahl oder minimale geografische Distanz zwischen Fall- und Kontrollbetrieb)
2. Bestandesgrösse der Rinder	Einteilung in 5 Gruppen mit einer durchschnittlichen jährlichen Anzahl Rinder gemäss Tierverkehrsdatenbank (TVD) von 1-25, 26-50, 51-75, 76-100 oder > 100 Rindern.
3. Nutzungsart der Rinder	Milchproduktion; gemischte Nutzung; andere Nutzung

4.9.1. Datenerhebung

Die Erhebung potenzieller Risikofaktoren für das Vorkommen von BDV-Infektionen bei Rindern erfolgte mittels standardisiertem Fragebogen für Rinderhalter, der in zwei Teile (A und B) gegliedert war (Anhang 10.1). Teil A beinhaltete insgesamt 55 allgemeine Fragen zu Betrieb, Kontakten der Rinder zu Tieren anderer Betriebe, Zu- und Verkäufen (Tierverkehr). Der Fokus lag insbesondere auf direkten und indirekten Kontakten zu kleinen Wiederkäuern. Teil B umfasste Fragen zur Herkunft der seropositiven Tiere in Fallbetrieben bzw. der seronegativen Tiere in Kontrollbetrieben. Ergänzende Daten zu Teil B (Rasse der Rinder) wurden aus der TVD entnommen. Die Fragebogen waren in Deutsch, Französisch und Italienisch abgefasst und wurden den Vollzugsverantwortlichen der Veterinärämter ab Mitte August 2014 zugestellt. Die Veterinärämter beauftragten amtliche Tierärzte oder Bestandestierärzte mit der Befragung der jeweiligen Betriebsinhaber. Dies konnte vor Ort persönlich oder telefonisch erfolgen, wobei zur Minimierung der Antwortverzerrung ("response bias") die Daten des Fall- und des dazugehörigen Kontrollbetriebs von der gleichen Person möglichst zeitnah erhoben wurden.

4.10. Statistik

Die Daten der Serumneutralisationstests und der Fragebogen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel[®] 2010 (Microsoft Corporation) erfasst. Die Häufigkeitsverteilungen verschiedener potenzieller Risikofaktoren in der Fall- und Kontrollgruppe wurden mit Hilfe des McNemar-Tests oder Chi-Square Tests für kategorische resp. mittels paired t-Test oder Two-sample t-Test für normalverteilte kontinuierliche resp. mittels Wilcoxon Test for paired samples oder Mann-Whitney-U-Test für nicht-normalverteilte Variable statistisch miteinander verglichen. Nach der univariaten Analyse jedes einzelnen Risikofaktors gemäss Fragebogen wurde mit signifikanten Risikofaktoren ($p < 0.1$) ein multivariablen Modell in Form einer konditionalen logistischen Regression erstellt. Das definitive Modell wurde durch schrittweise Vorwärtsselektion von Risikofaktoren ermittelt. Die univariaten statistischen Datenanalysen erfolgten mittels NCSS (Version 9; Hintze, 2007), währenddem die multivariaten statistischen Datenanalysen mit der Methode GEE (generalized estimating equation; Liang und Zeger, 1986) in SAS (Version 9.4; SAS Institute Inc., 2013) durchgeführt wurden. Im Modell wurde einerseits für das Clustering auf Ebene Betrieb korrigiert, und andererseits für das Studiendesign (matched pairs).

5. Resultate

5.1. Virusanzucht und Titerbestimmung

Die in dieser Arbeit verwendeten 10 Wiederkäufer-Pestivirusisolate wurden auf EKaNäEp-Zellen vermehrt (1 – 2 Passagen ab jeweiligem Stockvirus). Die Titer der Proben lagen im Bereich von $10^{6.2}$ bis $10^{9.3}$ TCID₅₀/ml (Tab. 5).

Tabelle 5: Virusisolat und Titration

	Pestivirus	Subgenotyp	Virusisolat	Passage	Zelltyp	Log Titer (TCID₅₀)/ml
1	BDV	Swiss a	R9336/11	P 2	EKaNaEp	6.6
2	BDV	Swiss b	R4785/06 bzw. CH-BD4	P 4	EKaNaEp	6.2
3	BDV	3	R1343/01 bzw. CH-BD1	P 2	EKaNaEp	8.6
4	BDV	1a	Moredun	P 2	EKaNaEp	6.6
5	BVDV-1	1h	CH-04-01b	P 5	EKaNaEp	8.3
6	BVDV-1	1e	CH-Maria	P 7	EKaNaEp	7.8
7	BVDV-1	1k	CH-Suwa (ncp)	P 8	EKaNaEp	8.1
8	BVDV-1	1b	CH-04-05	P 2	EKaNaEp	8.8
9	BVDV-1	1a	R1935/72 (cp)	P 6	EKaNaEp	9.3
10	BVDV-2	2a	890	P 7	EKaNaEp	7.0

Die Titerbestimmung in Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) erfolgte gemäss Spearman-Kaerber (Spearman 1908; Kaerber 1931).

5.2. Quantitativer Einfluss der Virusdosen auf den AK-Titer im Kreuz-SNT

In der klassischen Serologie gelten aufgrund zufälliger Titerunterschiede zwischen Testansätzen erst mindestens 4-fache Unterschiede als signifikant (Office International des Epizooties, 2015). Zur Überprüfung, ob ein 4-facher Unterschied bereits aufgrund verschiedener Virusdosen im Rahmen des gültigen Toleranzbereichs von $10^{2 \pm 0.5}$ TCID₅₀ auftreten resp. ein signifikanter Unterschied kaschiert werden könnte, wurde mit je einem BVD-Virus (BVDV-1a; R1935/72) und einem BD-Virus (BDV Swiss a; R9336/11) mit den entsprechenden Kontrollseren ein Kreuz-SNT mit einer Virusverdünnungsreihe von $10^{1.5}$ –

$10^{2.5}$ TCID₅₀ als Gebrauchssuspension durchgeführt. Innerhalb des homologen Systems blieben die Titerquotienten immer unter der kritischen Grenze (Tab. 6). Wenn sich im Kreuz-SNT die Virusdosen zwischen BVDV und BDV stark unterschieden (bis maximal einer Log-Stufe), obwohl sich beide noch im gültigen Toleranzbereich befanden, war bei einer von 4 Kombinationen eine Differenzierung des Kontrollserums aufgrund eines Quotienten < 4 nicht mehr möglich (Tab. 6). Das BD-Antiserum wies bei geringer BVD-1a-Virusdosis zur Differenzierung einen zu hohen BVD-Titer auf.

Tabelle 6: Serumtiter und Quotienten bei Kombinationen unterschiedlicher Virusdosen mit einer maximalen Differenz von einer Log-Stufe im Kreuz-SNT

Serum	BVDV-1a		BDV Swiss a		Quotient
	TCID ₅₀ ↑	TCID ₅₀ ↓	TCID ₅₀ ↑	TCID ₅₀ ↓	
α-BVD	67			6	11.2
		113	4		28.3
α-BD	40			453	11.3
		113	160		1.4

Die Viruskonzentrationen von BVDV und BDV lagen innerhalb des allgemein gültigen Bereichs von $10^{1.5}$ (32) – $10^{2.5}$ (316) TCID₅₀. Für die Berechnung der Quotienten des α-BVD Serums war der Titer gegen BVDV Zähler und derjenige gegen BDV Nenner, für die Berechnung der Quotienten von α-BD Seren galt das Gegenteil. Bei einem Quotienten von < 4 (α-BD-Serum) würde ein Serum als „nicht differenzierbar“ klassifiziert (Fettdruck); ↑ ≈ Virusdosis $> 10^2$, ↓ ≈ Virusdosis $< 10^2$

Wenn die Unterschiede zwischen den BVD- und BD-Virusdosen um eine halbe Log-Stufe eingeschränkt wurden, war eine Differenzierung des Kontrollserums nur noch bei 1 von 8 Kombinationen nicht möglich (Tab. 7). Zu einer Falschzuordnung eines Kontrollserums kam es in keiner der getesteten Kombinationen von Virusdosen.

Tabelle 7: Serumtiter und Quotienten bei Kombinationen unterschiedlicher Virusdosen mit einer maximalen Differenz von einer halben Log-Stufe im Kreuz-SNT

Serum	TCID ₅₀ -Bereich	BVDV-1a		BDV Swiss a		Quotient
		TCID ₅₀ ↑	TCID ₅₀ ↓	TCID ₅₀ ↑	TCID ₅₀ ↓	
α-BVD	10 ^{2.5} / 10 ²	67			4	16.8
	10 ² / 10 ^{1.5}	80			6	13.3
	10 ² / 10 ^{2.5}		113	4		28.3
	10 ^{1.5} / 10 ²		80	4		20.0
α-BD	10 ^{2.5} / 10 ²	40			453	11.3
	10 ² / 10 ^{1.5}	48			453	9.4
	10 ² / 10 ^{2.5}		113	453		4.0
	10 ^{1.5} / 10 ²		67	160		2.4

Die Viruskonzentrationen von BVDV und BDV lagen innerhalb des allgemein gültigen Bereichs von 10^{1.5} – 10^{2.5} TCID₅₀. Für die Berechnung der Quotienten des α-BVD Serums war der Titer gegen BVDV Zähler und derjenige gegen BDV Nenner, für die Berechnung der Quotienten von α-BD Seren galt das Gegenteil. Bei einem Quotienten von < 4 (α-BD-Serum) würde ein Serum als „nicht differenzierbar“ klassifiziert (Fettdruck); ↑ ≈ Virusdosis > 10², ↓ ≈ Virusdosis < 10²

5.3. Selektion von BD- und BVD-Viren für den Kreuz-SNT

Für die Selektion der für die Unterscheidung von BD- und BVD-AK im Kreuz-SNT am besten geeigneten BD- und BVD-Viruskombination wurden alle möglichen Kombinationen aus den 10 Wiederkäuer-Pestivirusisolaten (BDV, BVDV-1 und BVDV-2) im Kreuzneutralisationstest miteinander verglichen (Tab. 8). Für jeden Subgenotyp wurde ein möglichst homologes Serum ausgewählt und mit allen 10 Testviren im SNT ausstitriert. Die höchsten Titer wurden mit wenigen Ausnahmen bei den homologen Serum-Virus-Paaren festgestellt. Der höchste Titer von 5'120 wurde mit dem anti-BVDV-1e Serum und dem entsprechenden Isolat CH-Maria beobachtet. Ausnahmen waren die Antiseren, die gegen BDV Swiss a, BDV-1a und BVDV-1k ausgewählt wurden, die gegen ein anderes Virusisolat ebenbürtig oder stärker reagierten.

Tabelle 8: Antikörper-Titer von 10 Seren gegen homologe und heterologe BDV- und BVDV-Isolate

↓Seren / Viren →	BDV Swiss a	BDV Swiss b	BDV-3	BDV-1a	BVDV-1h	BVDV-1e	BVDV-1k	BVDV-1b	BVDV-1a	BVDV-2a
a-BDV-Swiss a	123	123	52	57	28	24	≤ 14	24	≤ 14	15
a-BDV-Swiss b	587	987	269	320	147	104	67	135	17	26
a-BDV-3	123	104	320	104	113	80	28	62	28	20
a-BDV-1a	160	247	160	147	95	52	≤ 14	80	≤ 14	15
a-BVDV-1h	453	190	174	174	2'792	293	207	698	269	247
a-BVDV-1e	≤ 14	15	28	34	905	5'120	160	453	349	160
a-BVDV-1k	20	67	34	73	453	207	123	381	123	52
a-BVDV-1b	67	80	57	95	1'522	698	320	3'620	538	247
a-BVDV-1a	20	73	48	31	761	349	381	1'396	4'695	113
a-BVDV-2a	31	57	31	73	247	226	52	62	87	1'660

Homologe Titer sind fett gedruckt, Titer von Seren, welche mit anderen Isolaten ebenbürtig oder stärker reagierten sind kursiv

Das Antiserum gegen BVDV-2a zeigte erwartungsgemäss (Avalos-Ramirez et al., 2001; Ridpath, 2010b) gegen BD-Viren eine niedrige (Mittelwert, MW = 48) und gegen BVDV-1 Stämme eine mittlere (MW = 135) Neutralisationsaktivität. Die gegen BDV gerichteten Seren reagierten umgekehrt ebenfalls sehr schwach (MW = 19) mit BVDV-2a (Isolat 890) und mit den anti-BVDV-1 Seren mittelstark (MW = 164). Mit Ausnahme des a-BVDV-1h wiesen alle anti-BVDV-1 Seren eine schwache Neutralisation von BD-Viren auf (MW = 47). Die Kreuzreaktivität der BVDV-1 Antiseren gegen andere Subgenotypen war hingegen sehr hoch (MW ohne homologe Titer = 523). Die anti-BDV Seren zeigten eine niedrige Neutralisationsaktivität gegen BVDV-1 Stämme (MW = 57) und eine mittlere gegen andere BD-Viren (MW ohne homologe Titer = 192).

5.3.1. Koeffizient der antigenetischen Verwandtschaft (R)

Die antigenetische Verwandtschaft der Virus-Paare wurde mittels des Koeffizienten der antigenetischen Verwandtschaft (R^1) bestimmt (Archetti und Horsfall, 1950), wobei ein R-Wert von ≤ 25 als signifikanter antigenetischer Unterschied galt (Bachofen et al., 2008; Becher et al., 2003). Bei allen Kombinationen von BD- und BVD-Viren waren die R-Werte signifikant. Die grössten antigenetischen Unterschiede mit R-Werten < 2 wurden zwischen BDV- und BVDV-1-Stämmen beobachtet. Die vier BD-Viren wiesen untereinander die höchsten R-Werte auf (Tab. 9).

¹ $R = 100 \times \sqrt{\frac{\text{Titer Virusisolat A mit Antiserum B} \times \text{Titer Virusisolat B mit Antiserum A}}{\text{Titer Virusisolat A mit Antiserum A} \times \text{Titer Virusisolat B mit Antiserum B}}}$

Tabelle 9: Koeffizienten der antigenetischen Verwandtschaft (R) zwischen BDV- und BVDV-Isolaten

BDV- & BVDV-Isolate	BDV Swiss a	BDV Swiss b	BDV-3	BDV-1a	BVDV-1h	BVDV-1e	BVDV-1k	BVDV-1b	BVDV-1a	BVDV-2a
BDV Swiss a	100	77.1	40.3	71.0	19.2	≤ 2.3	≤ 13.6	6.0	≤ 2.2	4.8
BDV Swiss b		100	29.8	73.8	10.1	1.8	19.2	5.5	1.6	3.0
BDV-3			100	59.5	14.8	3.7	15.6	5.5	3.0	3.4
BDV-1a				100	20.1	4.8	≤ 23.8	12.0	2.5	6.7
BVDV-1h					100	13.6	52.3	32.4	12.5	11.5
BVDV-1e						100	22.9	13.1	7.1	6.5
BVDV-1k							100	52.3	28.5	11.5
BVDV-1b								100	21.0	5.0
BVDV-1a									100	3.6
BVDV-2a										100

R-Werte ≤ 25, die auf einen signifikanten antigenetischen Unterschied hindeuten, sind kursiv; für nicht bestimmbare Titer an der unteren Grenze (≤ 14) wurde der Wert 14 verwendet, die entsprechenden R-Werte sind deshalb mit ≤ gekennzeichnet

5.3.2. Quotienten der Kreuzneutralisationstiter

Die Quotienten der Kreuzneutralisationstiter der 10 Seren wurden für jede Kombination eines der 4 BD- mit einem der 6 BVD-Viren berechnet (Tab. 10). Bei Quotienten, die kleiner als 4 waren, galten Seren als nicht differenzierbar. Bei Kombinationen von 4 Virus-Paaren (BVDV-1a mit BDV Swiss a, BVDV-2a mit BDV Swiss a und BDV Swiss b und BVDV-1k mit BDV Swiss a) wurden alle 4 BDV-Antiseren richtig zugeordnet. Die 6 BVDV-Antiseren wurden in 3 Kombinationen von Virus-Paaren (BVDV-1h mit BDV Swiss a, BDV Swiss b und BDV-3) richtig klassifiziert.

Das Virus-Paar BVDV-1a und BDV Swiss a zeigten insgesamt die beste Differenzierung aller Seren, indem bei dieser Kombination 8 von 10 Seren im Kreuzneutralisationstest dem richtigen Virus zugeordnet wurden. Bei Zuzug der Resultate des BVDV-1h Isolats CH-04-01b in Kombination mit BDV Swiss a konnten auch die verbleibenden 2 BVD-Antiseren mit hohen Quotienten korrekt zugeordnet werden.

Tabelle 10: Quotienten der Kreuzneutralisationstiter von 10 Seren mit allen Kombinationen von BDV- mit BVDV-Isolaten

Seren	Viruskombinationen											
	BVDV-1h				BVDV-1e				BVDV-1k			
	BDV-Swiss a	BDV-Swiss b	BDV-3	BDV-1a	BDV-Swiss a	BDV-Swiss b	BDV-3	BDV-1a	BDV-Swiss a	BDV-Swiss b	BDV-3	BDV-1a
a-BDV Swiss a	4.4	4.4	1.9	2.0	5.1	5.1	2.2	2.4	8.8	8.8	3.7	4.1
a-BDV Swiss b	4.0 ¹	6.7	1.8	2.2	5.6	9.5	2.6	3.1	8.8	14.7	4.0	4.8
a-BDV-3	1.1	0.9	2.8	0.9	1.5	1.3	4.0	1.3	4.4	3.7	11.4	3.7
a-BDV-1a	1.7	2.6	1.7	1.5	3.1	4.8	3.1	2.8	11.4	17.6	11.4	10.5
a-BVDV-1h	6.2	14.7	16.0	16.0	0.6	1.5	1.7	1.7	0.5	1.1	1.2	1.2
a-BVDV-1e	64.6	60.3	32.3	26.6	365.7	341.3	182.9	150.6	11.4	10.7	5.7	4.7
a-BVDV-1k	22.7	6.8	13.3	6.2	10.4	3.1	6.1	2.8	6.2	1.8	3.6	1.7
a-BVDV-1b	22.7	19.0	26.7	16.0	10.4	8.7	12.2	7.3	4.8	4.0	5.6	3.4
a-BVDV-1a	38.1	10.4	15.9	24.5	17.5	4.8	7.3	11.3	19.1	5.2	7.9	12.3
a-BVDV-2a	8.0	4.3	8.0	3.4	7.3	4.0 ¹	7.3	3.1	1.7	0.9	1.7	0.7

Tabelle 10: Quotienten der Kreuzneutralisationstiter von 10 Seren mit allen Kombinationen von BDV- mit BVDV-Isolaten (Fortsetzung)

Seren	Viruskombinationen											
	BVDV-1b				BVDV-1a				BVDV-2a			
	BDV-Swiss a	BDV-Swiss b	BDV-3	BDV-1a	BDV-Swiss a	BDV-Swiss b	BDV-3	BDV-1a	BDV-Swiss a	BDV-Swiss b	BDV-3	BDV-1a
a-BDV Swiss a	5.1	5.1	2.2	2.4	8.8	8.8	3.7	4.1	8.2	8.2	3.5	3.8
a-BDV Swiss b	4.3	7.3	2.0	2.4	34.5	58.1	15.8	18.8	22.6	38.0	10.3	12.3
a-BDV-3	2.0	1.7	5.2	1.7	4.4	3.7	11.4	3.7	6.2	5.2	16.0	5.2
a-BDV-1a	2.0	3.1	2.0	1.8	11.4	17.6	11.4	10.5	10.7	16.5	10.7	9.8
a-BVDV-1h	1.5	3.7	4.0	4.0	0.6	1.4	1.5	1.5	0.5	1.3	1.4	1.4
a-BVDV-1e	32.4	30.2	16.2	13.3	24.9	23.3	12.5	10.3	11.4	10.7	5.7	4.7
a-BVDV-1k	19.1	5.7	11.2	5.2	6.2	1.8	3.6	1.7	2.6	0.8	1.5	0.7
a-BVDV-1b	54.0	45.3	63.5	38.1	8.0	6.7	9.4	5.7	3.7	3.1	4.3	2.6
a-BVDV-1a	69.8	19.1	29.1	45.0	234.8	64.3	97.8	151.5	5.7	1.5	2.4	3.6
a-BVDV-2a	2.0	1.1	2.0	0.8	2.8	1.5	2.8	1.2	53.5	29.1	53.5	22.7

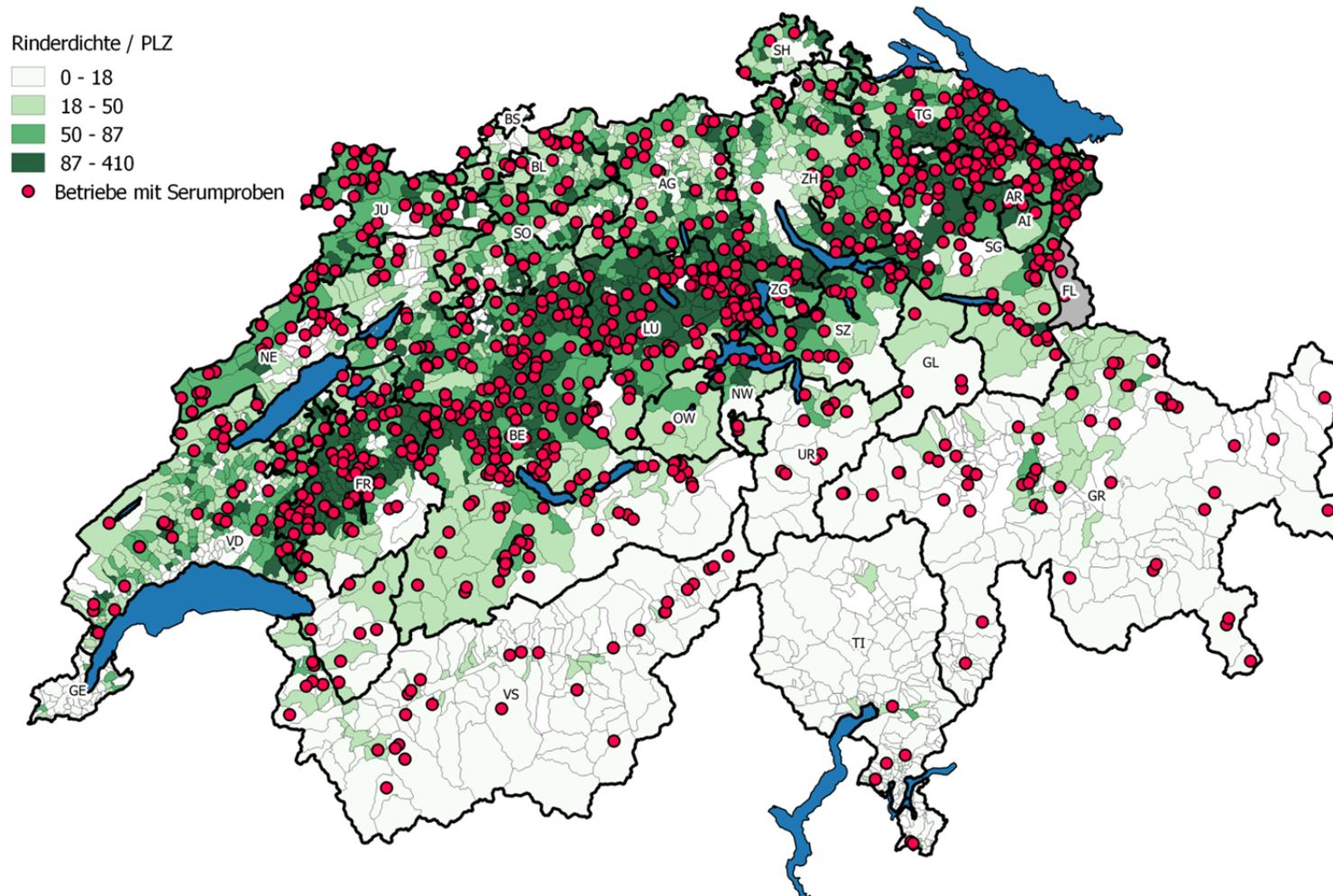
Für die Berechnung der Quotienten der a-BD Seren wurde jeweils der Titer des BDV als Zähler und derjenige des BVDV als Nenner verwendet. Für die Berechnung des Quotienten von a-BVD Seren galt das Gegenteil. Die Quotienten von homologen Titern sind fett gedruckt; Quotienten < 4 sind mit roter Hintergrundfarbe hervorgehoben.

¹Der effektive Wert lag knapp unter 4.0.

5.4. Geografische Verteilung der bestätigt-seropositiven Feldseren

Ein Grossteil der 1'568 bestätigt-seropositiven Proben stammte aus dem Kanton Bern (n = 277; 17.7%), gefolgt von Proben aus dem Kanton St. Gallen (n = 213; 13.6%). Von den zwei städtischen Kantonen Basel-Stadt und Genf standen keine Serumproben von Rindern zur Verfügung. Die Verteilung der Proben war insgesamt in gutem Einklang mit der Rinderdichte pro km² pro Postleitzahl in der Schweiz (Bundesamt für Statistik, 2014a; Abb. 3).

Abbildung 3: Geografische Verteilung der Feldseren aus der Schweiz und dem Fürstentum Liechtenstein und Rinderdichte



Die Karte wurde mit dem Geoinformationssystem QGIS 2.8.1-Wien erstellt; Anzahl Rinder pro Gemeinde (Stand 2014) gemäss Bundesamt für Statistik (BFS; <https://www.pxweb.bfs.admin.ch>); $n_{\text{Betriebe mit Serumproben}} = 898$

5.5. Altersverteilung der untersuchten Rinder

Rund drei Viertel (74.8%) der 1'568 Serumproben stammte von Rindern, die vor 2012 geboren wurden, wobei der Jahrgang 2010 (n = 512, 44%) am stärksten vertreten war (Abb. 4). Die Altersgruppe der zum Zeitpunkt der Untersuchung der Proben 6 bis 11 Monate alten Tiere stellte entsprechend der Vorgabe des „Jungtierfensters“ (Di Labio, 2013) die am besten vertretene Altersgruppe dar (n = 347, 22.1%; Abb. 5).

Abbildung 4: Anzahl Rinder mit bestätigt-seropositiven Proben gemäss Geburtsdatum

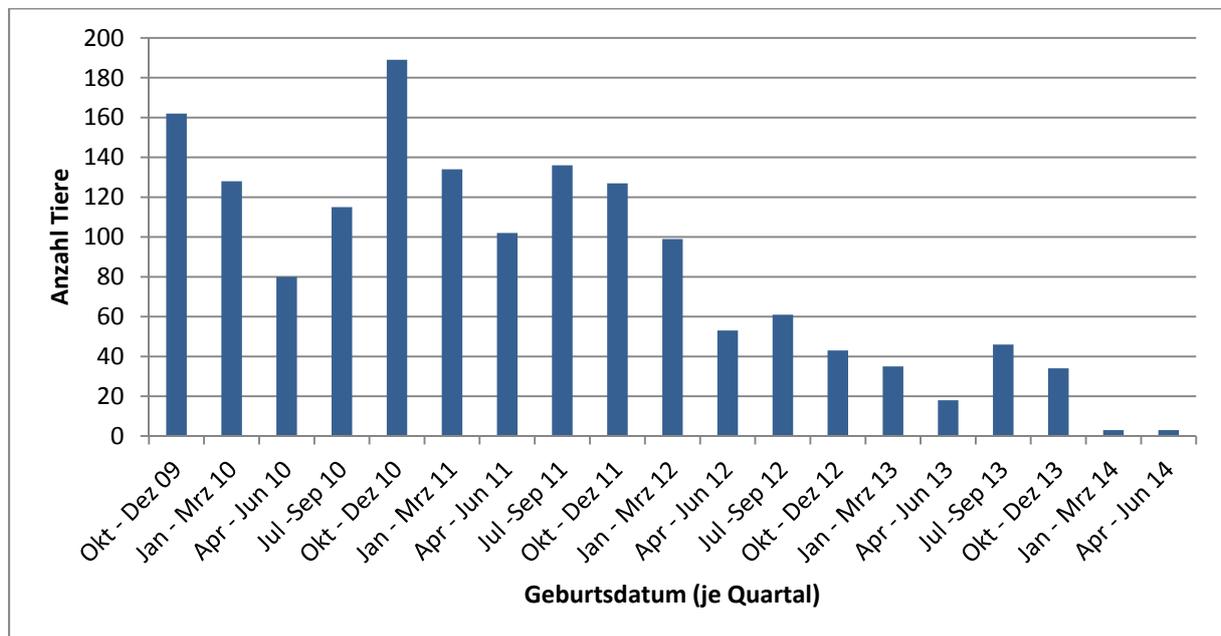
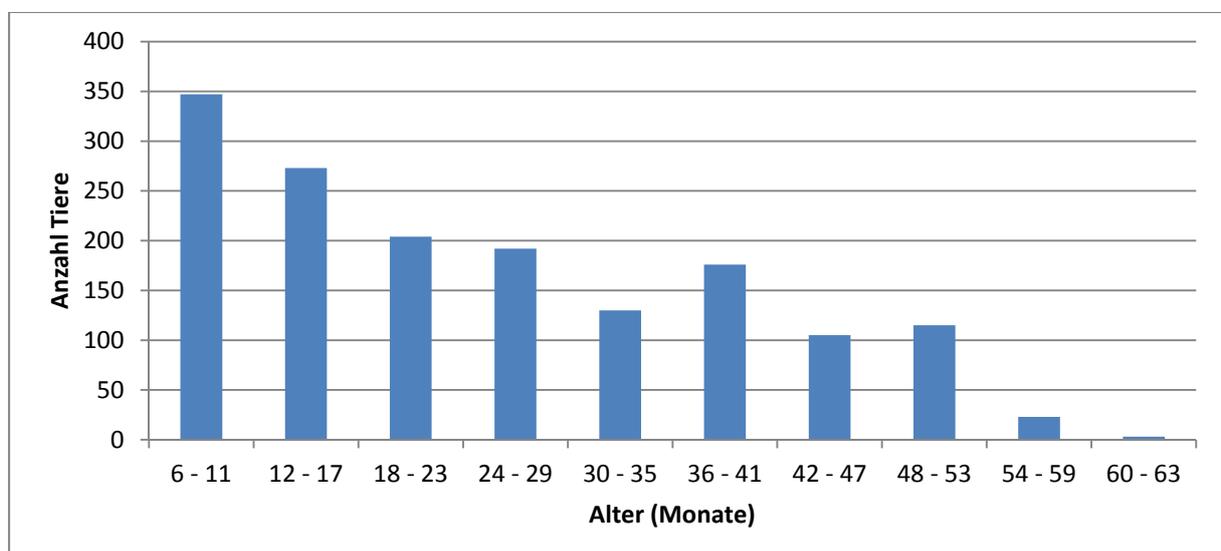


Abbildung 5: Altersverteilung der Tiere zum Untersuchungszeitpunkt der Probe



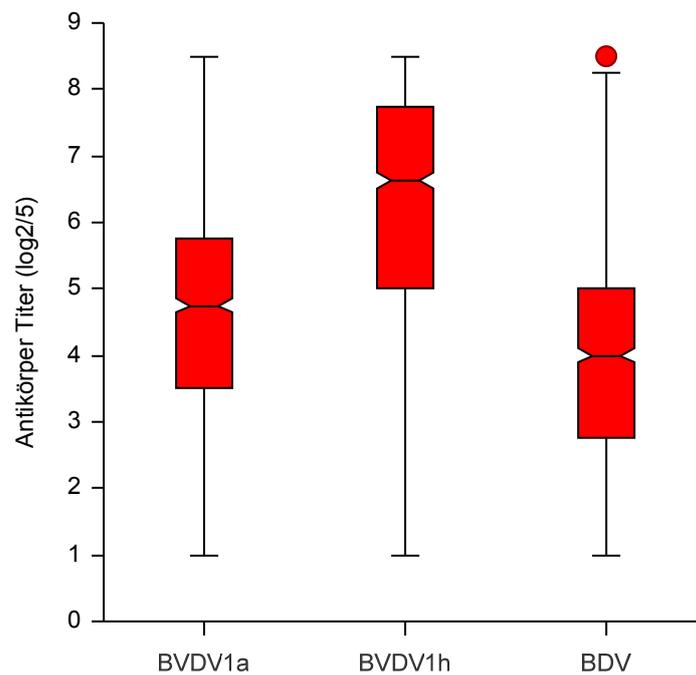
5.6. Neutralisation und Kreuzneutralisation mit Feldseren

Zur Differenzierung bezüglich BVDV oder BDV als Infektionsquelle wurde die Kreuzneutralisation gemäss Vorversuch (Kapitel 5.3.) mit drei Virusstämmen (BVDV-1a, BVDV-1h und BDV Swiss a) durchgeführt. Pro Testansatz wurden jeweils 25 Rinderseren untersucht. Von insgesamt 1'568 bestätigt-seropositiven Proben, die aus 898 Betrieben stammten, konnten 1'549 im Kreuz-SNT untersucht werden. Von weiteren 6 Proben, bei denen zu wenig Material vorhanden war, wurden die Resultate aus dem BVD-SNT des IVV/IVI Bern übernommen.

5.6.1. Serumtiterhöhen

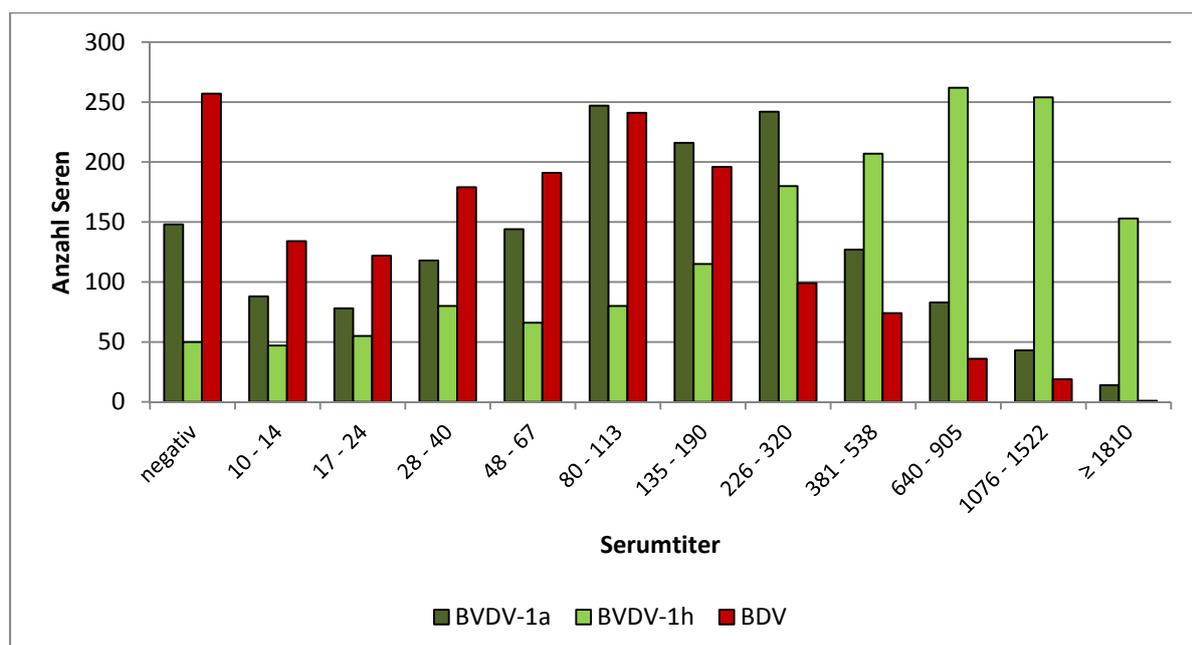
Das geometrische Mittel (GMT) der Titer gegen den Stamm BVDV-1h (GMT = 346.3; Median = 495.5) wie auch mehrheitlich die Titer im Einzelnen (1'394 von 1'549) waren höher als diejenigen gegen den Stamm BVDV-1a (GMT = 125.5; Median = 135). Das geometrische Mittel wie meist auch die einzelnen Titer gegen BDV Swiss a (GMT = 74.8; Median = 80) lagen deutlich tiefer als diejenigen gegen die BVD-Stämme (Abb. 6). Die Verteilung der Titer über den Titerbereich von 1:10 bis 1:≥1'810 (komplette Neutralisation in der höchsten Verdünnung von 5×2^8) ist in Abbildung 7 ersichtlich. Der höchste Titerwert ($\geq 1'810$) wurde mit BVDV-1h in 153 Seren, mit BVDV-1a in 14 und mit BDV lediglich in einem Serum beobachtet. Die grösste Häufung von negativen Titern (<10) lag bei BDV vor ($n = 257$).

Abbildung 6: Verteilung der positiven Serومتiter (Log₂) gegen BVDV-1a, BVDV-1h und BDV



Die Boxplots wurden mit der Statistiksoftware NCSS 9 erstellt. Es wurden nur positive Titer (> 8) berücksichtigt ($n_{BVDV-1a} = 1'400$; $n_{BVDV-1h} = 1'496$; $n_{BD} = 1'292$). Für Titer ≤ 14 , ≤ 28 und $\geq 1'810$ wurden die Werte 14, 28 resp. 1'810 angenommen. Die y-Achse wurde der Verdünnungsreihe der Mikrotiterplatte im Kreuz-SNT entsprechend in Log₂ dargestellt; die effektiven Titer ergeben sich nach Multiplikation mit 5 (Vorverdünnung 1:5).

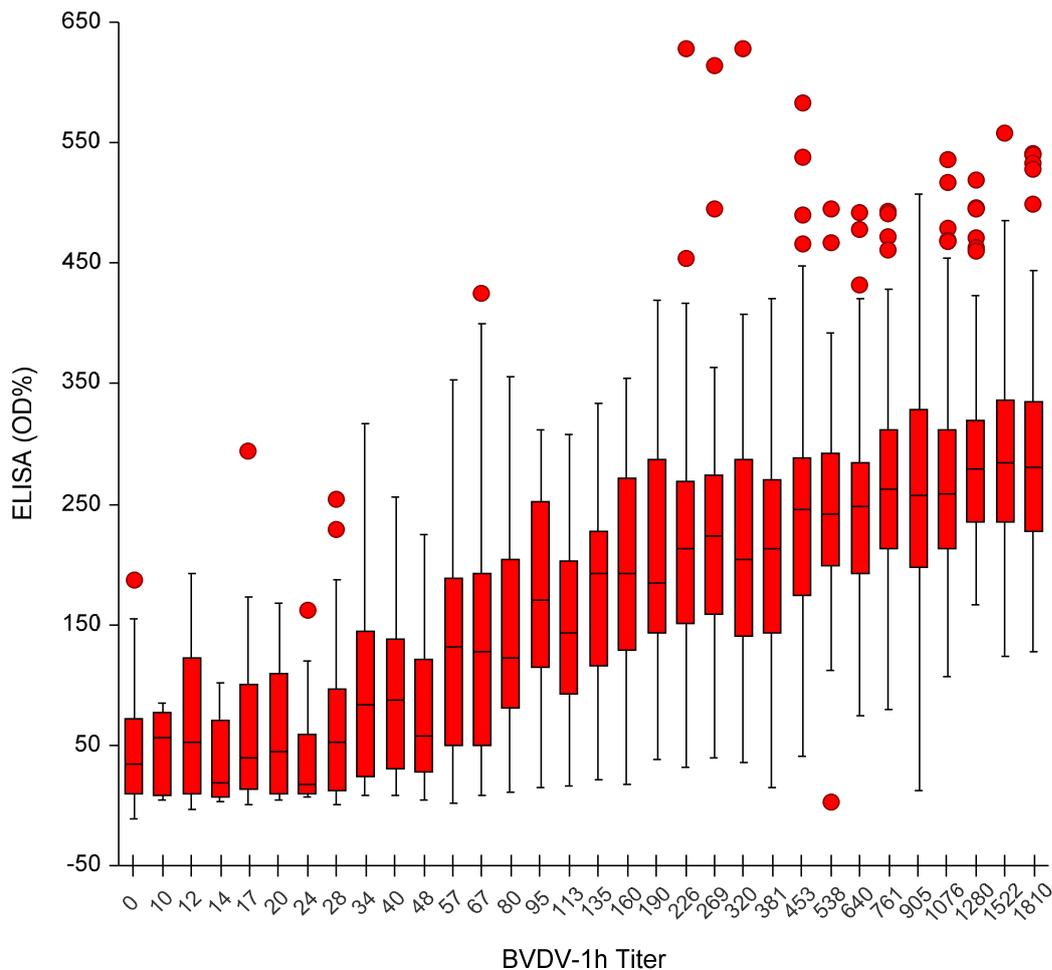
Abbildung 7: Verteilung der Serومتiter gegen die drei Isolate BVDV-1a, BVDV-1h und BDV Swiss a



5.6.2. Korrelation der SNT-Titer mit den OD-Werten des ELISAs

Die drei Titer eines jeden Serums aus dem Kreuz-SNT waren signifikant korreliert mit den OD-Werten des ELISAs ($P_{\text{korrel.}} < 0.0001$; $P_{\text{Steigungskoeffizient}} > 0.9 < 0.16$; $R^2 > 0.06 < 0.28$ der linearen Regression; für BVDV-1h siehe Abb. 8).

Abbildung 8: Vergleich des SNT-Titers gegen BVDV-1h mit den OD-Werten des ELISAs



Die Box Plots wurden mittels der Statistiksoftware NCSS 9 erstellt. Negative Seren wurden als Titer „0“ gruppiert. Ausreisser sind unter und über den Antennen der Boxplots ersichtlich.

5.6.3. Identifikation der Infektionsquelle mittels Kreuzneutralisation

Mit Hilfe der Kombination der Resultate mit den 2 Virusstämmen BVDV-1a und BDV Swiss a konnten 545 von 1'549 Proben nach Infektionsquelle differenziert werden. Bei zusätzlicher Verwendung der BVD/BD-Quotienten mit dem Stamm BVDV-1h konnten von insgesamt 870 mittels BVDV-1a nicht differenzierbaren Proben weitere 594 (68.3%) der Infektionsquelle BVD zugeordnet werden (Tab. 11). Die BVD-Seren wiesen in 93% der Fälle einen höheren

Titer gegen BVDV-1h als gegen BVDV-1a auf. Umgekehrt war bei den BDV-Seren die niedrigere Reaktion mit BVDV-1a ausschlaggebend für die Zuordnung (Abb. 9). In keinem Fall wurde eine widersprüchliche Kombination der Resultate beobachtet. Der Grossteil der Proben konnte BVD zugeordnet werden (n = 1'112, 71.5%; KI95%: 69.2 – 73.7%). In 104 Rinderseren (6.7%; KI95%: 5.5 – 8.0%) konnte BDV als Infektionsquelle identifiziert werden. Die restlichen Seren konnten entweder nicht differenziert werden (n = 286, 18.4%; KI95%: 16.5 – 20.4%) oder mussten aufgrund des tiefen Titers (beide Titer < 15) als negativ (n = 53, 3.4%; KI95%: 2.6 – 4.4%) klassifiziert werden (Tab. 12). Bei 28 nicht-differenzierbaren Proben, die in der höchsten Verdünnung noch vollständige Neutralisation zeigten, konnte nach weiterem Ausverdünnen BVD (n = 27) oder BDV (n = 1) als Infektionsquelle zugeordnet werden.

Tabelle 11: Kombinationen der Resultate aus dem Kreuz-SNT mit 3 Virusstämmen

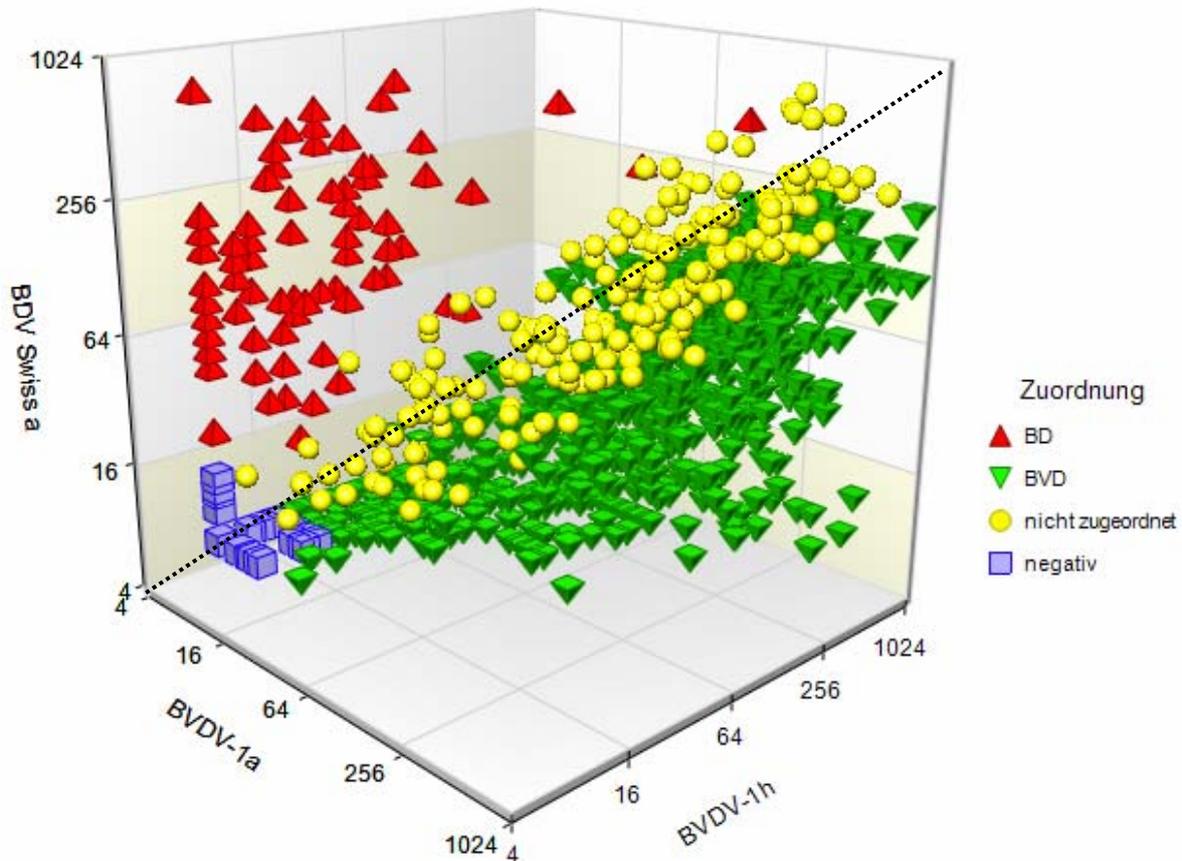
Beurteilung mit BVDV-1a		Beurteilung mit BVDV-1h	=	Definitive Zuordnung	Anz. Proben	%-Anteil definitive Zuordnung
BVD	&	BVD	=	BVD	428	38.52
BVD	&	negativ	=	BVD	4	0.36
BVD	&	nicht zugeordnet	=	BVD	13	1.17
nicht zugeordnet	&	BVD	=	BVD	594	53.47
negativ	&	BVD	=	BVD	72	6.48
BD	&	BD	=	BD	68	68.00
BD	&	nicht zugeordnet	=	BD	32	32.00
nicht zugeordnet	&	nicht zugeordnet	=	nicht zugeordnet	276	96.50
negativ	&	nicht zugeordnet	=	nicht zugeordnet	10	3.50
negativ	&	negativ	=	Negativ	52	100

Bei Quotienten ≥ 4 konnten die Seren „BVD“ bzw. „BD“ zugeordnet werden, bei Quotienten < 4 galten die Seren als „nicht zugeordnet“; als „negativ“ wurden Seren mit beiden Titern < 15 bewertet.

Tabelle 12: Resultate des Kreuz-SNTs nach Kantonen und Fürstentum Liechtenstein

Kanton / FL	BVD	BD	Nicht zugeordnete Seren	Negative Seren	Total Seren je Kanton
AG	43	2	10	0	55
AI	13	0	4	0	17
AR	20	0	8	1	29
BE	174	24	54	21	273
BL	24	0	5	0	29
FL	2	0	2	0	4
FR	124	2	23	5	154
GL	5	0	0	0	5
GR	61	11	10	5	87
JU	75	2	35	3	115
LU	73	11	18	4	106
NE	28	0	18	1	47
NW	1	0	2	1	4
OW	3	0	0	0	3
SG	170	12	28	3	213
SH	2	1	0	0	3
SO	19	3	1	1	24
SZ	22	12	3	0	37
TG	70	2	9	3	84
TI	6	0	3	1	10
UR	3	11	1	2	17
VD	81	3	18	0	102
VS	40	6	13	1	60
ZG	10	2	7	0	19
ZH	43	0	14	1	58
Total	1'112 (71.5%)	104 (6.7%)	286 (18.4%)	53 (3.4%)	<u>1'555 (100%)</u>

Abbildung 9: Scatterplot der Serumproben anhand der Titer gegen BDV Swiss a, BVDV-1a, und BVDV-1h



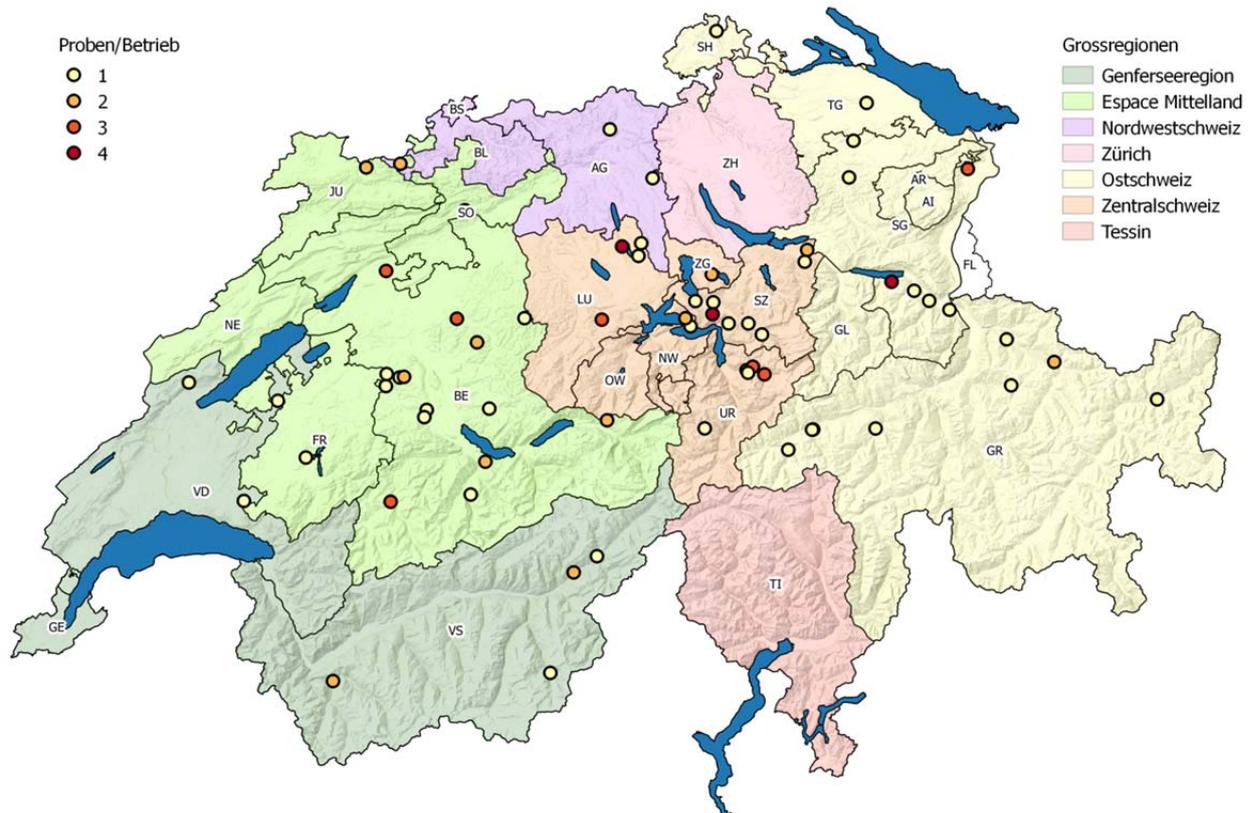
Der Scatterplot wurde mit der Statistiksoftware NCSS 9 erstellt. Die schwarz gestrichelte Linie stellt die dreizählige Drehachse dar, auf der alle drei Titer denselben Wert annehmen, sodass keine Zuordnung zu einer Infektionsquelle möglich wäre. BD-spezifische Seren mit niedriger Reaktion gegen BVDV-1a befinden sich im oberen, linken Ausschnitt des Kubus, BVD-spezifische Seren mit hoher Reaktion gegen BVDV-1h im unteren, rechten Ausschnitt des Kubus; $n = 1'555$

5.7. Verteilung der Proben mit BDV als Infektionsquelle

Die 104 Rinderseren, die BD zugeordnet wurden, stammten von Tieren aus 65 Betrieben aus 15 Kantonen (Abb. 10). Der Grossteil dieser Proben stammte aus den drei Grossregionen (definierte Bezugsräume gemäss dem Bundesamt für Statistik) Zentralschweiz ($n = 36$), Espace Mittelland ($n = 31$) und der Ostschweiz ($n = 26$), gefolgt von 9 Proben aus der Genferseeregion und 2 Proben aus der Nordwestschweiz. Die höchsten Prävalenzen solcher Proben wurden in den Kantonen Uri (11/17), Schaffhausen (1/3) und Schwyz (12/37) ermittelt. Aus 9 Kantonen und dem Fürstentum Liechtenstein wurde in 206 Serumproben hingegen in keinem Fall BDV als Infektionsquelle festgestellt. In drei

betroffenen Betrieben der Zentralschweiz wurden im Rahmen des Eradikationsprogramms 4 BDV bedingte PI-Rinder festgestellt (persönliche Mitteilung H.P. Stalder).

Abbildung 10: Geografische Verteilung der Betriebe mit BDV als Infektionsquelle

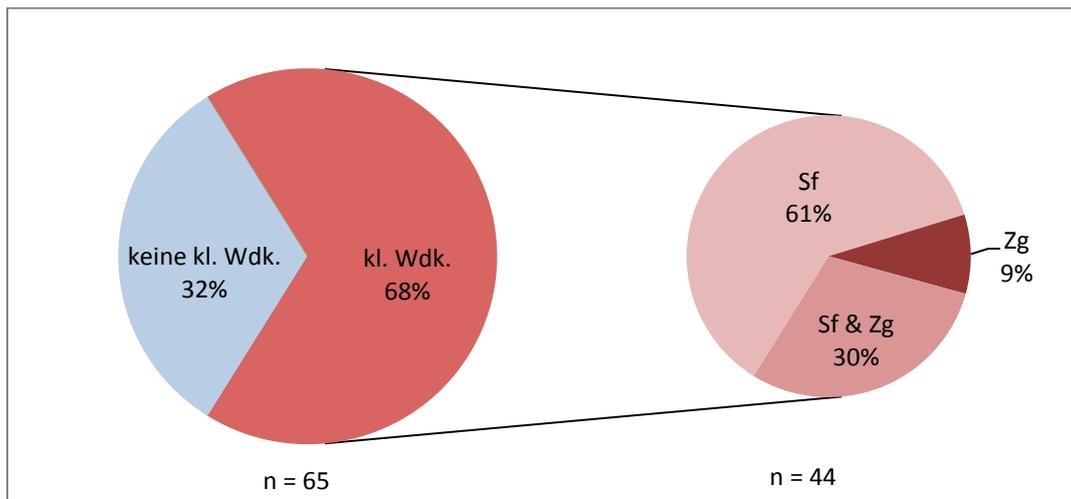


Die Karte wurde mit dem Geoinformationssystem QGIS 2.8.1-Wien erstellt. n = 65

In 21 von 29 Betrieben mit BDV als Infektionsquelle, bei denen mehr als eine Probe im Kreuz-SNT untersucht werden konnte, erwiesen sich alle Proben als BDV-spezifisch. In 4 Betrieben waren weitere Proben nicht differenzierbar oder negativ und in 4 Betrieben wiesen andere Seren auf BVD als Infektionsquelle hin, teilweise in Kombination mit punkto Infektionsquelle nicht differenzierbaren Seren.

In 44 (68%) Betrieben mit BDV als Infektionsquelle wurden gemäss Informationen aus der TVD kleine Wiederkäuer gehalten (Abb. 11). Davon wurden in 27 Betrieben Schafe (61%), in 4 Ziegen (9%) und in 13 Betrieben Schafe und Ziegen (30%) gehalten. Hingegen wurden gemäss TVD nur in einem Drittel der seropositiven Betriebe ohne BDV als Infektionsquelle (n = 259, 31%) kleine Wiederkäuer gehalten.

Abbildung 11: Haltung von kleinen Wiederkäuern in Betrieben mit BDV als Infektionsquelle



kl. Wdk. = kleine Wiederkäuer; *Sf* = Schafe; *Zg* = Ziegen

5.8. Fall-Kontroll-Studie

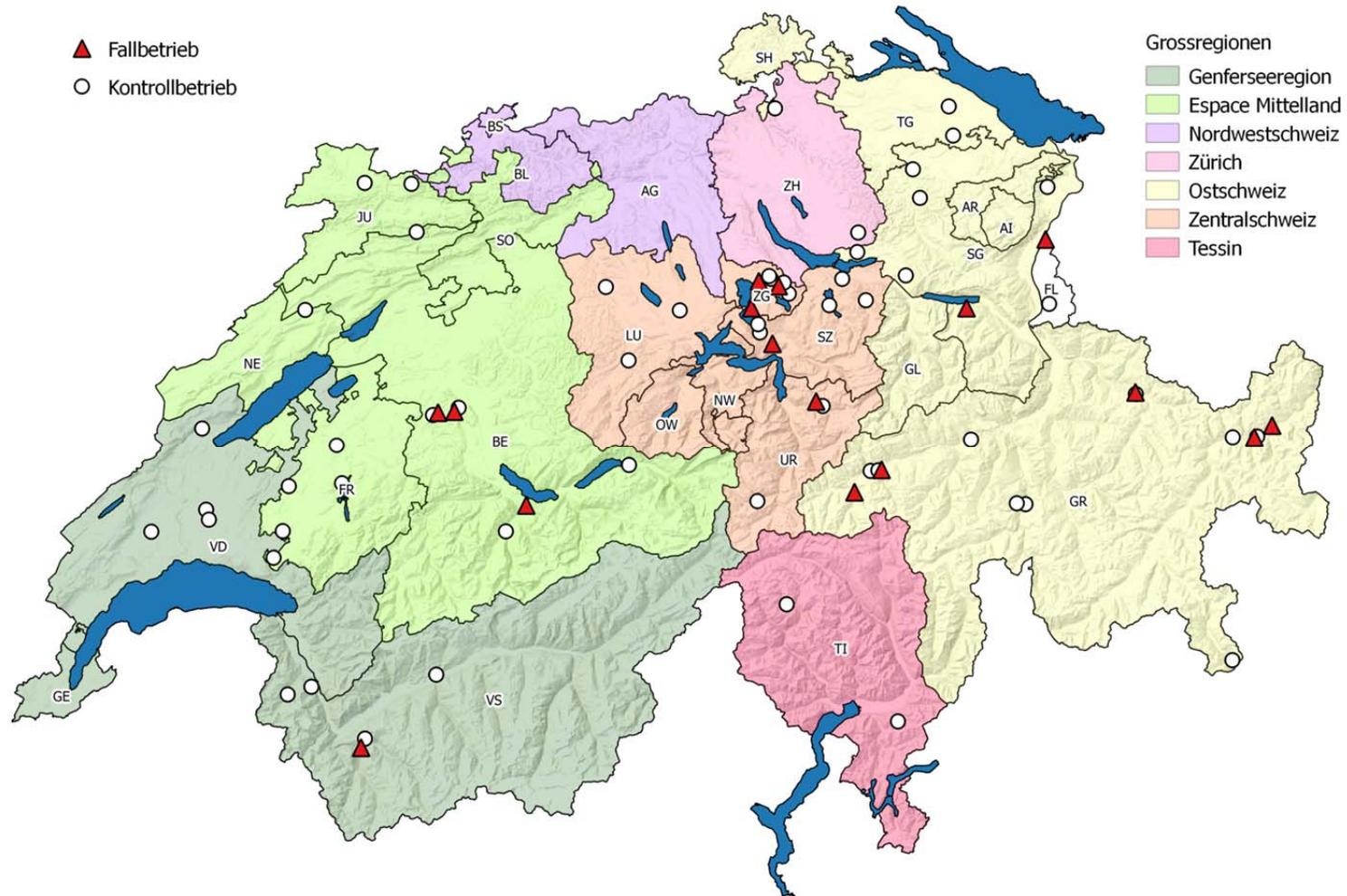
Aus insgesamt 54 Betrieben mit seropositiven Tieren, die im Kreuz-SNT untersucht wurden und aus 56 Kontrollbetrieben ohne seropositive Tiere, die zwischen Februar 2014 und Juni 2015 rekrutiert wurden, standen mittels standardisiertem Fragebogen erhobene, detaillierte Betriebsdaten zur Verfügung. Aufgrund der im Kreuz-SNT erhobenen Resultate von insgesamt 145 Serumproben aus diesen Betrieben konnten 37 Proben aus 16 Betrieben der Infektionsquelle BDV zugeordnet werden (Fallbetriebe; Tab. 13). Weitere 3 Proben aus diesen Fallbetrieben wurden als „nicht zugeordnet“ und 1 Probe als negativ bewertet. In keinem Fall wurde BVDV als Quelle identifiziert. Aufgrund der geringen Anzahl von Fallbetrieben wurden zusätzlich zu den gepaarten Kontrollbetrieben dieser Betriebe auch solche Kontrollbetriebe in die Auswertung einbezogen, deren gepaarter Fallbetrieb aufgrund der Ergebnisse der Serologie aus der Studie ausgeschlossen wurde.

Tabelle 13: Kreuz-SNT Resultate der Serumproben von Tieren aus seropositiven Betrieben

Resultat	Anz. Proben	%-Anteil
BVD	78	53.79
BD	37	25.52
Nicht zugeordnete Seren	26	17.93
Negative Seren	4	2.76
Total	145	100

Diese 16 Fallbetriebe verteilten sich auf 7 Kantone und das Fürstentum Liechtenstein (Abb. 12). In der Zentral- und Ostschweiz und dem Fürstentum Liechtenstein befanden sich 12 Betriebe, ein Betrieb lag in der Genferseeregion und 3 Betriebe im Espace Mittelland (definierte Grossräume gemäss dem Bundesamt für Statistik).

Abbildung 12: Geografische Verteilung der Fall- und Kontrollbetriebe in den 7 Grossregionen der Schweiz und dem Fürstentum Liechtenstein



Die Karte wurde mit dem Geoinformationssystem QGIS 2.8.1-Wien erstellt; $n_{\text{Fälle}} = 16$; $n_{\text{Kontrollen}} = 56$

5.8.1. Deskriptive Statistik

5.8.1.1. Betriebsstrukturen

Mit Ausnahme eines Betriebes hielten gemäss den Antworten aus den Fragebogen alle Fallbetriebe ($n_F = 15$) kleine Wiederkäuer (Tab. 14). Dieser Betrieb hatte jedoch gemäss Angaben aus der TVD ebenfalls Ziegen gehalten. Bei den Kontrollbetrieben ($n_K = 56$; 16 individuell gepaarte- und 40 weitere Betriebe) lag der Anteil der Betriebe mit kleinen Wiederkäuern hingegen lediglich bei 27%. In 7 Fall- und 3 Kontrollbetrieben wurden neben Rindern sowohl Schafe als auch Ziegen gehalten.

Tabelle 14: Fall- und Kontrollbetriebe mit und ohne Haltung von kleinen Wiederkäuern

Kategorien	Fallbetriebe n (n = 16)	Kontrollbetriebe n (n = 56)
nur Rd	1	40
Rd + Sf	7	6
Rd + Zg	1	6
Rd + Sf + Zg	7	3
k. A.	0	1

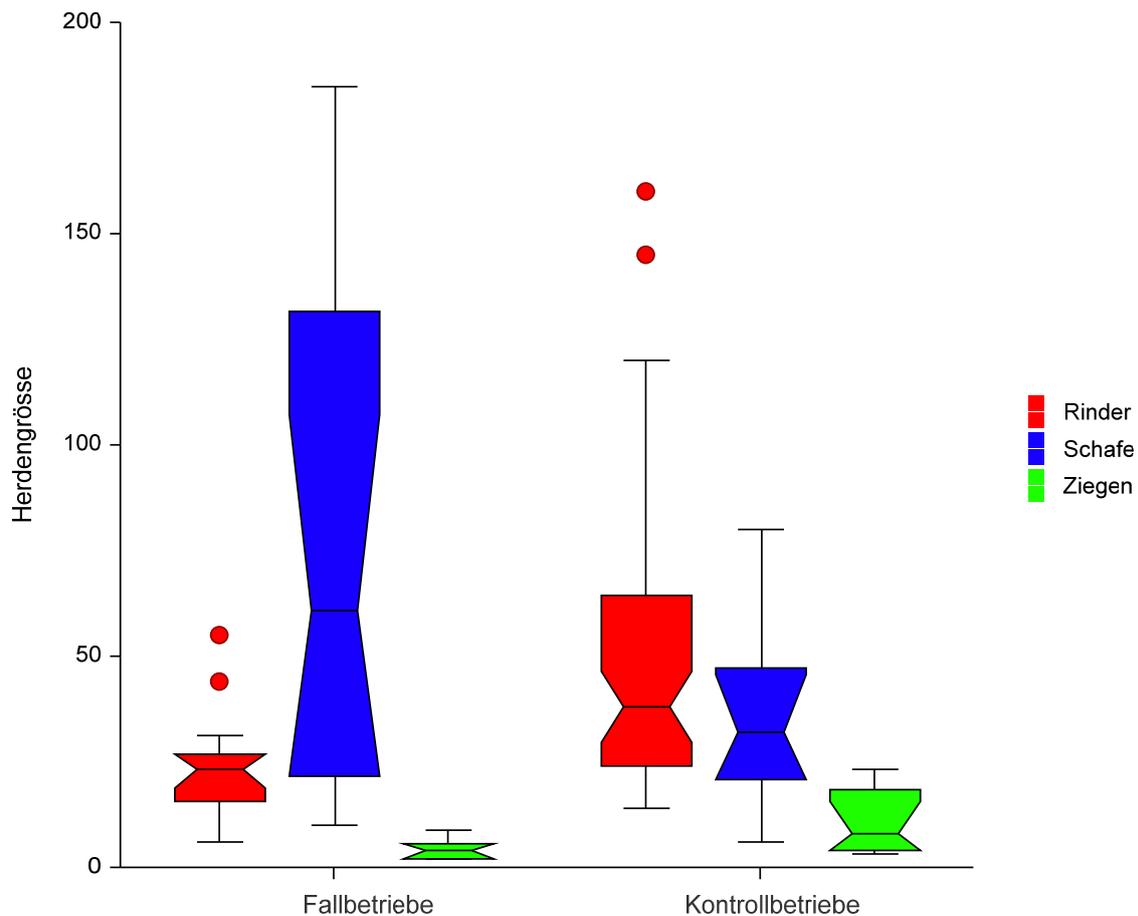
Rd = Rinder; Sf = Schafe; Zg = Ziegen; k. A. = keine Angaben

Die Fallbetriebe hatten signifikant kleinere Rinderherden als die Kontrollbetriebe (Abb. 13; Tab. 17). Mit Ausnahme eines Betriebes mit 55 Rindern hielten die Fallbetriebe zu diesem Zeitpunkt weniger als 50 Rinder. In der Gruppe der Kontrollbetriebe waren 5 Betriebe mit mehr als 100 Rindern und 15 Betriebe mit 50 bis 100 Rindern vertreten. Die restlichen Kontrollbetriebe ($n = 36$) hatten weniger als 50 Rinder.

Mehr als die Hälfte der schafhaltenden Fallbetriebe ($n = 8$) hielten 50 oder mehr Schafe. Von diesen hielten 5 Betriebe mehr als 100 Schafe zur Fleischproduktion. 8 von 9 Kontrollbetrieben hatten hingegen nicht mehr als 49 Schafe.

In Fall- und Kontrollbetrieben war die Herdengrösse der Ziegen klein, wobei alle ziegenhaltenden Fallbetriebe ($n = 8$) und zwei Drittel der ziegenhaltenden Kontrollbetriebe ($n = 6$) nicht mehr als 9 Ziegen besaßen. In zwei Kontrollbetrieben standen 14 resp. 23 – und in einem Fall sogar 122 Ziegen, die sowohl für die Milch-, Fleischproduktion und die Aufzucht genutzt wurden.

Abbildung 13: Herdengrösse der Rinder, Schafe und Ziegen in Fall- und Kontrollbetrieben¹



¹Angaben beziehen sich auf den Befragungszeitpunkt

5.8.1.2. Rasse der Rinder

Aufgrund des Vorkommens vieler Rassen in beiden Betriebsgruppen wurden diese gemäss Nutzungsart in folgende drei Hauptgruppen unterteilt: „Milch“, „Zweinutzung“ und „Fleisch & Andere“. Kreuzungen, Eringer und Grauvieh wurden unter „Andere“ zusammengefasst. Die Milchrassen (Braunvieh, Holstein und Jersey) waren in beiden Gruppen mit rund 50% vertreten. Die Kategorie der Fleischerassen (hauptsächlich Limousin) und andere Rassen stand in beiden Betriebsgruppen an zweiter Stelle mit 18 Rindern in den Fall- und 77 Rindern in den Kontrollbetrieben. Fleckvieh-Rinder (Zweinutzungsrasse) waren nur in der Kontrollgruppe (47 Fleckvieh-Rinder und 18 andere, 23%) vertreten. In den Fallbetrieben wurden insgesamt 3 Zweinutzungs-Rinder (7%) gehalten.

5.8.1.3. Betriebe mit kleinen Wiederkäuern

In den Fall- sowie in den Kontrollbetrieben wurde grösstenteils das Weisse Alpenschaf gehalten ($n_F = 10$ von 14; $n_K = 6$ von 9), das im gesamten Schweizer Herdebuchbestand etwa zur Hälfte vertreten ist. Bei den Ziegen war die Verteilung der Rassen heterogener, indem in beiden Betriebsgruppen 6 verschiedene Rassen gehalten wurden. Aufgrund der kleinen Anzahl Ziegenbestände liess sich kein aussagekräftiges Muster erkennen.

Der Grund für die Haltung unterschied sich zwischen Schafen und Ziegen, nicht jedoch zwischen Fall- und Kontrollbetrieben. Ziegen wurden meist als Hobby ($n_F = 5$ von 8; $n_K = 7$ von 9) und nur zu einem kleinen Teil für Milch- oder Fleischproduktion gehalten. Die Schafe wurden hingegen hauptsächlich für die Produktion von Fleisch gehalten ($n_F = 13$ von 14; $n_K = 8$ von 9), teilweise in Kombination mit Zucht oder Landschaftspflege.

In den letzten 12 Monaten vor der Befragung stellten bei Schafen 9 von 14 Fallbetrieben und 5 von 9 Kontrollbetrieben mindestens ein Symptom fest, das auf eine Pestivirusinfektion hindeuten könnte. Am häufigsten waren Lämmerverluste ($n_F = 8$; $n_K = 5$), gefolgt von Totgeburten ($n_F = 4$; $n_K = 2$), Kümmern ($n_F = 2$; $n_K = 1$) sowie Aborten ($n_F = 2$; $n_K = 1$). In einem Fallbetrieb wurden auch zitternde Lämmer festgestellt. Vliesveränderungen bei Lämmern wurden von keinem Schafhalter beobachtet.

Die Schafe wurden im Gegensatz zu den Ziegen in den Fall- und Kontrollbetrieben meist gesömmert ($n_F = 12$ von 14; $n_K = 6$ von 8). Während der Sömmern wurden die Schafe meist nur zusammen mit Schafen aus anderen Betrieben gehalten. In zwei Fall- und zwei Kontrollbetrieben wurden die Schafe mit Rindern zusammen gesömmert.

5.8.1.4. Direkte Kontakte zu betriebseigenen kleinen Wiederkäuern

In den Fallbetrieben wurden die betriebseigenen Schafe zum Grossteil ($n = 11$ von 14) in gemeinsamer Stallhaltung (1 offener Raum) mit den Rindern gehalten (Tab. 15), in den Kontrollbetrieben mit Schafhaltung nur zu einem Drittel. In 6 von diesen 11 Fallbetrieben resp. in 2 von diesen 3 Kontrollbetrieben wurde die ganze Herde gemeinsam mit den Rindern eingestallt. In 10 von diesen 11 Fallbetrieben resp. in 2 von 3 Kontrollbetrieben handelte es sich um eine saisonale, gemeinsame Einstallung über die Wintermonate. Die Schafe wurden mit Ausnahme eines Kontrollbetriebes in separaten Buchten oder Paddocks gehalten. Die Möglichkeit eines direkten Kontakts via Schnauzenkontakt, gemeinsam genutzte Futterquelle oder Tränke bestand in 7 Fallbetrieben und in einem Kontrollbetrieb. In den übrigen Betrieben bestand eine vollständige Abtrennung ohne direkte Kontaktmöglichkeit zwischen den Tierarten. In mehr als der Hälfte der Fallbetriebe (7 von 11)

fanden die Ablammungen in der Einstellungsperiode mit den Rindern statt; für die Kontrollbetriebe standen diesbezüglich keine Informationen zur Verfügung.

Tabelle 15: Fall- und Kontrollbetriebe mit gemeinsamer Stallhaltung von Schafen und Rindern

Kategorien	Fallbetriebe n (n = 11)	Kontrollbetriebe n (n = 3)
Ganze Herde	6	2
Während den Wintermonaten	10	2
Haltung in separaten Buchten	11	2
Direkte Kontaktmöglichkeit	7	1
Ablammung im Stall	7	k. A.

k. A. = keine Angaben

Ein Weidekontakt zwischen Schafen und Rindern aufgrund gemeinsamer Weidehaltung oder einer angrenzenden Weide war in 6 von 14 Fallbetrieben und in 6 von 9 Kontrollbetrieben gegeben. Die Kontakthäufigkeit und -intensität zwischen betriebseigenen Schafen und Rindern wurden in 6 Fallbetrieben als häufig und/oder intensiv beurteilt.

Die Ziegen befanden sich in 5 Fallbetrieben und in 4 Kontrollbetrieben im gleichen Stall wie die Rinder. In 8 Betrieben war die ganze Herde über den Winter eingestallt, in einem Fallbetrieb übers ganze Jahr. Ein direkter Kontakt zwischen den Tierarten war in einem Fall- und in drei Kontrollbetrieben möglich. Die Kontakthäufigkeit und -intensität zwischen Ziegen und Rindern wurden sowohl in zwei Fall-, als auch in zwei Kontrollbetrieben als häufig und/oder intensiv beurteilt.

5.8.1.5. Direkte Kontakte zu nicht-betriebseigenen (Wild-) Wiederkäuern

In der Mehrzahl der befragten Betriebe wurden die Rinder gesömmert ($n_F = 14$; $n_K = 44$). In dieser Periode hatten aber nur wenige Rinder zu kleinen Wiederkäuern aus anderen Herden Kontakt ($n_F = 3$; $n_K = 11$). Ausserhalb der Sömmerung weideten die Rinder aus 6 Fall- und 11 Kontrollbetrieben zusammen mit anderen Rinderherden, wobei jeweils für einen Betrieb pro Betriebsgruppe ein Weidekontakt zu betriebsfremden kleinen Wiederkäuern bestand. Eine Kontaktmöglichkeit zu betriebsfremden kleinen Wiederkäuern auf der Nachbarweide war zusätzlich in 2 Fall- und in 3 Kontrollbetrieben gegeben.

Wildwiederkäuer wie Rehe, Hirsche, Gämse und Steinböcke, die auf dem Heimbetrieb und/oder während der Sömmerung Kontaktmöglichkeiten zu Rindern hatten, wurden von 7 Tierhaltern von Fall- bzw. von 21 Tierhaltern von Kontrollbetrieben beobachtet.

5.8.1.6. Indirekte Kontakte

Bei indirekten Kontakten zwischen Rindern und kleinen Wiederkäuern über Betreuungspersonen, Haustiere, Schadhager, Gerätschaften oder gemeinsam benutzte Weiden konnten zwischen Fall- und Kontrollbetrieben keine auffälligen Unterschiede festgestellt werden.

5.8.1.7. Zukäufe (Tierverkehr)

In den Fallbetrieben wurden in den letzten 12 Monaten vor der Befragung häufiger Zukäufe von Rindern getätigt als in den Kontrollbetrieben ($n_F = 13$ von 16; $n_K = 32$ von 56).

Fallbetriebe tätigten ihre Käufe meist exklusiv von Privatpersonen ($n = 7$), gefolgt von Zukäufen aus privater und öffentlicher Quelle (Viehhändler, Märkte, Schauen) oder exklusiv aus öffentlicher Quelle ($n = 6$). Die Kontrollbetriebe kauften nur zu einem Drittel von Privatpersonen zu. Mit Ausnahme eines Kontrollbetriebes, der auch aus Österreich zukaufte, stammten alle zugekauften Tiere aus der Schweiz.

Die Zukäufe von kleinen Wiederkäuern wiesen keine deutlichen Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollbetrieben auf. In mehr als der Hälfte beider Betriebsgruppen wurden Zukäufe von Schafen ($n_F = 9$ von 14; $n_K = 5$ von 9) und Ziegen ($n_F = 5$ von 8; $n_K = 5$ von 9) getätigt.

5.8.2. Univariable Analyse

Die Häufigkeitsverteilung in den Fall- und Kontrollbetrieben wurde für jeden potenziellen Risikofaktor zunächst univariat evaluiert. Mittels Pearsons's Chi Square Test wurden bei 9 von 50 kategorialen und (mittels Mann-Whitney-U-Test oder t-Test) bei 4 von 5 kontinuierlichen Variablen signifikante Unterschiede ($p < 0.1$) festgestellt (Tab. 16a, b und 17). Die Variablen Schafhaltung, Rasse der Schafe und Herkunft der Rinder wiesen die kleinsten p-Werte auf (< 0.0001). Bei den kontinuierlichen Variablen war die Anzahl der Rinder sehr deutlich ($p = 0.0006$) und die Anzahl Ziegen, Schafe und Lämmerverluste deutlich verschieden zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 16a: Kategorielle Risikofaktoren mit signifikantem Unterschied zwischen Fall (BDV-seropos.)- und Kontrollbetrieben (seroneg.)

Risikofaktoren	Beschreibung	Kategorien	Fälle (n = 16)	Kontrollen (n = 56)	P-Wert ^a
Schafe	Haltung von betriebseigenen Schafe	Ja	14	9	< 0.0001
		Nein	2	47	
Rasse Sf	Rasse der betriebseigenen Schafe	WAS	10	6	< 0.0001
		andere	4	3	
		Keine Schafe	2	47	
Gleicher Stall Sf	Schafe und Rinder werden im gleichen Stall gehalten	Ja	11	3	0.0300
		Nein	3	6	
Haltung Sf	Haltungssystem der Schafe im gleichen Stall mit Rindern	gemeinsame Aufstallung	0	1	0.0469
		separate Buchten	11	2	
Kontakt-Rating Sf	Einschätzung des Kontakts zwischen Sf & Rd durch TH	häufig / intensiv	6	0	0.0312
		selten / gering	5	8	
		k. A.	3	1	
Ziegen	Haltung von betriebseigenen Ziegen	Ja	8	9	0.0048
		Nein	8	47	
Nachbarweide Rd	Weidekontakt zu nicht-betriebseigenen kleinen Wdk.	Ja	2	3	0.0912
		Nein	12	52	
		k. A.	2	1	

^ap-Werte < 0.1, berechnet mit dem Pearson's Chi-Square Test

WAS = Weisses Alpenschaf; Rd = Rinder; Sf = Schafe; Wdk. = Wiederkäuer; TH = Tierhalter; k. A. = keine Angaben

Tabelle 16b: Kategoriale Risikofaktoren auf Tierebene mit signifikantem Unterschied zwischen Fall (BDV-seropos.)- und Kontrollbetrieben (seroneg.)

Risikofaktoren	Beschreibung	Kategorien	Fälle (n = 37)	Kontrollen (n = 280)	P-Wert^a
Rasse Rd	Rasse der Rinder gemäss Nutzungsart	Milch	19	138	0.0665
		Fleisch & andere	15	77	
		Zweinutzung	3	65	
Herkunft Rd	Geburt im befragten Betrieb oder zugekauft	Betrieb	19	228	< 0.0001
		Zukauf	18	52	

^ap-Werte < 0.1, berechnet mit dem Pearson's Chi-Square Test

Rd = Rinder

Tabelle 17: Kontinuierliche Risikofaktoren mit signifikantem Unterschied zwischen Fall (BDV-seropos.)- und Kontrollbetrieben (seroneg.)

Risikofaktoren	Beschreibung	Fälle / Kontrollen	MW	Median	1. Quantil	3. Quantil	P-Wert
Anz. Rinder	Herdengrösse der Rinder zum Befragungszeitpunkt	Fälle (n = 16)	23.94	23	15.75	26.75	0.0006 ^a
		Kontrollen (n = 56)	51.71	38	24	64.4	
Anz. Ziegen	Herdengrösse der Ziegen zum Befragungszeitpunkt	Fälle (n = 8)	4.25	4	2	5.75	0.0648 ^a
		Kontrollen (n = 9)	21.33	8	4	18.5	
Anz. Schafe	Herdengrösse der Schafe zum Befragungszeitpunkt	Fälle (n = 14)	76.86	61	21.5	131.5	0.0704 ^b
		Kontrollen (n = 9)	36.11	32	21	47	
Symptome Sf	Anzahl Lämmerverluste je Betrieb im letzten Jahr	Fälle (n = 8)	8.5	6	3.25	16.75	0.0824 ^a
		Kontrollen (n = 5)	3.6	2	2	6	

^ap-Werte < 0.1, berechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test

^bp-Werte < 0.1, berechnet mit dem t-Test

Anz. = Anzahl; Sf = Schafe; MW = Mittelwert

5.8.3. Logistische Regression

Gemäss univariater Analyse signifikante ($p < 0.1$) und weitere epidemiologische relevante Variablen im Zusammenhang mit dem Tierverkehr (Zukauf, Herkunft) wurden mittels schrittweiser Vorwärtsselektion in das logistische Regressionsmodell eingeführt. Auf Ebene der Betriebe wurden die Risikofaktoren „Gleicher Stall Sf“ (OR = 167.23) und „Zukauf Rd“ (OR = 9.57), auf Ebene Einzeltiere der Risikofaktor „Herkunft Rd“ (OR = 4.16) im definitiven Modell als signifikant bestätigt (Tab. 18).

Tabelle 18: Risikofaktoren im konditionalen, logistischen Regressionsmodell

Risikofaktoren	Beschreibung	P-Wert	OR (KI95%)
Gleicher Stall Sf	Schafe und Rinder wurden im gleichen Stall gehalten	< 0.0001	167.23 (15.37 – 1819.29)
Zukauf Rd	Betrieb kaufte in den letzten 12 Monaten Rinder zu	0.0426	9.57 (1.08 – 84.95)
Herkunft Rd	Einzeltier stammte aus einem Zukauf	0.0028	4.16 (1.64 – 10.60)

OR = Odds Ratio; KI = Konfidenzintervall; Sf = Schafe; Rd = Rinder

6. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Häufigkeit von Border Disease Virus Infektionen bei Rindern und deren möglicher Einfluss auf das serologische Überwachungsprogramm der Bovinen Virusdiarrhoe in der Schweiz zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst die technischen Parameter des Serumneutralisationstests zur effizienteren Massenuntersuchung adaptiert, indem für den Testansatz die Methode gemäss OIE (Office International des Epizooties, 2015) mit Zellen in Suspension statt mit vorbestehenden Zellrasen angewandt wurde. Dies ermöglichte eine raschere Durchführung der seriellen Verdünnungsreihen direkt in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten. Für die Selektion der am besten geeigneten Challenge-Virusstämme für den Kreuz-SNT wurden alle Kombinationen von einem von 6 BVDV Stämmen und einem von 4 BDV Stämmen unter Zuhilfenahme geeigneter, möglichst homologer Seren überprüft. Als optimal erwies sich die Kombination von BVDV-1a (R1935/72) und BDV Swiss a (R9336/11), bei welcher 8 der 10 homologen Seren (davon alle BDV-spezifischen, Tab. 10) der korrekten Infektionsquelle zugeordnet wurden, bei höchstem Mittelwert der Titer-Quotienten (Mittelwert = 33.6). Die Überprüfung der Challenge-Virus-Dosen im „erlaubten“ Bereich (± 0.5 log für das Viruspaar im Kreuz-SNT) bestätigte im Wesentlichen den in der klassischen Serologie verwendeten Quotienten von 4 für signifikante Titerunterschiede (Tab. 6). Die Verwendung des cytopathogenen Stamms BVDV-1a hatte den Vorteil, dass die mikroskopische Auswertung im nativen Zustand der Zellen ohne Fixation und Färbung vorgenommen werden konnte. Mit dieser Viruskombination allein konnte jedoch bei mehr als der Hälfte der untersuchten Feldseren (56.2%) nicht zwischen BVDV und BDV als Infektionsquelle differenziert werden (Tab. 11). Zur Ergänzung des BVDV-1 Subgenotyps a, der in der Schweizer Rinderpopulation nicht zirkuliert, wurde der am häufigsten isolierte Stamm BVDV-1 Subgenotyp h (Bachofen et al., 2008) als drittes Challenge-Virus zugezogen. Dadurch konnte der Anteil nicht zugeordneter Seren auf 18.4% der untersuchten Proben reduziert werden (Tab. 12). Bei vorliegender BVDV-Infektion wurden aufgrund der zu erwartenden, engeren antigenetischen Verwandtschaft des infizierenden Stamms zum Subgenotyp h höhere Titer gegen BVDV-1h als gegen BVDV-1a beobachtet. Diese Resultate stellen eine erhebliche Verbesserung zur früher etablierten Triage dar, bei welcher mit 2 Stämmen, BVDV-1a und BDV Moredun, die beide nicht in der Schweiz zirkulieren, gearbeitet wurde (Danuser et al., 2009). Die alleinige Verwendung von BVDV-1h in Kombination mit BDV Swiss a konnte jedoch wegen zu schwacher Differenzierung von BDV-Infektionen nicht favorisiert werden. Eine weitere Reduktion des Anteils bezüglich Infektionsquelle nicht differenzierbarer Proben erwies sich aufgrund der beobachteten Titer-Quotienten als schwierig. Zu diesem Zweck müsste im Rahmen eines akuten Infektionsgeschehen ein direkter Virusnachweise verbunden mit der

Sequenzierung eines Genomabschnitts durchgeführt werden (Stalder et al., 2015). Die Adaptierung des Triagesystems zur serologischen Differenzierung der Pestivirus-Infektionsquelle bei Wiederkäuern auf die vorherrschende epidemiologische Situation bezüglich zirkulierender Virusstämme erwies sich in dieser Arbeit als unerlässliche Bedingung zur Erreichung einer möglichst guten Trennschärfe.

Die Resultate des Kreuz-SNTs mit den Challenge-Virusstämmen BDV Swiss a, BVDV-1a und -1h zeigen, dass die Pestivirus-Infektionen bei Rindern in der Schweiz mehrheitlich (71.5%) auf BVD-Viren zurückzuführen sind, während nur 6.7% nachweislich durch BDV-Viren induziert wurden (Tab. 12). Dabei gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass möglicherweise ein Teil der serologisch nicht unterscheidbaren Infektionen (18.4%) ebenfalls BDV als Quelle haben könnten. Die BDV-Seroprävalenz beim Rind nahm von 2012 bis 2014 leichtgradig von 4.2% auf 8.1% zu (nicht gezeigt), währenddem die Pestivirus-Seroprävalenz stetig abnahm (Di Labio, 2015). Diese Resultate weisen deutlich hin auf das epidemiologische Störpotenzial von kleinen Wiederkäuern, insbesondere von Schafen, für die BVD-Bekämpfung beim Rind. Alle Fallbetriebe und die Mehrzahl der Betriebe, bei denen serologisch eine BDV-Infektion festgestellt wurden, hielten gemäss TVD kleine Wiederkäuer, wobei es sich häufiger um Schafe als um Ziegen handelte. Interessanterweise wurden Schafherden mit mehr als 100 Tieren nur in Fallbetrieben beobachtet. Der grösste Anteil BDV-spezifischer Seren ($n = 36$; 34.6%), wie auch die höchste BDV-Seroprävalenz (19.0%) wurde in der Zentralschweiz festgestellt (Abb. 10). Gemessen an der gesamtschweizerischen Schafpopulation liegt die Anzahl Tiere wie auch die Anzahl Proben (Abb. 3) in dieser Region jedoch im Durchschnitt aller Grossregionen (Bundesamt für Statistik, 2014b).

Ein geringer Anteil von Proben (3.4%), die im ELISA als positiv klassifiziert wurden, konnten im verwendeten Kreuz-SNT nicht bestätigt werden, was durch die höhere Spezifität des Neutralisationstests bedingt ist (Canal et al., 1998). Die im Übrigen signifikante, wenn auch nicht strikte Korrelation der Resultate ($R^2 < 0.28$) ergibt sich aus der Natur der beiden Nachweisverfahren (Abb. 8). Während im SNT die spezifische, funktionelle Bindung von Antikörpern an neutralisierende Epitope vor allem auf dem Glykoprotein E2 in nativer Konformation gemessen wird, handelt es sich beim ELISA um einen qualitativen Nachweis der Bindung an undefinierte Epitope der verschiedenen Virusproteine, insbesondere NS3 (Sandvik, 1999).

Mittels Regressionsmodell zur Bestimmung des Einflusses potenzieller Risikofaktoren für eine BDV-Infektion konnten Hinweise auf die Bedeutung von kleinen Wiederkäuern eruiert werden. Die gemeinsame Stallhaltung von Schafen und Rindern wurde im definitiven logistischen Regressionsmodell als Risikofaktor mit der höchsten Odds Ratio identifiziert. Als weitere Variablen mit signifikantem, wenn auch geringerem Einfluss erwiesen sich der

Zukauf von Rindern sowohl auf Betriebs- als auch auf Einzeltierebene (OR = 9.57; KI_{95%}: 1.08 – 84.95; OR = 4.16; KI_{95%}: 1.64 – 10.60; Tab. 18). Auf die Bedeutung der gemeinsamen Stallhaltung als Haupteinflussfaktor wurde auch in anderen Studien hingewiesen (Braun et al., 2013a; Braun et al., 2013b; Carlsson und Belák, 1993; Krametter-Froetscher et al., 2010a; Reichle, 2009). Auch in diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass ein enger Kontakt zwischen den beiden Spezies zu einer Übertragung von BD-Viren von Schafen auf Rinder führte. Insbesondere muss damit gerechnet werden, dass persistent mit BDV-infizierte Schafe ein bedeutendes Risiko für die (Re-) Infektion BVDV-freier Rinderherden mit gemeinsamer Stallhaltung darstellen. Die Bedeutung dieses Infektionsweges nimmt mit dem Fortschreiten des BVD-Eradikationsprogramms im gleichen Mass zu, wie die Seroprävalenz der Rinderpopulation sinkt und demzufolge die Empfänglichkeit für Pestivirusinfektionen steigt (Krametter-Froetscher et al., 2010a). Es muss deshalb im Hinblick auf die Interspeziesübertragung von BD-Viren dringend vor gemeinsamer Haltung von Schafen und Rindern gewarnt werden. Bei der Minimierung der Kontaktmöglichkeiten gilt es insbesondere zu beachten, dass bei der Geburt von PI-Schafen während der Ablammungsperiode ein hoher Infektionsdruck besteht (Lindberg et al., 2004). In Tierhaltungen, wo der Kontakt zwischen Rindern und Schafen nicht vermieden werden kann, sollte die Überwachung des BDV-Status der Schafe ins Auge gefasst werden (Strong et al., 2010). Im Schweizerischen BVD-Eradikationsprogramm werden zurzeit jedoch nur Tiere der Rindergattung, nicht aber Schafe und Ziegen erfasst. Die in dieser Arbeit gefundene, durchschnittliche BDV-Seroprävalenz bei seropositiven Rindern von mindestens 6.7%, bei einem deutlich zunehmenden Trend über die Jahre 2012 bis 2014, ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass die serologische Überwachung von BVD mittels ELISA möglicherweise ungenügend ist. Aufgrund der serologischen Kreuzreaktion unter Pestiviren (Becher et al., 2003) werden BDV-Infektionen im ELISA zwar erfasst, aber nicht differenziert. Die Differenzierung im Kreuz-SNT wie in dieser Arbeit ist zwar aufwändig, erlaubt aber die Erkennung der Infektionsquelle, was im Rahmen eines Eradikationsprogramms von Vorteil sein könnte (Krametter-Froetscher et al., 2009). Verdachtsmomente auf eine BDV-Infektion resp. eine sinnvolle Triage der serologischen Differenzierung ergeben sich indessen auch aus der Betriebsstruktur betroffener Tierhaltungen, wenn es sich um gemischte Betriebe handelt.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Prävalenz von BDV in seropositiven Rindern in der Schweiz bestimmt und es konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Stallhaltung von Rindern und Schafen der bedeutendste Risikofaktor für die Interspeziesübertragung von Border Disease Viren auf das Rind ist.

7. Referenzen

Adler, H., Frech, B., Meier, P., Jungi, T.W., Peterhans, E., 1994. Noncytopathic strains of bovine viral diarrhoea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 202, 1562-1568.

Alpay, G., Yesilbag, K., 2015. Serological relationships among subgroups in bovine viral diarrhoea virus genotype 1 (BVDV-1). *Veterinary Microbiology* 175, 1-6.

Archetti, I., Horsfall, F.L., 1950. Persistent Antigenic Variation of Influenza A Viruses After Incomplete Neutralization in Ovo with Heterologous Immune Serum. *Journal of Experimental Medicine* 92, 441-462.

Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.J., Becher, P., 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286, 456-465.

Bachofen, C., Stalder, H., Braun, U., Hilbe, M., Ehrensperger, F., Peterhans, E., 2008. Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Veterinary Microbiology* 131, 93-102.

Bachofen, C., Vogt, H.R., Stalder, H., Mathys, T., Zanoni, R., Hilbe, M., Schweizer, M., Peterhans, E., 2013. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Veterinary Research* 44, 32.

Barlow, R.M., 1972. Experiments in border disease. IV. Pathological changes in ewes. *Journal of Comparative Pathology* 82, 151-157.

Barlow, R.M., 1990. Border disease virus. In: Dinter, Z., Morein, B. (Eds.), *Virus Infections of Ruminants*. Elsevier Science Publishers B.V., 267-278.

Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., König, M., Thiel, H.J., 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *Journal of General Virology* 78, 1357-1366.

Becher, P., Ramirez, R.A., Orlich, M., Rosales, S.C., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeyer, H., Thiel, H.J., 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96-104.

Berriatua, E., Barandika, J., Aduriz, G., Atxaerandio, R., Garrido, J., García-Pérez, A.L., 2004. Age-specific seroprevalence of Border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. *The Veterinary Journal* 168, 336-342.

Bolin, S.R., Ridpath, J.F., 1992. Differences in virulence between 2 noncytopathic bovine viral diarrhoea viruses in calves. *American Journal of Veterinary Research* 53, 2157-2163.

Braun, U., Hilbe, M., Ehrensperger, F., Salis, F., Alther, P., Strasser, M., Stalder, H.P., Peterhans, E., 2002. Border disease in a flock of sheep. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 144, 419-426.

Braun, U., Bachofen, C., Büchi, R., Hässig, M., Peterhans, E., 2013a. Infection of cattle with Border disease virus by sheep on communal alpine pastures. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 155, 123-128.

Braun, U., Bachofen, C., Schenk, B., Hässig, M., Peterhans, E., 2013b. Investigation of border disease and bovine virus diarrhoea in sheep from 76 mixed cattle and sheep farms in eastern Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 155, 293-298.

Braun, U., Reichle, S.F., Reichert, C., Hässig, M., Stalder, H.P., Bachofen, C., Peterhans, E., 2014. Sheep persistently infected with Border disease readily transmit virus to calves seronegative to BVD virus. *Veterinary Microbiology* 168, 98-104.

Broadbent, C.C., Holyoak, G.R., Dawson, L., Step, D.L., Funk, R.A., Kapil, S., 2007. Transmission of bovine viral diarrhoea virus to adult goats from persistently infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 545-548.

Broadbent, C.C., Lamm, C.G., Kapil, S., Dawson, L., Holyoak, G.R., 2009. Bovine Viral Diarrhoea Virus Abortion in Goats Housed with Persistently Infected Cattle. *Veterinary Pathology* 46, 45-53.

Brownlie, J., 1990. The pathogenesis of bovine virus. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 9, 43-59.

Bundesamt für Statistik, 2014a. Landwirtschaftliche Betriebe nach institutionellen Gliederungen - Landwirtschaftliche Nutzfläche (LN) und Nutztiere auf Klassifizierungsebene 1. Online-Datenrecherche STAT-TAB, <https://www.pxweb.bfs.admin.ch>.

Bundesamt für Statistik, 2014b. Nutztierbestand der Landwirtschaftsbetriebe. Landwirtschaftliche Betriebsstrukturerhebung, <http://www.bfs.admin.ch/bfs/portal/de/index/themen/07/03/blank/data/01/03.html>.

Campbell, J.R., Radostits, O.M., Wolfe, J.T., Janzen, E.D., 1995. An outbreak of border disease in a sheep flock. *The Canadian Veterinary Journal* 36, 307.

Canal, C.W., Strasser, M., Hertig, C., Masuda, A., Peterhans, E., 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Veterinary Microbiology* 63, 85-97.

Carlsson, U., 1991. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record* 128, 145-147.

Carlsson, U., Belák, K., 1993. Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Veterinaria Scandinavica* 35, 79-88.

Celedón, M., Sandoval, A., Droguett, J., Calfio, R., Ascencio, L., Pizarro, J., Navarro, C., 2001. Survey for antibodies to pestivirus and herpesvirus in sheep, goats, alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*), guanacos (*Lama guanicoe*) and vicuna (*Vicugna vicugna*) from Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 33, 165-172.

Couvreux, B., Letellier, C., Collard, A., Quenon, P., Dehan, P., Hamers, C., Pastoret, P.P., Kerkhofs, P., 2002. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Research* 85, 17-28.

Cranwell, M.P., Otter, A., Errington, J., Hogg, R.A., Wakeley, P., Sandvik, T., 2007. Detection of Border disease virus in cattle. *Veterinary Record* 161, 211-212.

Danuser, R., Vogt, H.R., Kaufmann, T., Peterhans, E., Zanoni, R., 2009. Seroprevalence and characterization of pestivirus infections in small ruminants and new world camelids in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 151, 109-117.

Di Labio, E., 2013. BVD: Von der Bekämpfung zur Überwachung der Seuchenfreiheit. Tiergesundheitsbericht. Bundesamt für Veterinärwesen BVET, 19-23.

Di Labio E., 2015. Stand der BVD-Ausrottung in der Schweiz. 9. Stendaler Symposium, 6.-8. Mai, Stendal, Deutschland, Tagungsband S. 42 (<http://www.verbraucherschutz.sachsen-anhalt.de/veterinaermedizin/veranstaltungen/stendaler-symposien/neuntes-stendaler-symposium/>).

Doyle, L.G., Heuschele, W.P., 1983. Bovine viral diarrhoea virus-infection in captive exotic ruminants. Journal of the American Veterinary Medical Association 183, 1257-1259.

Dubois, E., Russo, P., Prigent, M., Thiery, R., 2008. Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. Veterinary Microbiology 130, 69-79.

Edwards, S., 1990. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 9, 115-130.

García-Pérez, A.L., Minguíjon, E., Estévez, L., Barandika, J.F., Aduriz, G., Juste, R.A., Hurtado, A., 2009. Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border disease virus (BDV-4 genotype). Research in veterinary science 86, 345-352.

Giammarioli, M., La Rocca, S.A., Steinbach, F., Casciari, C., De Mia, G.M., 2011. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. Veterinary Microbiology 147, 231-236.

Giangaspero, M., Harasawa, R., 2011. Species characterization in the genus Pestivirus according to palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region. Journal of Virological Methods 174, 166-172.

Graham, D.A., Calvert, V., German, A., McCullough, S.J., 2001. Pestiviral infections in sheep and pigs in Northern Ireland. Veterinary Record 148, 69-72.

Greiser-Wilke, I., Grummer, B., Moennig, V., 2003. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. Biologicals 31, 113-118.

Hilbe, M., Camenisch, U., Braun, U., Peterhans, E., Stalder, H.P., Zlinszky, K., Ehrensperger, F., 2009. Mucosal lesions in a sheep infected with the Border Disease Virus (BDV). Schweizer Archiv für Tierheilkunde 151, 391-396.

Hintze, J.L., 2007. NCSS user's guide. NCSS, Kaysville, Utah.

Hornberg, A., Fernández, S.R., Vogl, C., Vilcek, S., Matt, M., Fink, M., Köfer, J., Schöpf, K., 2009. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. Veterinary Microbiology 135, 205-213.

Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. Veterinary Microbiology 64, 89-107.

Kaerber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archives of Experimental Pathology and Pharmacology 162, 480-487.

Krametter-Froetscher, R., Loitsch, A., Kohler, H., Schleiner, A., Schiefer, P., Möstl, K., Golja, F., Baumgartner, W., 2006. Prevalence of antibodies to pestiviruses in goats in Austria. Journal of Veterinary Medicine Series B - Infectious Diseases and Veterinary Public Health 53, 48-50.

- Krametter-Froetscher, R., Benetka, V., Möstl, K., Baumgartner, W.*, 2008. Transmission of Border Disease Virus from sheep to calves - a possible risk factor for the Austrian BVD eradication programme in cattle? *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 95, 200-203.
- Krametter-Froetscher, R., Benetka, V., Rasser, K., Tockner, F., Mösslacher, G., Möstl, K., Baumgartner, W.*, 2009. BVDV control program in Austria - is a monitoring of the BDV status in sheep in Austria necessary? *Veterinary Medicine* 54, 517-524.
- Krametter-Froetscher, R., Duenser, M., Preyler, B., Theiner, A., Benetka, V., Moestl, K., Baumgartner, W.*, 2010a. Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *The Veterinary Journal* 186, 342-346.
- Krametter-Froetscher, R., Mason, N., Rötzel, J., Benetka, V., Bago, Z., Möstl, K., Baumgartner, W.*, 2010b. Effects of Border disease virus (genotype 3) naturally transmitted by persistently infected sheep to pregnant heifers and their progeny. *Veterinary Medicine* 55, 145-153.
- Lanyon, S.R., Hill, F.I., Reichel, M.P., Brownlie, J.*, 2014. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. *The Veterinary Journal* 199, 201-209.
- Larska, M.*, 2015. Pestivirus infection in reindeer (*Rangifer tarandus*). *Frontiers in microbiology* 6.
- Lazar, C., Zitzmann, N., Dwek, R.A., Branza-Nichita, N.*, 2003. The pestivirus E^{ms} glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology* 314, 696-705.
- Liang, K.Y., Zeger, S.L.*, 1986. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 13-22.
- Lindberg, A., Alenius, S.*, 1999. Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology* 64, 197-222.
- Lindberg, A., Stokstad, M., Løken, T., Alenius, S., Niskanen, R.*, 2004. Indirect transmission of bovine viral diarrhoea virus at calving and during the postparturient period. *Veterinary Record* 154, 463-467.
- Lindberg, A., Houe, H.*, 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. *Preventive Veterinary Medicine* 72, 55-73.
- Liu, L., Xia, H.Y., Wahlberg, N., Belák, S., Baule, C.*, 2009. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 385, 351-357.
- Loken, T., Krogsrud, J., Bjerkas, I.*, 1991a. Outbreaks of Border disease in goats induced by a pestivirus- contaminated Orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *Journal of Comparative Pathology* 104, 195-209.
- Loken, T., Krogsrud, J., Larsen, I.L.*, 1991b. Pestivirus infections in Norway - serological investigations in cattle, sheep and pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 32, 27-34.
- Mathys, T.*, 2007. Interspecies transmission of pestivirus: host tropism and adaptation of BVDV and BDV in bovine, caprine and ovine cells as an in vitro model. Dissertation. Vetsuisse Fakultät Universität Bern.

McFadden, A.M.J., Tisdall, D.J., Hill, F.I., Otterson, P., Pulford, D., Peake, J., Finnegan, C.J., La Rocca, S.A., Kok-Mun, T., Weir, A.M., 2012. The first case of a bull persistently infected with Border disease virus in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 60, 290-296.

Minami, F., Nagai, M., Ito, M., Matsuda, T., Takai, H., Jinkawa, Y., Shimano, T., Hayashi, M., Seki, Y., Sakoda, Y., Sugiura, K., Akashi, H., 2011. Reactivity and prevalence of neutralizing antibodies against Japanese strains of bovine viral diarrhoea virus subgenotypes. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34, 35-39.

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schaetzl, H., 2010. *Molekulare Virologie*. Springer-Verlag.

Müller-Doblies, D., Arquint, A., Schaller, P., Heegaard, P.M.H., Hilbe, M., Albin, S., Abril, C., Tobler, K., Ehrensperger, F., Peterhans, E., Ackermann, M., Metzler, A., 2004. Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 302-312.

Nagai, M., Ito, T., Sugita, S., Genno, A., Takeuchi, K., Ozawa, T., Sakoda, Y., Nishimori, T., Takamura, K., Akashi, H., 2001. Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. *Archives of Virology* 146, 685-696.

Nagai, M., Hayashi, M., Itou, M., Fukutomi, T., Akashi, H., Kida, H., Sakoda, Y., 2008. Identification of new genetic subtypes of bovine viral diarrhoea virus genotype 1 isolated in Japan. *Virus Genes* 36, 135-139.

Negron, M.E., Pogranichny, R.M., Van Alstine, W., Hilton, W.M., Levy, M., Raizman, E.A., 2012. Evaluation of horizontal transmission of bovine viral diarrhoea virus type 1a from experimentally infected white-tailed deer fawns (*Odocoileus virginianus*) to colostrum-deprived calves. *American Journal of Veterinary Research* 73, 257-262.

Nettleton, P.F., 1990. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 9, 131-150.

Nettleton, P.F., Entrican, G., 1995. Ruminant pestiviruses. *British Veterinary Journal* 151, 615-642.

Nettleton, P.F., Gilray, J.A., Russo, P., Dlissi, E., 1998. Border disease of sheep and goats. *Veterinary Research* 29, 327-340.

Niskanen, R., Lindberg, A., Larsson, B., Alenius, S., 2000. Lack of virus transmission from bovine viral diarrhoea virus infected calves to susceptible peers. *Acta Veterinaria Scandinavica* 41, 93-99.

O'Neill, R.G., O'Connor, M., O'Reilly, P.J., 2004. A survey of antibodies to pestivirus in sheep in the Republic of Ireland. *Irish Veterinary Journal* 57, 525-530.

Office International des Epizooties, 2015. Bovine Viral Diarrhoea. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Office International des Epizooties, Paris, 703-704.

Oguzoglu, T.C., 2012. A review of border disease virus infection in ruminants: molecular characterization, pathogenesis, diagnosis and control. *Animal Health, Prod and Hyg* 1, 1-9.

Okur-Gumusova, S., Yazici, Z., Albayrak, H., 2006. Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Revue de Médecine Vétérinaire* 157, 593-596.

- Paton, D.J.*, 1995. Pestivirus Diversity. *Journal of Comparative Pathology* 112, 215-236.
- Paton, D.J., Gunn, M., Sands, J., Yapp, F., Drew, T., Vilcek, S., Edwards, S.*, 1997. Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Archives of Virology* 142, 929-938.
- Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H., Schweizer, M.*, 2010. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research* 41, 44.
- Peterhans, E., Schweizer, M.*, 2013. BVDV: a pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals* 41, 39-51.
- Pizarro-Lucero, J., Celedón, M.O., Aguilera, M., de Calisto, A.*, 2006. Molecular characterization of pestiviruses isolated from bovines in Chile. *Veterinary Microbiology* 115, 208-217.
- Presi, P., Struchen, R., Knight-Jones, T., Scholl, S., Heim, D.*, 2011. Bovine viral diarrhoea (BVD) eradication in Switzerland-Experiences of the first two years. *Preventive Veterinary Medicine* 99, 112-121.
- Preyler-Theiner, B., Krametter-Froetscher, R., Theiner, A., Tichy, A., Möstl, K., Baumgartner, W.*, 2009. Studies on the seroprevalence of pestivirus infections in the goat population of Vorarlberg (Austria). *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 96, 232-239.
- Reichert, C.*, 2009. Infektion von Kälbern, Schafen und Ziegen mit Border-Disease-Virus. Dissertation. Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich.
- Reichle, S. F.*, 2009. Untersuchungen bei Kälbern, die mit Border-Disease infizierten Lämmern zusammengehalten werden. Dissertation. Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich.
- Ridpath, J.F.*, 2010a. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Global Status. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 26, 105-121.
- Ridpath, J.F.*, 2010b. Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 184-191.
- Ridpath, J.F.*, 2013. A need to define characteristics to be used in the taxonomy of the expanding pestivirus genus. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 126, 462-467.
- Ridpath, J.F.*, 2015. Emerging pestiviruses infecting domestic and wildlife hosts. *Animal Health Research Reviews* 16, 55-59.
- Sandvik, T.*, 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology* 64, 123-134.
- Sarrazin, S., Dewulf, J., Mathijs, E., Laureyns, J., Mostin, L., Cay, A.B.*, 2014. Virulence comparison and quantification of horizontal bovine viral diarrhoea virus transmission following experimental infection in calves. *The Veterinary Journal* 202, 244-249.
- SAS Institute Inc.*, 2013. SAS® 9.4 Graph Template Language: User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Schaller, P., Zaroni, R., Vogt, H.R., Strasser, M., Peterhans, E., 1995. Infektionen mit Maedi-Visna und Border-Disease-Viren beim Schaf: Eine Querschnittsstudie zur Bestimmung der Seroprävalenz und zur Identifizierung möglicher assoziierter Faktoren. In: Berger, J. (Ed.), Risikoabschätzung in der Veterinärmedizin - Theorie und Praxis; Berlin, 12. - 14. September 1994; Tagung der Fachgruppe "Epidemiologie und Dokumentation". DVG. Gahming Druck, Giessen, 51-57.

Schaller, P., Vogt, H.R., Strasser, M., Nettleton, P.F., Peterhans, E., Zaroni, R., 2000. Seroprävalenz von Maedi-Visna und Border Disease in der Schweiz. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 142, 145-153.

Schärer, S., Widgren, S., Schwermer, H., Lindberg, A., Vidondo, B., Zinsstag, J., Reist, M., 2015. Evaluation of farm-level parameters derived from animal movements for use in risk-based surveillance programmes of cattle in Switzerland. BMC Veterinary Research 11, 1.

Schiefer, P., Krametter-Froetscher, R., Schleiner, A., Loitsch, A., Golja, F., Möstl, K., Baumgartner, W., 2006. Seroprevalence of antibodies to ruminant pestiviruses in sheep and goats in Tyrol (Austria). Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 113, 55-58.

Schirrmeyer, H., Strebelow, G., Tavella, A., Stifter, E., 2008. Border disease virus infection in cattle-epidemiological and diagnostic impact. 7th ESVV Pestivirus Symposium, Uppsala, Sweden.

Schleiner, A., Krametter-Froetscher, R., Schiefer, P., Loitsch, A., Golja, F., Möstl, K., Baumgartner, W., 2006. Seroepidemiological survey of the dissemination of ruminant pestiviruses in sheep in Carinthia. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 119, 203-208.

Schweizer, M., Peterhans, E., 2014. Pestiviruses. Annual Review of Biosciences 2, 141-163.

Spearman, C., 1908. The Method of 'Right and Wrong Cases' ('Constant Stimuli') Without Gauss's Formulae. British Journal of Psychology 2, 227-242.

Stalder, H.P., Meier, P., Pfaffen, G., Wageck-Canal, C., Rüfenacht, J., Schaller, P., Bachofen, C., Marti, S., Vogt, H.R., Peterhans, E., 2005. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. Preventive Veterinary Medicine 72, 37-41.

Stalder, H.P., Hug, C., Zaroni, R., Vogt, H.R., Peterhans, E., Schweizer, M., Bachofen, C., 2015. A nationwide database linking information on the hosts with sequence data of their virus strains: A useful tool for the eradication of bovine viral diarrhoea (BVD) in Switzerland. Virus Research.

Stalder, H.P., Hug, C., Zaroni, R., Vogt, H.R., Peterhans, E., Schweizer, M., Bachofen, C., 2016. A nationwide database linking information on the hosts with sequence data of their virus strains: A useful tool for the eradication of bovine viral diarrhoea (BVD) in Switzerland. Virus Research, in press.

Steck, F., Lazary, S., Fey, H., Wandeler, A., Huggler, C., Oppliger, G., Baumberger, H., Kaderli, R., Martig, J., 1980. Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhoea-mucosal disease. Zentralblatt für Veterinär Medizin, Reihe B 27, 429-445.

Strong, R., La Rocca, S.A., Ibata, G., Sandvik, T., 2010. Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle. Veterinary Microbiology 141, 208-215.

- Tabbaa, D., Giangaspero, M., Nishikawa, H., 1995. Seroepidemiological survey of Border disease (BD) in Syrian Awassi sheep. Small Ruminant Research 15, 273-277.*
- Tegtmeier, C., Stryhn, H., Uttenthal, A., Kjeldsen, A.M., Nielsen, T.K., 2000. Seroprevalence of border disease in Danish sheep and goat herds. Acta Veterinaria Scandinavica 41, 339-344.*
- Thabti, F., Letellier, C., Hammami, S., Pepin, M., Ribiere, M., Mesplede, A., Kerkhofs, P., Russo, P., 2005. Detection of a novel border disease virus subgroup in Tunisian sheep. Archives of Virology 150, 215-229.*
- Theiner, A., Krametter-Froetscher, R., Preyler, B., Tichy, A., Mostl, K., Baumgartner, W., 2009. Serological investigation of pestivirus antibody prevalence in sheep in Vorarlberg (Austria). Wiener Tierärztliche Monatsschrift 96, 215-221.*
- Valdazo-González, B., Álvarez, M., Sandvik, T., 2008. Prevalence of border disease virus in Spanish lambs. Veterinary Microbiology 128, 269-278.*
- Van Rijn, P.A., Van Gennip, H.G.P., Leendertse, C.H., Brusckke, C.J.M., Paton, D.J., Moormann, R.J.M., Van Oirschot, J.T., 1997. Subdivision of the Pestivirus Genus Based on Envelope Glycoprotein E2. Virology 237, 337-348.*
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., Paton, D.J., 2005. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. Preventive Veterinary Medicine 72, 31-35.*
- Wang, F.I., Deng, M.C., Huang, Y.L., Chang, C.Y., 2015. Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters. Viruses 7, 3506-3529.*
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G., Thiel, H.J., 1990. Pestivirus Glycoprotein Which Induces Neutralizing Antibodies Forms Part of A Disulfide-Linked Heterodimer. Journal of Virology 64, 3563-3569.*
- Yilmaz, V., Yildirim, Y., Coskun, N., 2014. Molecular and serological investigation of border disease virus infection in sheep in the Kars District of Turkey. Acta Veterinaria Brno 83, 175-179.*
- Zimmerli, U., Presi, P., Heim, D., 2009. BVD-Eradikationsprogramm in der Schweiz: Erste Zwischenbilanz und Ausblick. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 151, 5-11.*

8. Danksagung

Meinen herzlichen Dank geht an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

Prof. Dr. Reto Zanoni und PD Dr. Matthias Schweizer für die kompetente Betreuung und die vielen konstruktiven und wertvollen Anregungen zum Manuskript.

Prof. Dr. Gertraud Schüpbach des Veterinary Public Health Instituts (VPHI) für die fachliche Betreuung der Fall-Kontroll-Studie und die Hilfe bei den statistischen Datenanalysen.

Libby Nebel für die hilfsbereite Einführung in die Laborarbeiten, sowie dem ganzen Laborteam der Rinder- und Pferdediagnostik für die Unterstützung, namentlich Elisabeth Santschi, Eva Bähler, Tanja Oehler, Jenny Bressan, Simon Feyer, Thi My Van Nguyen und Carlos Abril.

Lupe Camina und Antoinette Golomingi für das Herstellen der etlichen EKaNäEp-Zellsuspensionen.

Hanspeter Stalder für die Hilfe bei der Interpretation der Sequenzierungen, sowie Sabrina Marti für die Unterstützung bei der Durchführung von Sequenzierungen.

Allen MitarbeiterInnen des Instituts für Virologie und Immunologie des Standort Berns für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

Claudia Bachofen für den Input bei der Erstellung des Fragebogens sowie für die Hilfe bei der Suche nach geeigneten Challenge-Viren und passenden Seren.

Elena di Labio und Patrick Schaller des Bundesamtes für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV) für das zur Verfügung stellen von Daten sowie für die Hilfe des Erstellens der Kontrollbetriebsliste.

Den BVD-Verantwortlichen der kantonalen Veterinärämter und dem Landesveterinäramt des Fürstentum Liechtenstein sowie den beauftragten (amtlichen) Tierärzten, welche die Daten in den Fall- und Kontrollbetrieben erhoben haben.

Meiner lieben Familie.

9. Curriculum Vitae

Kaiser, Vanessa Lisa

Geburtsdatum 26. Juli 1987

Geburtsort Biel

Nationalität Schweiz

Heimatort Leuzigen

08/1994 – 07/2000	Primarschule, Leuzigen
08/2000 – 07/2002	Sekundarschule, Arch
08/2002 – 07/2006	Kantonsschule Solothurn Schwerpunktfach: Wirtschaft und Recht
09/2006 – 07/2011	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät Bern Schwerpunkt: Kleintiere
28.10.2011	Staatsexamen der Veterinärmedizin, Vetsuisse-Fakultät Bern
02/2012 – 12/2013	Hochschulpraktikantin, anschliessend wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bundesamt für Veterinärwesen (BVET), Bern
08/2012 – 08/2013	BVD-Koordinatorin der Vereinigung der Schweizer Kantonstierärztinnen und Kantonstierärzte (VSKT), Bern
01/2014 – 02/2014	Praktikantin im kantonalem Veterinäramt Jura, Delémont
05/2014 – 02/2016	Dissertationsarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Reto Zanoni und PD Dr. Matthias Schweizer am Institut für Virologie und Immunologie, Bern

Datum, Ort: _____

Unterschrift Doktorandin: _____

10. Anhang

10.1. Fragebogen für Fall- und Kontrollbetriebe

Fragebogen zum Forschungsprojekt

„Einfluss des Border Disease Virus von Kleinwiederkäuern auf die serologische Überwachung der Bovinen Virusdiarrhoe bei Rindern in der Schweiz“

Teil A

Allgemeine Betriebsangaben

1. Betriebsgruppe

- Fallbetrieb (positive Rindergruppe) Kontrollbetrieb (negative Rindergruppe)

2. Befragungsart

- persönlich vor Ort telefonisch

3. Datum der Befragung: _____

4. Betriebsnummer TVD: _____

5. Name / Vorname des Tierhalters: _____

6. Betriebstyp: *(Mehrfachantworten möglich)*

- Milch Mast Mutterkuhhaltung Aufzuchtbetrieb
 Hobby Anderer: _____

7. Haltungssystem: *(Mehrfachantworten möglich)*

- Anbindestall Laufstall Anderes: _____

8. Bestand:

Aktuelle Anzahl Rinder (total): _____, davon

Kälber: _____

Rinder: _____

Kühe: _____

Stiere: _____

9. Rassen:

Welche Rasse wird bzw. welche Rassen werden hauptsächlich gehalten:

10. a) Welche der folgenden Tierarten werden auf Ihrem Betrieb gehalten?

(Mehrfachantworten möglich)

- Schafe Ziegen Schweine
- Gehegewild (bitte Tierart angeben): _____ keine der Genannten

Falls Gehegewild gehalten wird:

10. b) Gibt es zwischen dem Gehegewild und den Rindern Kontakt?

- Ja (bitte beschreiben): _____
- Nein unbekannt

11. Gibt es Heimtiere (Hunde/Katzen), die Kontakt mit den Rindern und den kleinen Wiederkäuern haben?

- Kontakt vorhanden Kontakt unklar keinen Kontakt
- keine Heimtiere vorhanden

12. Haben Sie in den letzten 12 Monaten Schadnager (Mäuse/Ratten) oder Spuren davon im Stall beobachtet?

- Ja Nein unbekannt

Betriebseigene Schafe

13. Wie viele Schafe halten Sie auf Ihrem Betrieb?

Aktuelle Anzahl Schafe (total) : _____, davon

Lämmer: _____

Schafe: _____

Böcke: _____

14. Grund der Schafhaltung: (Mehrfachantworten möglich)

- Milch Fleisch Zucht Hobby
- Anderer: _____

15. Rassen:

Bitte geben Sie für jede Schafrasse die aktuelle Anzahl Tiere an:

Rassen / Kreuzungen:

Anzahl:

_____	_____
_____	_____
_____	_____

16. Ablammzeit:

Bitte geben Sie die (ungefähre) Ablammzeit Ihrer Schafe an: _____

17. a) Werden Rinder und Schafe im gleichen Stall (gleicher/offener Raum) gehalten?

- Ja Nein

Falls ja:

17. b) Welche Schafe befinden sich im gleichen Stall mit den Rindern?

- ganze Herde einzelne Tiergruppe
 Einzeltiere (z.B. für Ablammung) andere (bitte beschreiben): _____

17. c) Haltungszeitpunkt und -dauer der Schafe im gleichen Stall mit den Rindern:

- Winter (bitte ungefähre Zeitspanne angeben): _____
 einzelne Tage (bitte beschreiben und Zeitpunkt angeben): _____
 anderes (bitte beschreiben): _____

17. d) Haltungsform der Schafe im gleichen Stall mit den Rindern:

- gemeinsame Aufstallung mit den Rindern separate Buchten/Paddocks

Falls separate Buchten/Paddocks:

17. e) Abtrennungsart zwischen den Buchten/Paddocks der Schafe und der Rinder: (Mehrfachantworten möglich)

- direkter Schnauzenkontakt zwischen Rindern und Schafen möglich
 gleiche Futterquelle/Tränke der Rinder und Schafe
 Abtrennung ohne möglichen direkten Kontakt zwischen Rinder und Schafe

18. Gibt es Weidekontakt zwischen den Rindern und den Schafen?

- gemeinsame Weidehaltung angrenzende Weide Nein

20. Werden dieselben Weideflächen von Rindern und Schafen bestossen?

- Ja Nein

21. Gibt es Gerätschaften/Viehtransporter, die gemeinsam für Rinder und Schafe verwendet werden?

- Ja Nein

22. Werden die Rinder und die Schafe überwiegend von derselben Person betreut?

- Ja Nein

23. Wird dieselbe Arbeitskleidung für die Betreuung der Rinder und Schafe verwendet?

- Ja Nein

24. Wie beurteilen Sie den Kontakt zwischen den Rindern und Schafen in Bezug auf Häufigkeit und Intensivität?

25. Welche der folgenden Symptome sind im letzten Jahr aufgetreten?

(Mehrfachantworten möglich)

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Lämmerverluste
Anzahl: _____ | <input type="checkbox"/> Totgeburten |
| <input type="checkbox"/> Aborte | <input type="checkbox"/> Kleine, lebensschwache Lämmer |
| <input type="checkbox"/> Unfruchtbare Schafe | <input type="checkbox"/> Zitternde Lämmer |
| <input type="checkbox"/> Umbocken | <input type="checkbox"/> Missbildungen |
| <input type="checkbox"/> Keine der genannten Symptome sind aufgetreten | <input type="checkbox"/> Vliesveränderungen bei Neugeborenen |

26. a) Geben Sie Ihre Schafe zur Sömmerung?

- Ja Nein

Falls Sie Ihre Schafe zur Sömmerung geben:

25. b) Welche Tiere befinden sich auch auf der Sömmerung?

(Mehrfachantworten möglich)

- | | | |
|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> Fremde Schafe | <input type="checkbox"/> Fremde Rinder | <input type="checkbox"/> Eigene Rinder |
| <input type="checkbox"/> Fremde Ziegen | <input type="checkbox"/> Eigene Ziegen | |
| <input type="checkbox"/> Es befinden sich nur Tiere aus dem eigenen Betrieb auf der Sömmerung | | |

Betriebseigene Ziegen

26. Wie viele Ziegen halten Sie auf Ihrem Betrieb?

Aktuelle Anzahl Ziegen (total): _____, davon

Kitze: _____

Geissen: _____

Böcke: _____

27. Grund der Ziegenhaltung: (Mehrfachantworten möglich)

Milch Zucht Hobby Anderer: _____

28. Rassen:

Bitte geben Sie für jede Ziegenrasse die aktuelle Anzahl Tiere an:

<u>Rassen / Kreuzungen:</u>	<u>Anzahl:</u>
_____	_____
_____	_____
_____	_____

29. Ablammzeit:

Bitte geben Sie die (ungefähre) Ablammzeit Ihrer Ziegen an: _____

30. a) Werden Rinder und Ziegen im gleichen Stall (gleicher/offener Raum) gehalten?

Ja Nein

Falls ja:

30. b) Welche Ziegen befinden sich im gleichen Stall mit den Rindern?

ganze Herde einzelne Tiergruppe
 Einzeltiere (z.B. für Ablammung) andere (bitte beschreiben): _____

30. c) Haltungszeitpunkt und -dauer der Ziegen im gleichen Stall mit den Rindern:

Winter (bitte ungefähre Zeitspanne angeben): _____
 einzelne Tage (bitte beschreiben und Zeitpunkt angeben): _____
 anderes (bitte beschreiben): _____

30. d) Haltungsform der Ziegen im gleichen Stall mit den Rindern:

gemeinsame Aufstallung mit den Rindern separate Buchten/Paddocks

Falls separate Buchten/Paddocks:

30. e) Abtrennungsart zwischen den Buchten/Paddocks der Ziegen und der Rinder:
(Mehrfachantworten möglich)

- direkter Schnauzenkontakt zwischen Rindern und Ziegen möglich
- gleiche Futterquelle/Tränke der Rinder und Ziegen
- Abtrennung ohne möglichen direkten Kontakt zwischen Rinder und Ziegen

31. Gibt es Weidekontakt zwischen den Rindern und den Ziegen?

- gemeinsame Weidehaltung
- angrenzende Weide
- Nein

32. Werden dieselben Weideflächen von Rindern und Ziegen bestossen?

- Ja
- Nein

33. Gibt es Gerätschaften/Viehtransporter, die gemeinsam für Rinder und Ziegen verwendet werden?

- Ja
- Nein

34. Werden die Rinder und die Ziegen überwiegend von derselben Person betreut?

- Ja
- Nein

35. Wird dieselbe Arbeitskleidung für die Betreuung der Rinder und Ziegen verwendet?

- Ja
- Nein

36. Wie beurteilen Sie den Kontakt zwischen den Rindern und Ziegen in Bezug auf Häufigkeit und Intensivität?

37. a) Geben Sie Ihre Ziegen zur Sömmerung?

- Ja
- Nein

Falls Sie Ihre Ziegen zur Sömmerung geben:

37. b) Welche Tiere befinden sich auch auf der Sömmerung?

(Mehrfachantworten möglich)

- Fremde Ziegen
- Fremde Schafe
- Eigene Schafe
- Fremde Rinder
- Eigene Rinder
- Es befinden sich nur Tiere aus dem eigenen Betrieb auf der Sömmerung

Tierkontakte der Rinder mit nicht betriebseigenen Tieren

38. a) Geben Sie Ihre Rinder zur Sömmerung?

- Ja Nein

Falls ja:

38. b) Haben die Rinder während dieser Periode Kontakt zu kleinen Wiederkäuern aus anderen Herden? (Mehrfachantworten möglich)

- Ja, zu fremden Schafen Ja, zu fremden Ziegen Nein nicht bekannt

39. a) Gibt es Perioden, ausserhalb der Sömmerung, in denen Ihre Rinder mit fremden Herden gemeinsam weiden?

- Ja Nein

Falls ja:

39. b) Zu welchen Tieren haben die Rinder während dieser Periode Kontakt? (Mehrfachantworten möglich)

- zu fremden Rindern zu fremden Schafen zu fremden Ziegen

40. Gibt es (Weide-)Kontakt mit Tieren aus Nachbarbetrieben?

- Ja, mit Rindern Ja, mit Schafen Ja, mit Ziegen Nein

41. Wie oft fahren Sie normalerweise mit Ihren eigenen Rindern an Ausstellungen?

- mehrere Male pro Jahr 1x pro Jahr weniger als 1x pro Jahr Nie

42. Wie oft fahren Sie normalerweise mit Ihren eigenen Rindern an Viehmärkte?

- mehrere Male pro Jahr 1x pro Jahr weniger als 1x pro Jahr Nie

43. Wurde jemals Kontakt mit freilebenden Wildwiederkäuern beobachtet?

(Mehrfachantworten möglich)

- Ja, auf meinem Betrieb Ja, während der Sömmerung
 Wild wurde beobachtet, Kontakt jedoch unklar Nein

Falls ja, bitte Wildwiederkäuer-Art(en) angeben: _____

Zukäufe

44. Kaufen Sie fremde Rinder zu?

- Ja Nein

*Falls nein, fahren Sie weiter mit **Frage 48***

45. Wie viele Tiere kauften Sie (ungefähr) vom Befragungszeitpunkt ausgehend in den letzten 12 Monaten zu?

Kälber: _____ Rinder: _____ Kühe: _____ Stiere: _____

46. Woher stammen die zugekauften Tiere? (Mehrfachantworten möglich)

- Privatkauf Viehhändler öffentlicher Markt / Schau
- andernorts: _____

47. Aus welchem Land stammen die zugekauften Tiere?

(Mehrfachantworten möglich)

- Schweiz Ausland (bitte Herkunftsland nennen): _____

Zukauf von Schafen

48. Kaufen Sie fremde Schafe zu?

- Ja Nein

*Falls nein, fahren Sie weiter mit **Frage 52***

49. Wie viele Tiere kauften Sie (ungefähr) vom Befragungszeitpunkt ausgehend in den letzten 12 Monaten zu?

Lämmer: _____ Schafe: _____ Böcke: _____

50. Woher stammen die zugekauften Tiere? (Mehrfachantworten möglich)

- Privatkauf Viehhändler öffentlicher Markt / Schau
- andernorts: _____

51. Aus welchem Land stammen die zugekauften Tiere?

(Mehrfachantworten möglich)

- Schweiz Ausland (bitte Herkunftsland nennen): _____

Zukauf von Ziegen

52. Kaufen Sie fremde Ziegen zu?

- Ja Nein

*Falls nein, fahren Sie weiter mit **Teil B***

53. Wie viele Tiere kauften Sie (ungefähr) vom Befragungszeitpunkt ausgehend in den letzten 12 Monaten zu?

Kitze: _____ Geissen: _____ Böcke: _____

54. Woher stammen die zugekauften Tiere? (Mehrfachantworten möglich)

- Privatkauf Viehhändler öffentlicher Markt / Schau
 andernorts: _____

55. Aus welchem Land stammen die zugekauften Tiere?

(Mehrfachantworten möglich)

- Schweiz Ausland (bitte Herkunftsland nennen): _____

Teil B

- **Bei Fallbetrieben:** Bitte für jedes AK-positive Tier, jedoch maximal für 5 der AK-positiven Tiere folgende Fragen ausfüllen!
(Beim Vorhandensein von mehr als 5 AK-positiven Tiere ist die Auswahl der Tiere frei wählbar)
- **Bei Kontrollbetrieben:** Bitte für 5 AK-negative Tiere folgende Fragen ausfüllen!
(Beim Vorhandensein von mehr als 5 AK-negativen Tiere ist die Auswahl der Tiere frei wählbar)

Rind#1

1. Tier Identifikationsnummer: _____

2. Seit wann befindet sich das Tier auf dem Betrieb: _____

3. a) Herkunft:

Geburt im Betrieb Zukauf

Falls das Tier zugekauft wurde:

3. b) Wo wurde das Tier gekauft?

Privatkauf Viehhändler öffentlicher Markt / Schau

andernorts: _____

3. c) Aus welchem Land stammt das Tier?

Schweiz Ausland (Bitte Herkunftsland nennen): _____

Rind#2

1. Tier Identifikationsnummer: _____

2. Seit wann befindet sich das Tier auf dem Betrieb: _____

3. a) Herkunft:

Geburt im Betrieb Zukauf

Falls das Tier zugekauft wurde:

6. b) Wo wurde das Tier gekauft?

Privatkauf Viehhändler öffentlicher Markt / Schau

andernorts: _____

6. c) Aus welchem Land stammt das Tier?

Schweiz Ausland (Bitte Herkunftsland nennen): _____

Rind#3

7. Tier Identifikationsnummer: _____

8. Seit wann befindet sich das Tier auf dem Betrieb: _____

9. a) Herkunft:

Geburt im Betrieb Zukauf

Falls das Tier zugekauft wurde:

9. b) Wo wurde das Tier gekauft?

Privatkauf Viehhändler öffentlicher Markt / Schau

andernorts: _____

9. c) Aus welchem Land stammt das Tier?

Schweiz Ausland (Bitte Herkunftsland nennen): _____

Rind#4

10. Tier Identifikationsnummer:

11. Seit wann befindet sich das Tier auf dem Betrieb: _____

12. a) Herkunft:

Geburt im Betrieb Zukauf

Falls das Tier zugekauft wurde:

12. b) Wo wurde das Tier gekauft?

Privatkauf Viehhändler öffentlicher Markt / Schau

andernorts: _____

12. c) Aus welchem Land stammt das Tier?

Schweiz Ausland (Bitte Herkunftsland nennen): _____

Rind#5

13. Tier Identifikationsnummer: _____

14. Seit wann befindet sich das Tier auf dem Betrieb: _____

15. a) Herkunft:

Geburt im Betrieb Zukauf

Falls das Tier zugekauft wurde:

15. b) Wo wurde das Tier gekauft?

Privatkauf Viehhändler öffentlicher Markt / Schau

andernorts: _____

15. c) Aus welchem Land stammt das Tier?

Schweiz Ausland (Bitte Herkunftsland nennen): _____

Vielen Dank für Ihre Mithilfe!