

2. Literaturübersicht

2.1. Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV1)

2.1.1. Taxonomie

Das bovine Herpesvirus Typ 1 (BHV1) zählt zur Familie der Herpesviridae. Diese werden aufgrund ihrer molekularbiologischen Eigenschaften in drei Subfamilien, Alpha(α)-, Beta(β)-, und Gamma(γ)herpesviridae, unterteilt (**ROIZMAN, 1996**). Als Mitglied der Alphaherpesviridae gehört das BHV1 der Gattung Varicellovirus an. Es kann mittels monoklonaler Antikörper und mit Hilfe der Spaltmuster von Restriktionsendonukleasen in zwei Genotypen BHV1.1 und BHV1.2 unterteilt werden. Hinsichtlich ihrer Antigenstruktur sind die Subtypen BHV1.1. und BHV1.2. sehr ähnlich.

2.1.2. Morphologie, Genomstruktur und Eigenschaften

Alle Herpesviren besitzen eine ähnliche Struktur (**ROIZMAN, 1996**). Sie sind umhüllte, kubische Viren. Die Größe des BHV1-Virus beträgt 150 bis 200 nm (**ARMSTRONG; PEREIRA et al., 1961**).

Nach ihrer Genomorganisation können Herpesviren in 6 Gruppen (A bis F) eingeteilt werden, die sich durch Anzahl und Orientierung repetitiver DNA-Elemente unterscheiden (**ROIZMAN, 1996**). Das BHV1-Genom wird, wie auch die Genome von PRV, VZV, BHV-5, EHV-1, -3 und -4, der Gruppe D zugeordnet.

Das Viruspartikel ist eine komplexe Einheit, die sich aus vier unterscheidbaren Bestandteilen Core, Kapsid, Tegument und Envelope (Hülle) zusammensetzt (**FUCHS; GRANZOW et al., 2002**). Im Core liegt das virale Genom als doppelsträngige, lineare DNS, das vermutlich mit Protein assoziiert. Es enthält zu ca. 72 % die Basenpaarung von Guanin und Zytosin (**PLUMMER; GOODHEART et al., 1969; MAYFIELD; GOOD et al., 1983; WYLER; ENGELS et al., 1989**). Das etwa 136 Kilobasenpaare große BHV1-Genom beinhaltet zwei nicht repetitive Sequenzen, eine „unique long-segment (U_L)“- und eine „unique short-segment (U_S)“-Sequenz. Die U_S -Sequenz ist von einer "internal repeat (IR)"- und einer „terminal repeat (TR)"-Region umgeben.

Das Core wird von einem ikosaedrischen Kapsid aus 162 Struktureinheiten (Kapsomeren) umschlossen (**FUCHS; GRANZOW et al., 2002**). Beide zusammen bilden das so genannte Nukleokapsid. Die Tegumentschicht mit ihrer globulären Proteinstruktur stellt die Verbindung zwischen Kapsid und der äußeren Hüllmembran dar. Diese Hüllmembran ist in ihrem Aufbau eine Lipiddoppelmembran (**ARMSTRONG; PEREIRA et al., 1961**) und beinhaltet sowohl glykosylierte als auch nicht glykosylierte Proteine (**ROIZMAN; DESROSIERS et al., 1995**).

Das gesamte Genom kodiert für etwa 30 bis 40 Strukturproteine (**BEER; KÖNIG et al., 2003**). Bisher wurden bei den tierpathogenen Vertretern der Alpha-Herpesviren 12 Glykoproteine (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM und gN) identifiziert (**MODROW; FALKE et al., 2003**). Aufgrund ihrer Lokalisation auf der Virushülle sowie auf der Oberfläche infizierter Zellen haben Glykoproteine eine bedeutende Rolle im Infektionszyklus der Herpesviren sowie bei der Induktion einer Immunantwort. Unterschieden werden essentielle und nicht essentielle Glykoproteine. Essentiell sind die Glykoproteine, ohne die eine Vermehrung des Virus nicht möglich ist. Während beispielsweise die primäre Interaktion des essentiellen viralen Hüllglykoproteins gC mit Heparansulfat auf der Zelloberfläche und die nachfolgende Bindung von viralem gD an spezifische Wirtszellrezeptoren gut untersucht sind, ist der Fusionsprozess zwischen Virushülle und Plasmamembran bisher noch wenig verstanden (**ALTENSCHMIDT; FUCHS et al., 2002**). Bekannt ist, dass die Glykoproteine gB, gD, gH und gL essentiell daran sowie an der Penetration beteiligt sind (**METTENLEITER; LUKAS et al., 1985; METTENLEITER; ZSAK et al., 1987; MODROW; FALKE et al., 2003**).

Nicht essentielle Glykoproteine, wie gE, gI und gM, gegen die im infizierten Organismus Antikörper gebildet werden, die aber für die Vermehrungsfähigkeit des Virus nicht benötigt werden, bildeten die Grundlage für die Entwicklung „markierter Vakzinen“ (**METTENLEITER; LUKAS et al., 1985; METTENLEITER; ZSAK et al., 1987**). Bezüglich gE konnte gezeigt werden, dass es eine entscheidende Rolle in der Zell-zu-Zell-Ausbreitung des BHV1 spielt (**TYBOROWSKA; BIENKOWSKA-SZEWCZYK et al., 2000**) und darüber hinaus wahrscheinlich am axonalen Transport der Herpesviren bei der Infektion bzw. Virusreaktivierung beteiligt ist (**HUSAK; KUO et al., 2000**). Seine Deletion führt zur Attenuierung von viralem BHV1 (**CHOWDHURY; ROSS et al., 1999**).

BHV1-gE bildet einen Komplex mit dem Glykoprotein I (**YOSHITAKE; XUAN et al., 1997**) und interagiert vermutlich auch mit gM und dem Tegumentprotein UL49 (**FUCHS; KLUPP et al., 2002**). Ebenso wie dem gE konnte dem UL49-Genprodukt von BHV1 eine entscheidende Rolle für die effiziente Ausbreitung von Zelle zu Zelle zugeschrieben werden (**BEER; KALTHOFF et al., 2005**).

Im Unterschied zu den Glykoproteinen B und D gehört gE nicht zu den Hauptimmunogenen des BHV1 (**BABIUK; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1996**). Die Stärke der humoralen Immunantwort gegen gE ist im Vergleich zu den Hauptimmunogenen deutlich geringer und setzt erst später ein (**BEER; KÖNIG et al., 2003**). Werden Rinder mit BHV1-gE-Markervakzinen geimpft, werden keine gE-spezifischen Antikörper gebildet (**VAN OIRSCHOT; KAASHOEK et al., 1997a**). Da bei Feldvirusinfektionen meist ein kompletter Satz von Antikörpern gebildet wird, deutet das Fehlen von gE-spezifischen Antikörpern dann auf eine vom Impfvirus hervorgerufene Immunantwort hin. Ausnahmen können zu einem geringen Prozentsatz insbesondere bei markergeimpften Tieren auftreten, indem keine

BHV1-gE-Antikörper nach erfolgter BHV1-Infektion nachweisbar sind. Die Immunantwort des Wirtstieres setzt somit der Leistungsfähigkeit der gE-Testsysteme Grenzen, die durch besonders hochwertige und geprüfte Diagnostika ausgeglichen werden müssen (**BEER; KÖNIG et al., 2003**).

Herpesviren sind gegen Chloroform- und Etherbehandlung, sauren pH-Wert (pH 3) und gegen Hitzeaktivierung (+56 °C, 30 Min.) labil (**ROLLE und MAYR, 2002**).

2.1.3. Klinische Symptome

Die BHV1-Infektion ist eine überwiegend akut, in Beständen mit hoher Prävalenz überwiegend latent verlaufende, hochkontagiöse virusbedingte Allgemeinerkrankung des Rindes und anderer Boviden. Nach dem Eintritt des Virus in den Respirations- bzw. Genitaltrakt vermehrt es sich dort in den Epithelzellen der Schleimhäute. In einer zeitlich begrenzten Virämie, noch vor dem Auftreten von spezifischen Antikörpern im Serum, kann der Erreger andere Gewebe und Organe infizieren (**PASTORET; THIRY et al., 1982; PASTORET; THIRY et al., 1984**). Die Zeitspanne der nachweisbaren Virämie bei experimenteller Infektion mit dem 2. bis 12. Tag p. i. wurde durch mehrere Forschungsteams bestätigt (**CASTRUCCI; FERRARI et al., 1992; KAASHOEK; STRAVER et al., 1996; KÖNIG; BEER et al., 2003**). Die durch die BHV1-Infektion bedingten Enteritiden und Aborte führten **ENGELS und ACKERMANN (1996)** auf die systemische Verbreitung der Infektion zurück. Sie stellten den Weg des Virus, ausgehend von den Mucosazellen über Axonen der lokalen Nervenzellen bis hin über den intra-axonalen Transport zu den regionalen Ganglien dar. Die Inkubationszeit liegt bei allen Verlaufsformen etwa zwischen 2 und 6 Tagen.

Die überwiegend respiratorische Manifestation wird als Infektiöse Bovine Rhinotracheitis (IBR) bezeichnet. Sie geht in ihrer akuten Form mit Fieber bis zu 42 °C, serösem Nasenausfluss, einer Hyperämie der Schleimhäute von Flotzmaul und Nase sowie mit Speicheln einher. Bereits zu Beginn der Erkrankung sinkt die Milchleistung der laktierenden Tiere. Später treten Husten und Augenausfluss auf. Vereinzelt sind auf der Nasenschleimhaut stecknadelkopfgroße, pustelartige Erhebungen zu beobachten. Die Krankheitsdauer beträgt 10 bis 14 Tage. Trächtige Kühe können vor allem im 5. bis 8. Trächtigkeitsmonat nach einer Inkubationszeit von 3 bis 6 Wochen abortieren (**KRETZSCHMAR; KOKLES et al., 1977; BARTHA, 1987; WYLER; ENGELS et al., 1989; STRAUB, 1990; LIEBERMANN, 1992**). Nicht selten verläuft die Infektion jedoch bei einzelnen Tieren oder in ganzen Herden klinisch inapparent. Die Erkrankungen des Respirationstraktes werden oft durch die BHV1.1-Stämme verursacht, während die genitale Verlaufsform vielfach durch BHV1.2-Stämme bedingt ist. Dennoch können beide Genotypen in beiden Körperregionen auftreten (**WHETSTONE und MILLER, 1989; KAASHOEK; STRAVER et al., 1996**). Jedoch tritt die respiratorische Manifestation

selten gemeinsam mit der genitalen Form auf (**MISRA; BABIUK et al., 1983**).

Die genitale Form der Infektion zeigt sich als Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis (IPV) beim weiblichen Tier und als Infektiöse Balanoposthitis (IBP) beim Bullen. Die Inkubationszeit beträgt 1 bis 3 Tage. Die Infektion geht oft mit leichtem Fieber, Rötung und Schwellung der Schleimhaut der äußeren Genitalien, Unruhe und schmerzhaftem Harndrang einher. Auf der Genitalschleimhaut bilden sich stecknadelkopf- bis kirschkerngroße, bläschenartige, grauweiße Erhebungen mit gerötetem Hof, die sich zu Pusteln, kruppösen Veränderungen und ulzerativen Erosionen weiterentwickeln können. Das akute Stadium dauert 2 bis 4 Tage, die Läsionen sind etwa 10 bis 14 Tage nach Beginn der Erkrankung abgeheilt (**WYLER; ENGELS et al., 1989**). Aborte im letzten Drittel der Trächtigkeit, 5. bis 8. Monat (**MAYR; EIBNER et al., 1984**), sind laut **KRETZSCHMAR, KOKLES et al. (1977)** bei der IPV seltener als bei der IBR.

Die neurologische Form, die gelegentlich bei BHV1-infizierten Kälbern auftreten kann, ist durch Muskeltremor, Ataxie und Erblindung charakterisiert. Neben dieser seltenen Manifestation fällt bei Kälbern die IBR in der Regel als fieberhafte Allgemeinerkrankung mit vorwiegend respiratorischen Symptomen auf. Bakteriell bedingte Pneumonien sind die häufigsten Sekundärinfektionen. Zusätzlich wurde Durchfall als klinisches Symptom einer generalisierten BHV1-Infektion beobachtet (**WYLER; ENGELS et al., 1989**).

Wie alle Herpesviren kann auch BHV1 zu latenten Infektionen in den lokalen sensorischen Ganglien führen (**VAN ENGELENBURG; KAASHOEK et al., 1995; VAN ENGELENBURG; VAN SCHIE et al., 1995**). Einmal infizierte Tiere müssen daher als lebenslang infiziert angesehen werden. Nach Reaktivierung der Infektion, die klinisch inapparent sein kann, kommt es zur Virusausscheidung (**ENGELS und ACKERMANN, 1996**) und potenziell zur Übertragung auf andere Tiere. Auch geimpfte Tiere können, ohne zu erkranken, Wildtypvirus aufnehmen und Virusträger werden (**BOSCH; KAASHOEK et al., 1997**).

Die Virusausscheidung erfolgt hauptsächlich mit den Sekreten der Schleimhäute des Genitaltraktes (IPR/IBP), des Respirationstraktes und der Konjunktiven (IBR), aber auch mit Kot und Sperma. Die Ausscheidung über den Respirationstrakt dauert selten länger als 14 Tage, vaginal bis zu 14 Tagen und beim Bullen bis zu 4 Wochen. In der Rekonvaleszenzphase befindliche Tiere können das Virus diskontinuierlich ausscheiden (**ROLLE und MAYR, 2002**).

Die Reaktivierung latenter Infektionen kann durch Immunsuppression (z. B. durch Behandlung mit Glukokortikoiden oder besondere Belastungen, wie Geburtsstress) provoziert werden (**MADIC; MAGDALENA et al., 1995; HAGE; GLAS et al., 1998; STRAUB, 2001**). Auftreten und Verlauf der Krankheit werden durch Umweltfaktoren beeinflusst, unter denen hygienische Mängel an erster Stelle stehen (**ROSENBERGER, 1994**).

2.1.4. Immunologie

Die Abwehr einer primären BHV1-Infektion induziert zunächst eine angeborene und eine sich anschließende erworbene humorale und zelluläre Immunantwort (**DENIS; HANON et al., 1994**).

Die angeborene Immunitätsreaktion, die innerhalb der ersten 5 Stunden nach der Infektion eintritt, wirkt kurz (**MAYR, 1988**). Innerhalb der ersten 5 Stunden nach der Primärinfektion werden Interferon alpha und beta sowie andere Zytokine gebildet. Diese haben teilweise selbst eine antivirale Wirkung (Interferon alpha und beta) und aktivieren Entzündungszellen, wie Makrophagen, polymorphkernige neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (**VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; VAN DONKERSGOED et al., 1994; JENSEN und SCHULTZ, 1990**). Bedingt durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität wandern diese aktivierten Entzündungszellen an den Ort der Infektion (**BIELEFELDT OHMANN; BABIUK et al., 1991; BABIUK; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1996**).

Für die Immunität gegen Herpesviren ordnete **STRAUB (1980)** neben den virusneutralisierenden Antikörpern den T-Lymphozyten eine besondere Bedeutung in der zellvermittelten Immunität zu. Ebenso vermuteten **LUDWIG und GREGERSEN (1986)**, dass die zelluläre Immunität die wichtigere Bedeutung im Infektionsablauf einnimmt. Zu dieser Thematik konnten Untersuchungen zur Verbreitung der Herpesviren zwischen den Zellen belegen, dass diese Interzellularbrücken unter Meidung der Extrazellulärräume nutzen und sich damit dem Antikörperkontakt entziehen (**CHRISTIAN; LUDOVICI et al., 1971; KENDRICK; SCHNEIDER et al., 1971**). Ergänzende Arbeiten von **ROUSE und BABIUK (1974)** dokumentieren, dass spezifische Lymphozyten bereits am 5. Tag nach der Infektion und Antikörper erst am 7. Tag im Plasma auftraten.

Im Anschluss an die angeborene Abwehr erfolgt eine erregerspezifische, lang andauernde zelluläre und humorale Immunität (**WAGNER; BECKER et al., 1982**). Diese basiert auf neutralisierenden und komplementbildenden Antikörpern, wie sie im Ergebnis einer Infektion oder Schutzimpfung gebildet werden (**MAYR; EIBNER et al., 1984**). Die von Plasmazellen sezernierten Antikörper sind in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachweisbar. Der Zeitraum der Nachweisbarkeit und die Titerhöhe der Antikörper sind abhängig vom Ort der Infektion (**RÜSCH; ENGELS et al., 1981**). Die Antikörperbildung wird bei der respiratorischen Manifestation stärker stimuliert als bei der genitalen Verlaufsform (**STRAUB, 1964; STRAUB; SCHMIDT et al., 1982; MAYER; EIBNER et al., 1984**). Mit dem ersten Antigenkontakt werden nicht nur Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen gebildet, sondern auch erworbene Gedächtniszellen, so genannte Memoryzellen. Sie reagieren bei einem erneuten Antigenkontakt mit einer raschen Sekundärantwort.

Aufgrund ihrer Lokalisation auf der Virushülle sowie auf der Oberfläche infizierter Zellen haben Glykoproteine eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort. Sie bewirken, dass freies

Virus neutralisiert wird sowie infizierte Zellen zerstört werden (**LUDWIG und GREGERSEN, 1986; SCHWYZER und ACKERMANN, 1996**). Im Unterschied zur Primärinfektion, in der Antikörper gegen die Glykoproteine gB, gC und gD gebildet werden, erfolgt bei einer Reaktivierung der BHV1-Infektion eine Antikörperbildung auch gegen die Minorproteine, wie zum Beispiel gE (**LEMAIRE; MEYER et al., 1995; TIKOO; CAMPOS et al., 1995**).

Die zellvermittelte Immunantwort beginnt ab den 5. Tag p. i. und erreicht ihre höchste Intensität ungefähr nach 7 bis 10 Tagen. Sie steht in Zusammenhang mit der klinischen Genesung der Tiere (**WYLER; ENGELS et al., 1989; BABIUK; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1996; ENGELS und ACKERMANN, 1996**).

Für die humorale Infektabwehr einer BHV1-Primärinfektion sind besonders die drei Immunglobulinklassen M (IgM), G (IgG), A (IgA) innerhalb ihres zeitlich gestaffelten Auftretens von Bedeutung.

Nach etwa 9 bis 13 Tagen p. i. treten BHV1-spezifische Antikörper des IgM-Isotyps im Serum sowie in nasalen und okulären Sekreten auf und persistieren bis zu 4 Wochen. Als erste in Erscheinung tretende Immunglobulinklasse besitzen sie eine geringe Avidität und sind nicht so spezifisch wie gG.

Unmittelbar nach der Bildung der IgM-Antikörper sind am 12. Tag p. i. die Antikörper des Isotyps IgA im Serum nachweisbar (**VAN OIRSCHOT, 1995a**). Diese persistieren in den Sekreten der Mucosa auch nach Absinken des Serumtiters (**MADIC; MAGDALENA et al., 1995**). Obwohl sie in geringer Konzentration im Serum vorliegen, haben sie ihre Bedeutung als sekretorisches IgA in den Sekreten der Schleimhäute, die Kontaktflächen und Eintrittspforten für den BHV1-Erreger darstellen. IgA zeichnet sich besonders durch seine virusneutralisierende Funktion aus (**MAYER; EIBNER et al., 1984**).

Ab dem 13. Tag p. i. schließt sich die humorale Immunantwort durch Antikörper des Isotyps IgG an (**MADIC; MAGDALENA et al., 1995; BRADSHAW und EDWARDS, 1996**). In differenzierten Untersuchungen wurde IgG1 ab den 13. Tag und IgG2 ab dem 20. Tag p. i. nachgewiesen. Die Persistenz der Antikörper konnte im ELISA noch nach drei Jahren bestätigt werden (**WYLER; ENGELS et al., 1989; MADIC; MAGDALENA et al., 1995**).

Antikörper gegen gE, die in der Infektionsabwehr nur eine untergeordnete Rolle spielen, erscheinen ab den 11. bis 14. Tag p. i. im Serum (**KAASHOEK; RIJSEWIJK et al., 1995; VAN OIRSCHOT; KAASHOEK et al., 1997**). Ein nachweisbarer Antikörperspiegel gegen gB und gE ist im Serum mindestens 2 bis 3 Jahre p. i. vorhanden (**VAN OIRSCHOT; KAASHOEK et al., 1996b; VAN OIRSCHOT; KAASHOEK et al., 1997; KAASHOEK; RIJSEWIJK et al., 1998**). Obwohl natürliche BHV1-Infektionen lang anhaltende spezifische Antikörpertiter hervorrufen (**KAASHOEK; RIJSEWIJK et al., 1996**), können manche Tiere sehr niedrige Antikörperspiegel gegen das Glycoprotein gB und gE besitzen (**LEMAIRE; MEYER et al., 1995; VAN DER POEL; KRAMPS et al., 1995, HAGE; GLAS et al., 1998**).

Neugeborene Kälber erlangen ihre passive Immunität in der Regel über maternale Antikörper des muttereigenen Kolostrums (**BOSCH; VAN LIESHOUT et al., 2000**). Kolostrale Antikörper persistieren je nach Antikörperstatus des Muttertiers bis zum Alter von 4 Monaten (**ROLLE und MAYR, 2002**) bzw. 7 Monaten (**BRADSHAW und EDWARDS, 1996**). Einerseits sind die Kälber während dieses Zeitraumes vor Erkrankung geschützt (**MECHOR; ROUSSEAU et al., 1987; BRADSHAW und EDWARDS, 1996**), andererseits kann eine lokale Schleimhautinfektion mit nachfolgender Latenz des Virus nicht ausgeschlossen werden, da die für den Schutz in Schleimhäuten benötigten IgA-Antikörper noch nicht ausgebildet sind. Virusausscheidung und die Ausbildung einer latenten Infektion können somit nicht generell ausgeschlossen werden (**LEMAIRE; MEYER et al. 1995; BRADSHAW und EDWARDS, 1996; LEMAIER; SCHYNTS et al., 1999**).

Des Weiteren sind bei Kälbern mit maternalem Immunschutz differenzierte Reaktionslagen bei Kontakt mit BHV1-Feldvirus oder intramuskulär appliziertem Lebendimpfstoff zu verzeichnen. Entweder kommt es zu einem kontinuierlichen Titerabfall der maternalen Antikörper bis zum 7. Lebensmonat, wie er auch gewöhnlich zu beobachten ist, oder es wird durch den Erregerkontakt eine sprunghafte Verringerung der Antikörpermenge provoziert. Die Abnahme des maternalen Antikörperspiegels kann bedingt durch eine primäre BHV1-Infektion nach etwa 3 Monaten post partum zu einer Seronegativität bei gleichzeitiger latenter BHV1-Infektion führen. Somit können serologisch negative Tiere fälschlicherweise als BHV1-negativ eingestuft werden (**LEMAIRE; MEYER et al., 1995; BRADSHAW und EDWARDS, 1996**).

Eine weitere Reaktionsmöglichkeit ergibt sich bei Kälbern unter Einfluss einer BHV1-Infektion, wenn die passive Immunität auf maternalen Antikörpern beruht, die durch einen BHV1-gE negativen inaktivierten Impfstoff induziert wurde. In diesem Fall stellten **LEMAIRE; SCHYNTS et al. (1999)** einen verzögerten Antikörperanstieg auch gegen das Glykoprotein gE des Feldvirus sowie die Stimulierung der zellulären Immunität, also eine aktive Immunantwort fest. Diese Ergebnisse werden mit der geringen Potenz des maternalen Schutzes (in Entwicklung begriffene Immunitätsausbildung der Kolostrumspender nach zwei- bis dreimaligem Einsatz der BHV1-gE-negativen inaktivierten Markerimpfstoffe) in Zusammenhang gebracht.

Kälber, die ohne maternale Antikörper geboren wurden, reagieren auf eine BHV1-Infektion mit einer humoralen und zellulären Immunantwort, wobei die Antikörper auf hohem Niveau über einen langen Zeitraum nachweisbar bleiben (**BRADSHAW und EDWARDS, 1996**).

Da die Infektion mit BHV1 an der Oberfläche der Mucosa stattfindet, könnte die Ausbildung einer lokalen Immunität der Mucosa wichtig zur Vorbeugung der Virusinfektion sowie zur Reduzierung der Virusausscheidung nach Reaktivierung sein (**ISRAEL; HERBER et al., 1992; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; TIKOO et al., 1993; BABIUK; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1996**).

Impfstoffe sollten die Bildung virusneutralisierender Antikörper gegen die Glykoproteine der Virushülle induzieren (**VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; TIKOO et al., 1993; BABIUK; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK et al., 1996; ENGELS und ACKERMANN, 1996**). Eine Impfung kann jedoch die Ausbildung der Latenz sowie eine, wenn auch reduzierte, Virusausscheidung nach Feldvirusinfektion nicht generell verhindern (**NETTLETON und SHARP, 1980; NETTLETON; SHARP et al., 1984, PASTORET; THIRY et al., 1984; ACKERMANN; METZLER et al., 1986; LEMAIRE; MEYER et al., 1995**).

2.1.5. Diagnostik der BHV1-Infektion

Eine Infektion mit Bovinem Herpesvirus Typ 1 liegt gemäß BHV1-Verordnung, Abschnitt 1, § 1 vor, wenn die Infektion durch virologische Untersuchungen oder klinische und serologische Untersuchungen festgestellt worden ist. Diagnostische Indikationen sind beim Auftreten klinischer Erkrankungen und Aborte, bei der Bestandssanierung, beim Verbringen von Rindern in Bestände mit BHV1-freien Tieren und beispielsweise bei An- und Verkaufsuntersuchungen gegeben. Die BHV1-Diagnostik basiert auf zwei Säulen, der direkten Virusisolierung und/oder dem spezifischen Antikörpernachweis gegen das Virus. Zusätzlich kann mit dem Intrakutantest die zellvermittelte Immunität nachgewiesen werden. In der folgenden Übersicht sind die entwickelten Diagnostikverfahren zusammengefasst:

Direkte Erregernachweismethoden:

- Isolierung und Anzucht mit cytopathischem Effekt (cpE)
(GIBBS and RWEYEMAMU, 1977)
- Neutralisation durch ein bekanntes BHV1-Antiserum im ELISA
(COLLINS; BULLA et al., 1985; COLLINS; BUTCHER et al., 1985)
- indirekte Immunfluoreszenz
(NETTLETON; HERRING et al., 1983)
- direkte Immunfluoreszenz
(EDWARDS; WHITE et al., 1988; SLIM und ELAZHARY, 1983; TERPSTRA, 1979)
- Immunperoxidasetechnik
(SMITH; COLLINS et al., 1987)
- Polymerasekettenreaktion (PCR)
(SAIKI; SCHARF et al., 1985; BITTER-SUERMAN, 1993; VILCEK; NETTLETON et al., 1994; MOOR ; GUNN et al., 2000)

Indirekte Nachweismethoden:

- Komplementbindungsreaktion
(**ROSSI und KIESEL, 1974; FAYE; CHAPTON et al., 1975; SWANEPOEL; BLACKBURN et al., 1976; BERRÌOS; CELEDON et al., 1983**)
- indirekter Hämagglutinationstest
(**WHITMAN und HETRICK, 1965; TÖRNER, 1974; KIRBY; MARTIN et al., 1974; DANNACHER; PERRIN et al., 1979; SOLSONA; PERRIN et al., 1980; TOGAWA; KIRISAWA et al., 1987**)
- Immundiffusionstest
(**ESTELA ,1967; STRAUB, 1986a; SPIECK und WOERNLE, 1986**)
- Radioimmunoassay
(**DÖLLER und JACUBIK, 1980; STRAUB, 1985**)
- Virusneutralisationstest (VNT)
(**STRAUB und WIZIGMANN, 1968; BITSCH, 1970, 1978a, b; ENGVALL und PERLMANN, 1971; BOMMELI; KIHM et al., 1980; MAYR, 1983; ROLLE und MAYR, 2002**)
- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
(**PAYMENT; ASSAF et al., 1979; BOMMELI; KIHM et al., 1980; HERRING; NETTLETON et al., 1980; SCHILOW; KOKLES et al., 1985; CHO und BOHAC, 1985**)
- Intrakutantest
(**STRAUB, 1986b; MAYR, 1988; STRAUB; BENGELSDORFF et al., 1990**)

Der direkte Erregernachweis erfolgt im Anschluss an die klinische Untersuchung durch Verfahren mittels Anzucht des Erregers in der Zellkultur mit anschließender Identifizierung, zum Beispiel durch Neutralisation des Virus mit einem spezifischen Antiserum, mittels IFT oder Nachweis von Virusgenom mit Hilfe der PCR. Die Virusvermehrung kann über Züchtung in Zellkulturen von fötalen Kälberlungen oder in bovinen Zelllinien praktiziert werden und ist gekennzeichnet durch einen begleitenden cytopathischen Effekt (cpE) sowie einer Riesenzellbildung. Diese Nachweismethode, angewendet auf den Erreger der IBR, wurde erstmalig von **MADIN; YORK et al. (1956)** beschrieben. Entsprechend der Organmanifestation des BHV1-Virus kann seine Isolierung aus Sekreten der Nase, der Konjunktiven, der Vaginal- oder Präputialschleimhaut, aus Sperma oder Organen von Abortföten sowie aus Spül- oder Tupferproben erfolgen (**WAGNER; BECKER et al., 1982**). Dennoch müssen bei der Virusisolierung, die als einfache und zuverlässige Labormethode gilt, stets die Viruseigenschaften berücksichtigt werden. In diesem Zusammenhang belegte **STRAUB (1987)**, dass der Virusnachweis einer BHV1-Infektion bis zum 16. Tag p. i. zeitlich begrenzt ist.

Während der intermittierend verlaufenden Virusausscheidung (**KOKLES, 1971**) zeigen die Reagenten oftmals keine äußeren Krankheitssymptome (**STRAUB, 1985**). Klinisch inapparent infizierte Tiere bilden somit ein unerkanntes Ansteckungspotential für den gesamten Bestand (**MAYR; EIBNER et al., 1984; THIELSCHER und HUTH, 1986**). Dieser Thematik widmeten sich **PROBST; WYLER et al. (1985)** und belegten in ihren Untersuchungen, dass der BHV1-Erreger während der latenten Phasen nicht nachweisbar ist. Daher ist der direkte Virusnachweis aus praktischen Belangen im Rahmen einer Bestandsuntersuchung als alleiniges diagnostisches Verfahren nicht geeignet (**FORSCHNER, 1988**).

Zum Nachweis klinisch inapparenter Infektionen haben sich die Bestimmung von N-AK im VNT und bestimmte ELISA bewährt. Im indirekten Erregernachweis werden Antikörper je nach Impfstatus wahlweise mittels gB-ELISA oder gE-ELISA nachgewiesen. Insbesondere bei Bestands- und Massenuntersuchungen eignen sich ELISA-Verfahren (Screening-Test). Darüber hinaus werden Kontrolluntersuchungen an gepoolten Tankmilchproben ebenfalls im ELISA durchgeführt. Für Einzeltieruntersuchungen ist jedoch der VNT zu fordern (**FREY, 2003**).

Der Einsatz der jeweiligen Untersuchungsmethoden ist abhängig von dem zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterial, das entsprechend dem Untersuchungsziel gewonnen und ausgewertet wird.

Für den direkten Erregernachweis sind Nasen- und Genitaltupfer, zusätzlich Abortmaterial oder Organmaterial aus Lunge, Gehirn, Ganglien oder Tonsillen (Menge: ca. 0,5 bis 1,0 cm³) bei verendeten bzw. geschlachteten Tieren sowie Spermaproben verwendbar. Bei Beprobungen von Frischsperma oder abgefüllten Proben in Verdünnerlösung ist im Sinne der Qualitätsstandards die Lagerung bei -20 °C bzw. bei optimaler Gefriertemperatur bei -80 °C einzuhalten. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen führt zur drastischen Senkung des Virustiters und wirkt sich damit nachteilig auf die Nachweisbarkeit des Virus in der Zellkultur aus.

Für den Antikörpernachweis können Plasma oder Serum in einer Mindestmenge von 0,5 ml verwendet werden. Bei laktierenden Tieren bietet sich die Möglichkeit der Diagnostik mittels Einzel- oder Sammelmilchproben an (je Poolprobe bis maximal 50 Milchproben von 50 Tieren). Dabei ist zu berücksichtigen, dass für ein Nativmilchverfahren eine Menge von 500 µl und für ein Konzentrierungsverfahren mindestens 50 µl vorgeschrieben sind. Allerdings lassen sich nicht alle Testverfahren mit Milchproben durchführen.

Zu beachten ist, dass schon die Verschleppung von geringsten Probenmengen (z. B. Serumreste in der Kanüle oder einer ausgespülten Spritze, Milchreste im Melkzeug oder Sammelbehältern) zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Ergänzend zu einer gewissen Sorgfalt und Hygiene bei der Probengewinnung, Aufbereitung, Lagerung ist eine eindeutige Dokumentation der Proben sowie deren Probenbegleitlisten unabdingbar.

2.2. Epidemiologie und Risikofaktoren der BHV1-Infektion

2.2.1. Epidemiologie

BHV1 ist weltweit verbreitet. Auf allen Kontinenten werden Antikörper gegen BHV1 bei Rindern und zahlreichen Wildtierarten nachgewiesen (**STRAUB, 2001**). Je nach Land und Sanierungsintensität ist der Durchseuchungsgrad unterschiedlich und beträgt bis zu 1/3 aller Rinder (**ROLLE und MAYR, 2002**). Die folgende Übersicht beinhaltet die Staaten mit gemeldeter BHV1-Problematik (**OIE, 2006**):

Europa: (von 52 Ländern 15 gemeldet)

Weißrussland, Tschechische Republik, Estland, Frankreich, Deutschland, Litauen, Luxemburg, Polen, Portugal, Slowakei, Spanien, Bosnien-Herzegowina, Großbritannien, Irland, Serbien

Amerika: (von 51 Ländern 17 gemeldet)

Argentinien, Bolivien, Kanada, Chile, Kolumbien, Costa Rica, Kuba, Dominikanische Republik, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nikaragua, Paraguay, Vereinigte Staaten von Amerika, Uruguay, Mexiko, Panama

Afrika: (von 57 Ländern 5 gemeldet)

Botswana, Südafrika, Angola, Marokko, Namibia

Asien: (von 56 Ländern 4 gemeldet)

Bhutan, Iran, Israel, Japan

Ozeanien: (von 29 Ländern 3 gemeldet)

Australien, Neukaledonien, Neuseeland

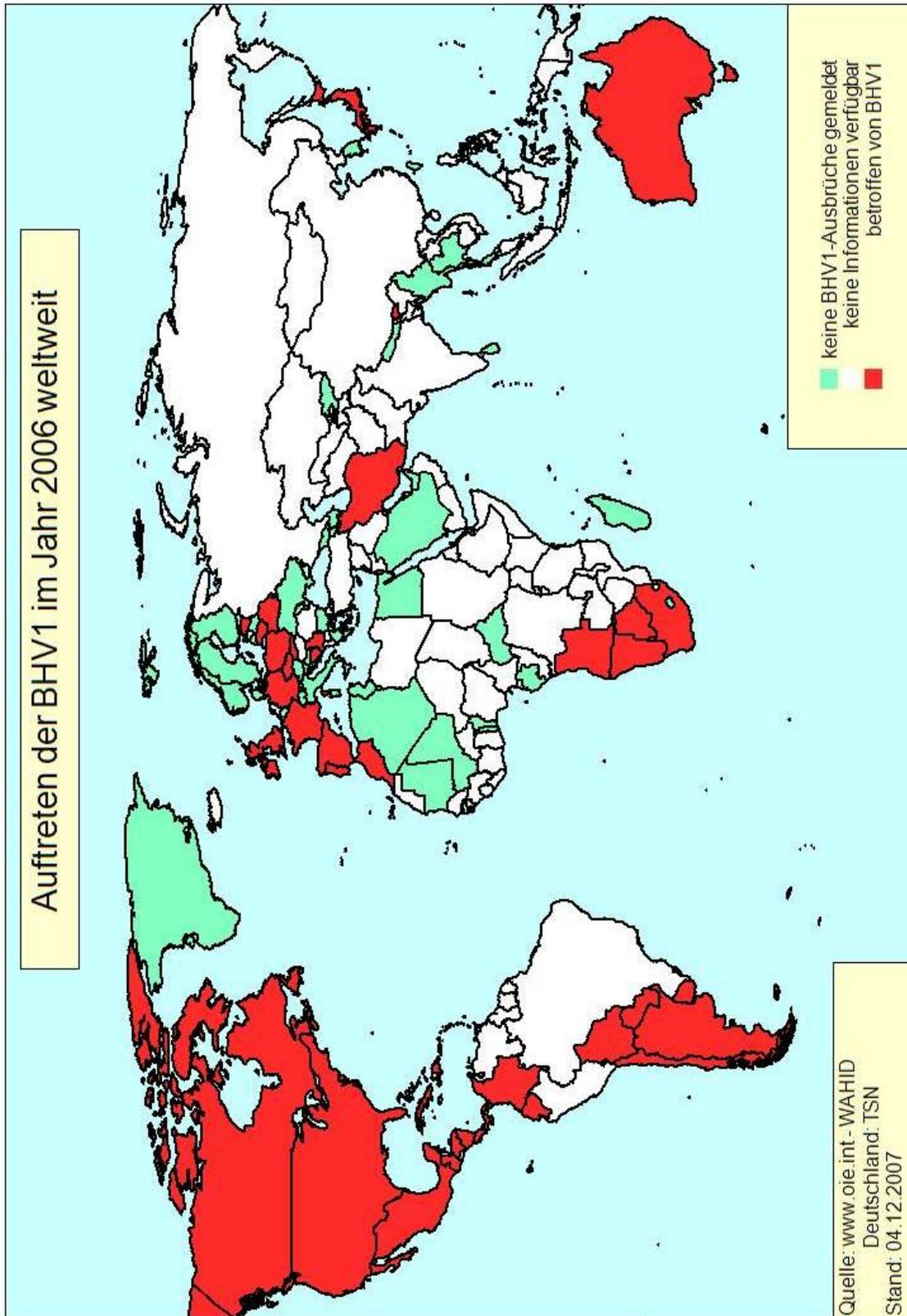


Abbildung 1: Übersicht zur weltweiten Verbreitung der BHV1-Infektion im Jahr 2006

Unabhängig vom Alter, dem Geschlecht und der Nutzungsrichtung kann jedes Rind für den BHV1-Erreger empfänglich sein (**STRAUB, 1990**). Die Übertragung des BHV1-Erregers zwischen infizierten und empfänglichen Tieren ist sowohl über oronasal als auch über genital sezerniertes Virus möglich.

So können Infektionen über direkte und indirekte Tierkontakte sowie über die Aufnahme BHV1-kontaminierten Wassers und solcher Futtermittel verbreitet werden. Mit der Versendung BHV1-kontaminierten Spermas ist eine weitere Verbreitung über große Distanzen möglich (**VAN OIRSCHOT, 1995b; ROLLE und MAYR, 2002**).

Des Weiteren kann der Erreger über belebte und unbelebte Vektoren verschleppt werden. Auch eine vertikale Übertragung ist möglich. Das BHV1-Virus kann die Plazentaschranke passieren und den Fötus infizieren. Als Folgeerscheinung können Aborte auftreten, auch durch die Infektion uteriner Zellen oder der Plazenta mit BHV-1 (**KENDRICK; SCHNEIDER et al., 1971**). Jedoch scheint die intakte Zona pellucida die Infektion von Eizellen und jungen Embryos zu verhindern (**TSUBOI und IMADA, 1997**). Die aerogene Verbreitung von BHV-1 ist möglich, soll aber in den meisten Fällen auf wenige Meter begrenzt sein (**MARS; DE JONG et al., 2000**). Das BHV1-Virus konnte auch aus Milch bzw. Fäzes von feld- bzw. experimentell infizierten Rindern isoliert werden (**WELLEMANS; LEUNEN et al., 1974**). **PROBST; WYLER et al. (1985)** wiesen die Serokonversion bei Kälbern nach, die mit Milch von Muttertieren getränkt wurden und eine Reaktivierung von BHV1-Virus zeigten, jedoch ist dieser Übertragungsweg nicht als bedeutende Verbreitungsrouten im Feld zu betrachten (**STRAUB, 2001**).

BHV1-Infektionen wurden auch bei anderen domestizierten Spezies, wie Schweinen, Schafen und Ziegen, beschrieben. Unter der Besonderheit, dass latent infizierte Schafe, im Vergleich zu Ziegen, diesen Erreger auch reaktivieren können, stellen beide Spezies keine Gefahr für die Erregerübertragung auf Rinder dar (**ENGELS; PALATINI et al., 1992; HAGE; VELLEMA et al., 1997**).

Gleiches kann für Wildschweine und Wildwiederkäuer ausgesagt werden. Obwohl BHV1-Antikörper bei Rot-, Reh- und Damwild (**KOKLES; DEDEK et al., 1988; KOKLES, 1977**) und bei Wildschweinen (**HASLER und ENGELS, 1986; DEDEK; KOKLES et al., 1991**) unter anderem in Deutschland bzw. in der Schweiz nachgewiesen wurden, scheinen diese Wildtierarten in der Epidemiologie der BHV-1 keine Rolle zu spielen (**DEDEK; KOKLES et al., 1991**). Auch **MOLLEMA; RIJSEWIJK et al. (2005)** und **REID; NETTLETON et al. (1986)** gelang es nicht, Rinder mit cervidem BHV1 zu infizieren. Ergänzend halten **MÜLLER; KRAMER et al., 1997**, die neutralisierende Antikörper gegen BHV1 bei Rot-, Reh- und Damwild nachwiesen, eine Kreuzreaktion mit Cervidem Herpesvirus 1 für möglich.

Alle BHV1-Stämme, auch attenuierte Lebendimpfstoffe, können eine latente Infektion verursachen (**NETTLETON; SHARP et al., 1984; TIKOO; CAMPOS et al., 1995**). Diese Latenz ist dadurch gekennzeichnet, dass infektiöses Virus aus den latent infizierten Zellen nicht isoliert, aber virale DNA in den lokalen sensorischen Ganglien nachgewiesen werden kann

(**ACKERMANN; PETERHANS et al., 1982; ACKERMANN und WYLER, 1984; ROIZMAN; DESROSIERS et al., 1992; ENGELS und ACKERMANN, 1996**). Latente Virusträger können den Erreger sporadisch ausscheiden, zumeist ohne klinische Erscheinungen zu zeigen und sind somit so genannte stille Träger (**THIRY; WELLEMANS et al., 1992**). Die respiratorische Ausscheidung dauert selten länger als 12 Tage. In Nasenspülproben kann BHV1-Virus unter anderem 2 bis 3 Monate lang nachgewiesen werden. Die Virusausscheidung auf vaginalem Weg beträgt bis zu 14 Tage, beim Bullen sogar bis zu 4 Wochen. Latent infizierte Tiere, insbesondere in einem frühen Infektionsstadium, bilden somit jederzeit ein Infektionsreservoir.

Einmal mit BHV1 infizierte Tiere bleiben lebenslang potentielle Virussausscheider (**BITSCH, 1984; KRAMPS; PERRIN et al., 1996**). Verschiedene Faktoren, wie Korticosteroidapplikationen, respiratorische Infektionen, Parasitenbefall, Geburts- oder Transportstress, können BHV1 bei latent infizierten Tieren reaktivieren (**MENSIK; POSPISIL et al., 1976; PASTORET; AGUILAR-SETIÈN et al., 1979; MSOLLA; ALLAN et al., 1983; THIRY; SALIKI et al., 1985; THIRY; SALIKI et al., 1987**). Während in der Regel die Reaktivierung von Herpesvirusinfektionen der Wiederkäuer subklinisch verläuft, ist eine subklinische Primärinfektionen mit BHV1 ebenfalls möglich (**VAN OIRSCHOT; STRAVER et al., 1993**). Daraus resultiert das Risiko einer unbemerkten Ausbreitung in der Herde (**KAASHOEK; RIJSEWIJK et al., 1996**).

In fast allen Fällen ist das Ergebnis der latenten Infektion verbunden mit der Produktion spezifischer BHV1-Antikörper. Dennoch gibt es Hinweise, dass in Einzelfällen eine Infektion auf geringem Level oder die Vakzination mit einer lebend, temperatursensitiven Mutante in Kälbern mit hohem maternalen Antikörperspiegel infolge der Neutralisation der Antikörper dazu führen kann, dass seronegative latent infizierte Carriertiere (SNLC) auftreten. Latentes Virus konnte bei jeder experimentellen Provokation reaktiviert werden (**LEMAIRE; MEYER et al., 2000; LEMAIER; WEYNANTS et al., 2000**). Eine ähnliche Beobachtung machten **TOUSSAINT; RZIHA et al. (2004)** nach experimenteller Infektion mehrmals geimpfter Kälber mit gE-deletierter Markervakzine. Obwohl BHV1-DNA im Gangliengewebe bei SNLC nachgewiesen wurde, ließ sich keine gE-Serokonversionen beobachten und kein Virus zurückgewinnen.

2.2.2. Risikofaktoren in der Bekämpfung der BHV1-Infektion

In verschiedenen Studien wurden Risikofaktoren untersucht und deren mögliche Bedeutung in der BHV1-Infektion analysiert.

Der direkte Tierkontakt (Kontakt zwischen BHV1-positiven und -negativen Rindern) zählt nach wie vor zu den bedeutendsten Risikofaktoren in der Erregerverbreitung (**VAN SCHAİK; DIJKHUIZEN et al., 1998a; VAN SCHAİK; DIJKHUIZEN et al., 1998b; VAN SCHAİK;**

SCHUKKEN et al., 2001; VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2002; HAGE; SCHUKKEN et al., 2003). In diesem Zusammenhang ist der Weidekontakt mit anderen Rindern direkt über den Weidezaun oder durch Weideein- und -ausbrüche hervorzuheben (**VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2002; ZEHLE; DENZIN et al., 2005).**

Darüber hinaus spielt häufig der Kontakt von Fremdpersonal (Tierärzte, Besamungstechniker, Viehhändler) innerhalb von und zwischen Rinderbeständen eine wesentliche Rolle. Insbesondere ist problematisch, wenn dieser Personenkreis keine betriebseigene Schutzkleidung trägt, auch wenn diese in den Betrieben verfügbar ist. Besucher, die Kontakt zu Betrieben mit Rinderhaltung haben, stellen auch ein Risiko für die Einschleppung von BHV1 dar (**NIELEN; JALVINGH et al., 1996; VAN SCHAİK; DIJKHUIZEN et al., 1998c; VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2001, VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2002).**

JANZEN; SMART et al., 1980; NYLIN; MORTENSEN et al., 1995; HAGE; SCHUKKEN et al. (2003) schließen eine aerogene Erregerübertragung nicht aus. Sie wurde von **MARS; BRUSCHKE et al. (1999)** nachgewiesen und mit Übertragungsdistanzen von wenigen Metern beschrieben (**MARS; DE JONG et al., 2000).**

Ebenso verweist **KOOLE (1995)** neben der möglichen aerogenen (über Stallluft) auch auf die Möglichkeit der peroralen Erregerverbreitung über viruskontaminiertes Wasser und Futter. Speziell die Restfutterumverteilung von positiven Tieren zu anderen Haltungsgruppen birgt eine wesentliche Gefahr der Infektionsausbreitung innerhalb des Bestandes.

Als ein weiterer Risikofaktor wird wiederholt der direkte Tierkontakt durch Zukaufstiere benannt. Hierbei spielen der BHV1-Status der Herkunftsbestände sowie der zugekauften Tiere und deren Transportmanagement eine wesentliche Rolle. So besteht die Gefahr, dass Zukaufstiere mit unterschiedlichem BHV1-Status vermischt werden (**VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2001).**

Als risikoreich wird unter anderem der Aufenthalt von Rindern auf Ausstellungen und Auktionen bewertet. Hier könnten der Transport und der Tier- und Personenkontakt mögliche Einschleppungsquellen darstellen (**VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2001; VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2002.**). Die Rücknahme und Wiedereinstellung dieser Tiere ohne Prüfung des Antikörperstatus innerhalb des Quarantänezeitraums stellen ein erhebliches Risiko dar (**FRERKING, 1998).**

Als risikoreich hinsichtlich der Weiterverbreitung der Infektion wird der innerbetriebliche Tierkontakt von Jungvieh zu adulten Rindern in nicht BHV1-freien Beständen gewertet, da die Seroprävalenz in Rinderherden oft altersabhängig ist. So ist Jungvieh häufig seronegativ im Vergleich zu den oft seropositiven Kühen.

Ein Erregereintrag durch Maschinen- und Geräte austausch (**KOOLE, 1995**), unter anderem auch durch Fahrzeuge des Futtertransports und der Tierkörperbeseitigung, wird für möglich gehalten (**VAN SCHAİK; DIJKHUIZEN et al., 1998a; VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2001; VAN SCHAİK; SCHUKKEN et al., 2002).**

Die Nutzung von tiefgefrorenem Sperma, In-vitro-Fertilisation und Embryotransfer haben zeitweise zum Anstieg des Risikos für die nationale und internationale Weiterverbreitung der BHV1 geführt (**SHEFFEY und KRINSKY, 1973**). Unerkannte latent infizierte Deckbullen aus Besamungsstationen stellen ebenfalls ein gravierendes Risiko dar (**JANOWITZ; JUNGBLUT et al., 2004**), ebenso Sperma von BHV1-infizierten Bullen (**VAN OIRSCHOT, 1995b; ROLLE und MAYR, 2002**). Dagegen schätzten **WAGNER; FUCHS et al. (2005)** dieses Risiko als sehr gering ein und verweisen auf die hohen Standards zugelassener Besamungsstationen und die konsequente veterinärbehördliche Überwachung importierten Spermas.

Ein weiterer Gefahrenpunkt ist der Gebrauch von unzureichend gereinigten und sterilisierten medizinischen Instrumenten in Rinderbeständen mit unterschiedlichem BHV1-Status. Insbesondere gilt das für den Einsatz des BHV1-Impfbestecks, das möglichst nur für die BHV1-Impfstoffapplikation zur Anwendung kommen sollte (**MAKOSCHEY und BEER, 2004; BEER, 2005**).

Andere Einschleppungsmöglichkeiten des Erregers durch lebende Vektoren, wie Katzen, Hunde, Vögel und durch Parasitenbefall, werden ebenfalls als Risikofaktoren in Erwägung gezogen (**VAN SCHAIK; SCHUKKEN et al., 2001**). **TAYLOR und SEAL (1982)** wiesen BHV1 in der Zeckenart *Ornithodoros coriaceus* nach. **STRAUB (1990)** vermutete, dass Zecken möglicherweise als Erregerreservoir eine Rolle spielen könnten.

Letztlich könnten auch Hilfsmittel, die im Bestand zur Fixierung oder Führung genutzt werden, wie Halfter, Stricke und Sichtblenden, ebenfalls bei Gebrauch zwischen Rindern mit unterschiedlichem BHV1-Status zur Virusverbreitung beitragen.

2.3. BHV1-Bekämpfungsmaßnahmen und Stand der Sanierung

2.3.1. Populationsbezogene Bestandssanierung/Risikobewertung

Unter einer Sanierung wird allgemein die Verbesserung des Gesundheitsstatus einer Tierpopulation verstanden, die es entweder durch eine Erregerreduktion oder -elimination zu erreichen gilt. Dabei kann sich das Sanierungsziel auf die Tierpopulation eines einzelnen Betriebes oder mehrerer Betriebe in einem Gebiet oder einem Land beziehen. Die Vorgehensweise, insbesondere die Auswahl von Techniken für ein konkretes Sanierungsvorhaben, hängt in erster Linie von der Zielsetzung der Sanierung, der Epidemiologie, des auszurottenden Erregers, der Machbarkeit und den verfügbaren Ressourcen ab (**STÄRK, 2005**). Im Rahmen der bestands- bzw. der flächenhaften Sanierung werden verschiedene Phasen durchlaufen. Zunächst muss der Gesundheits- oder Erregerstatus des Betriebes festgestellt werden. Dabei kommen klinische und analytische Diagnosemethoden zur Anwendung. Im Zentrum steht die Falldefinition, die in staatlichen Bekämpfungsprogrammen, wie beispiels-

weise der BHV1-Sanierung in Deutschland, im Rahmen einer Verordnung festgelegt ist. Die Falldefinition besteht bei der BHV1 aus der Kombination von klinischen und/oder labor diagnostischen Testresultaten. Bei populationsbezogenen Bewertungen sind neben der Sensitivität und der Spezifität der eingesetzten Tests die positiven und negativen prädiktiven Werte von besonderer Bedeutung (**BEAGLEHOLE; BONITA et al., 1997**). Diese sind von der Qualität der Tests, aber auch von der Prävalenz der Fälle abhängig. Zur Sanierung eines als infiziert eingestuften Betriebes kommen verschiedene Strategien zur Anwendung, wie beispielsweise Therapie, Impfung, Eliminierung infizierter Tiere, Teilsanierung oder Totalsanierung. Erregerspezifische Interventionen, wie Therapie und Impfung, müssen von unspezifischen Maßnahmen des Managements begleitet werden. Dazu gehören allgemeine Hygienemaßnahmen, Reinigung und Desinfektion, Zutrittsregeln für betriebsfremde Personen, Schädnerbekämpfung etc. Das gezielte Ausmerzen positiver Tiere eignet sich insbesondere bei der Bekämpfung von Krankheiten, die durch nichtkontagiöse Erreger hervorgerufen werden (**STÄRK und SIEGMANN, 2004**), kann aber auch bei der Sanierung kontagiöser Tierkrankheiten, insbesondere bei niedriger Prävalenz, zum schnellen Erfolg führen. Bei allen hochansteckenden Tierseuchen ist die Totalsanierung die Methode der Wahl (**STÄRK, 2005**).

Nach der Sanierung muss der Status eines Betriebes verifiziert und erhalten werden. Verschiedene Überwachungsstrategien, wie klinische Kontrolle, Stichproben- bzw. Bestandsuntersuchungen oder die Meldepflicht, eignen sich zur Dokumentation des Status (**GEHRMANN; DENZIN et al., 2005**). Die Zielsetzung des Monitorings besteht in diesem Stadium des Bekämpfungsprogramms im Nachweis der Erregerfreiheit. Aus Kosten- und Zeitgründen wird an Stelle der Untersuchung aller Individuen einer Population häufig von Stichprobenuntersuchungen Gebrauch gemacht. Für deren Planung sind statistische und epidemiologische Überlegungen zu beachten (**ZILLER; SELHORST et al., 2002**). Der Qualität erfasster Daten ist besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Mit bzw. nach Erreichung des Sanierungserfolges besteht das Risiko, den neuen Status infolge einer Neuankömmling oder des Aktivierens eines Residualherdes zu verlieren. Um dieses Risiko möglichst gering zu halten, sind entsprechende Maßnahmen anzuwenden und einzuhalten. Hinweise dafür kann die Risikoanalyse liefern. Sie umfasst die Risikobewertung, das Risikomanagement und die Risikokommunikation (**MURRAY, 2004**).

Die Risikobewertung berücksichtigt, welche Erreger über welchen Einschleppungsweg, durch welche Personen oder welche Aktivitäten wieder in die Population gelangen können. Parallel dazu sind mögliche Maßnahmen zur Risikoreduktion sowie deren Wirksamkeit zu berücksichtigen (Risikomanagement). Für den nachhaltigen Erhalt des erregerefreien Status sind Biosicherheitsmaßnahmen auf Betriebsebene (Regelung des Tier- und Personenverkehrs, Quarantänemaßnahmen, Kleiderwechsel für Fremdpersonen, sachgerechte Fütte-

rung, Fahrzeug- und Geräteeinsatz etc.) aber auch darüber hinaus ausgerichtete Maßnahmen, wie beispielsweise Handelsrestriktionen, Meidung von Nachbarschafts- und Weidekontakten mit infizierten Herden, notwendig (**ZEHLE; DENZIN et al., 2005**).

2.3.2. Impfung/Markerkonzept und -diagnostik

Aufgrund fehlender Therapiemöglichkeiten ist die prophylaktische Impfung das Mittel der Wahl zur Vermeidung bzw. Bekämpfung von virusbedingten Tierseuchen. Da das freiwillige BHV1-Bekämpfungsprogramm, unter Einschluss des Einsatzes konventioneller Impfstoffe, landesweit nicht den gewünschten Erfolg zeigte und sich andererseits wirtschaftlicher und politischer Druck BHV1-freier Mitgliedstaaten in der Europäischen Union aufbaute, wurde vor einigen Jahren beschlossen, die BHV1-Sanierung in Deutschland zu intensivieren (**BÄTZA; 2002; TEUFFERT; PÖTZSCH et al., 2004**). Als Mittel der Wahl wurde hierfür, insbesondere in Regionen mit hohem Durchseuchungsgrad, der Einsatz so genannter Markervakzinen favorisiert (**KAASHOEK; MOERMAN et al., 1994**). Solche wurden erstmals in Europa im Rahmen des staatlichen Bekämpfungsprogramms der Aujeszkyschen Krankheit als gentechnisch attenuierte Lebendvakzinen eingesetzt. Darüber hinaus kam dabei erstmals das Prinzip der markergestützten Differenzierung von infizierten und vakzinierten Tieren (DIVA = Differentiating Infected from Vaccinated Animals) zum Einsatz. Dieses beruht auf der serologischen Differenzierbarkeit des durch Infektion oder Impfung hervorgerufenen Antikörpermusters im Tier.

Der Beweis der grundsätzlichen Funktionsfähigkeit des DIVA-Prinzips in der Aujesky-Sanierung führte dazu, dass zur Bekämpfung der Bovinen Herpesvirus Typ 1-Infektion der Rinder eine auf dem gleichen Prinzip beruhende DIVA-Strategie eingesetzt wird (**BEER; KÖNIG et al., 2003**). Dem ging die Prüfung von „Impfstoffkandidaten“ voraus, zum einen so genannter BHV1-Deletionsmutanten, denen die Fähigkeit zur Produktion bestimmter einzelner Virusproteine, wie Glykoprotein G (gG), C (gC) oder E (gE), fehlt (**VAN ENGELENBURG; KAASHOEK et al., 1994; VAN OIRSCHOT; KAASHOEK et al., 1996b; KAASHOEK; RIJSEWIJK et al., 1998**). Daneben wurden auch Subunit-Präparationen (z. B. gentechnologisch hergestelltes Glykoprotein D) auf ihre Schutzwirkung geprüft (**BOSCH; DE JONG et al., 1998**). Man wählte schließlich einen BHV1-Glykoprotein E (gE) Deletionsimpfstoff aus und entwickelte ihn zur Anwendungsreife (**STRUBE; AUER et al., 1996**). So gibt die Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit BHV1 vor, dass in Deutschland bis auf wenige Ausnahmen zur Impfung gegen BHV1 nur Vakzinen mit einer Deletion des Glykoprotein E (gE)-Gens eingesetzt werden dürfen. Diese Impfstoffe werden als gE-deletierte Marker- oder DIVA-Vakzinen bezeichnet (**TRAPP; KÖNIG et al., 2003**).

Deren Impfviren haben die genetische Information für das Glykoprotein E verloren und sind nicht mehr in der Lage, gE zu exprimieren. Demzufolge können durch die Impfung auch keine gE-Antikörper mehr induziert werden (**KAASHOEK; RIJSEWIJK et al., 1995; BEER; KÖNIG et al., 2003**).

Bei ungeimpften wie auch bei markergeimpften Rindern ist die serologische Diagnostik eine tragende Säule der Bekämpfung (**BEER; KÖNIG et al., 2003**). Qualität und Leistungsfähigkeit der serologischen Diagnostik sind somit entscheidende Faktoren für eine erfolgreiche BHV1-Sanierung. Limitierende Faktoren bezüglich der Leistungsfähigkeit der Diagnostik bestehen darin, dass das gE kein Hauptimmunogen darstellt und die humorale Immunantwort gegen dieses Glykoprotein später nachweisbar ist und geringer ausfällt (s. Kapitel 2.1.2).

Diagnostisch werden ausschließlich gE-Blocking-ELISAs eingesetzt, um Wildtyp-infizierte, d.h. gE-Antikörper-positive Rinder von geimpften Tieren, die keine Antikörper gegen gE ausbilden, zu unterscheiden (**BEER und METTENLEITER, 2004**). Zum Nachweis der gE-spezifischen Antikörper mittels Blocking-ELISA sind Testsysteme von drei deutschen Herstellern verfügbar (**BALLAGI; HOLMQUIST et al., 1999; BÖTTCHER; WASTLHUBER et al., 1999; RAUER und CREVAT, 1999**). Das Testprinzip beruht auf der Messung der Blockierung der Bindung eines gE-spezifischen monoklonalen Antikörpers an gE. Als Testmedium können Serum- und Plasmaproben verwendet werden. Untersuchungen zur Antigen-Antikörper-Reaktion zeigten, dass die in den Tests verwendeten gE-spezifischen mAk an einen Komplex von gE und gI binden, wie er im Wildtypvirus vorliegt. Vermutlich interagiert BHV1-gE auch mit gM und dem Tegumentprotein UL49 (**FUCHS; KLUPP et al., 2002**).

Die Sensitivität und die Spezifität der gE-Blocking-ELISAs sind in verschiedenen Studien dokumentiert (**VAN OIRSCHOT; KAASHOEK et al., 1999; CONRATHS und KLÄHN, 1999; MEWES; GEHRMANN et al., 1999; LETELLIER; DELANGRE et al., 2001; WELLENBERG; MARS et al., 2001; BEER und REICHELT, 2002**). Für die im nationalen wie im EU-Ringvergleich 2001 sowie für die Chargenprüfung 2002 verwendeten anspruchsvollen Probensammlungen, die zahlreiche schwach positive Proben enthielten, wurden die Sensitivität und Spezifität der verfügbaren gE-Blocking-ELISA-Testsysteme untersucht (**BEER; KÖNIG et al., 2003**). Der Mittelwert für die Serum- und Plasmaproben betrug bei der Sensitivität 62 %, bei Milchproben dagegen nur 54 %. Die Spezifität differierte im Mittelwert von 95 % für die Serum- und Plasmaproben im Vergleich zu den Milchproben mit 88 % (**BEER; KÖNIG et al., 2003**). Dagegen wiesen die markerunabhängigen Testsysteme gB-Blocking-ELISA Sensitivitätswerte von 70 bis 100 % sowie Spezifitätswerte von 90 bis 100 % auf (**KRAMPS; MAGDALENA et al., 1994; ROSSKOPF; STRAUB et al., 1994; KRAMPS; PERRIN et al., 1996; SCHRIJVER und KRAMPS, 1998; BEER und REICHELT, 2002**).

Für die gegenwärtig im Feld gemessenen Sensitivitäts- und Spezifitätswerte stellt sich die Situation wie folgt dar:

Mit den markerabhängigen Testsystemen werden im Blutserum bzw. –plasma gegenwärtig Sensitivitätswerte zwischen 90 bis 95 % und Spezifitätswerte um 98 % erzielt, während mit markerunabhängigen Testsystemen sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität Werte zwischen 98 und 99 % erreicht werden (**BEER, 2006**).

Mit den markerunabhängigen Testsystemen können BHV1-Antikörper bereits zwischen dem 7. bis 12. Tag nachgewiesen werden. Dagegen reagieren markerabhängige Tests auf gE-spezifische Antikörper erst etwa ab dem 21. Tag nach der Infektion (**BEER; KÖNIG et al. 2003**). Probleme in der Sensitivität und Spezifität der gE-Markerdiagnostik können u. a. bei solchen Proben auftreten,

- die innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach der Entnahme getestet werden (**PANNWITZ, 2001**),
- die in zeitlicher Nähe zur letzten Impfung gewonnen und untersucht werden,
- die von mehrfach vakzinierten Tieren stammen (**BEER, KÖNIG et al., 2003**).

Die markerunabhängigen, konventionellen Testsysteme übertreffen in ihrer Leistungsfähigkeit bezüglich der genannten Parameter, mit Ausnahme der Markereignung, die gE-Blocking-ELISAs (**BEER, KÖNIG et al., 2003**). Deshalb sollten ungeimpfte Tiere, wie in § 2a der BHV1-Verordnung in der Fassung vom 20.12.2005 vorgeschrieben, mit markerunabhängigen Testsystemen auf BHV1-Antikörper untersucht werden. Entsprechend der Vorschriften der BHV1-Impfstoffhersteller werden inaktivierte Vakzinen subkutan und Lebendvakzinen intranasal und/oder intramuskulär appliziert. Die Wirkung der Impfung bei der Bekämpfung der BHV1-Infektion beruht nicht auf dem vollständigen Schutz des Einzeltieres vor der Infektion, sondern auf der Verdrängung der Wildtypviren aus der Population (**VAN OIRSCHOT, 1999; TRAPP; KÖNIG et al., 2003**). In Regionen mit hoher BHV1-Prävalenz sollen so nach einigen Jahren Bedingungen geschaffen werden, die eine Bekämpfung durch gezielte Selektion BHV1-negativer und Merzung BHV1-positiver Tiere ermöglichen.

2.3.3. Stand der BHV1-Sanierung in Deutschland

Seit 1997 bildet die Bundesverordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit BHV1 den rechtlichen Rahmen des BHV1-Bekämpfungsprogramms. Mittelfristiges Ziel der Bekämpfung ist der Schutz BHV1-freier Bestände vor Neuinfektionen und die Überführung "nicht BHV1-freier Bestände" in den Status "BHV1-freier Bestand" bzw. "amtlich anerkannt BHV1-freier Bestand". Langfristig werden die Tilgung der BHV1 und die Anerkennung als BHV1-freies Land oder als BHV1-freie Region angestrebt (**ANONYMUS, 2005**).

Seit 2001 übermitteln die Bundesländer jährlich dem BMELV den Stand der BHV1-Sanierung. Dies geschah bis einschließlich 2004 auf freiwilliger Basis; ab 2005 ist die Mitteilungspflicht der zuständigen obersten Landesbehörden im § 2b der BHV1-Verordnung vorgeschrieben. Im Institut für Epidemiologie des Friedrich-Loeffler-Institutes werden diese BHV1-Daten aufgearbeitet und jährlich auf Bundes- und Landesebene vergleichend dargestellt. Dabei werden nach **TEUFFERT; PÖTZSCH et al. (2005)** folgende Zielstellungen verfolgt:

- Analyse des Sanierungsverlaufes über die Zeit,
- Erkennung von Bekämpfungsschwerpunkten,
- Sammlung von Primärdaten für die Berichterstattung an die EU gemäß Entscheidung 2003/886/EG.

Anhand der Jahresauswertung für 2005 ermittelten **TEUFFERT und BEER (2006)** unter Einbeziehung von 166.972 Beständen aus dem Milch- und Mutterkuhbereich inklusive deren Nachzucht folgenden Sanierungsstand:

- 77,6 % der Bestände waren BHV1-frei,
- 15,5 % der Bestände befanden sich im Sanierungsverfahren,
- 6,9 % der Bestände waren der Kategorie "sonstige nicht BHV1-freie Bestände" zuzuordnen.

Für den gleichen Zeitraum ergab sich unter Einbeziehung von 11.549.379 Rindern, dass

- 66,4 % der Rinder BHV1-freien Beständen,
- 29,0 % der Rinder Sanierungsbeständen und
- 4,6 % der Rinder "sonstigen nicht BHV1-freien Beständen" zuzuordnen waren.

Damit erhöhte sich der Anteil BHV1-freier Bestände im Jahre 2005 gegenüber dem Vorjahr um 6,8 % und bezogen auf die Einzeltiere um 6,2 %. Dennoch zeigte sich, dass es innerhalb Deutschlands große Unterschiede im Sanierungsfortschritt zwischen den einzelnen Bundesländern gab (**TEUFFERT und BEER, 2006**). Während beispielsweise Bayern und Sachsen-Anhalt im Milch- und Mutterkuhbereich mit 94,3 bzw. 91,9 % die höchsten Anteile an BHV1-freien Rinderbeständen aufwiesen, betrug dieser Anteil am Jahresende 2005 in Nordrhein-Westfalen nur 53,4 % und in Schleswig-Holstein 53,7 %. Für den Rindermastbereich ergab die bundesweite Auswertung am Jahresende 2005, dass 19 % der insgesamt 36.120 ausgewerteten Bestände die Anerkennung als BHV1-frei erreichten.

2.3.4. Entwicklung und Stand der BHV1-Sanierung in Niedersachsen

Im Bundesland Niedersachsen wurden seit den siebziger Jahren zahlreiche Forschungsthemen zur BHV1-Problematik bearbeitet. So untersuchte **TEICHMANN (1973)** 774 Serumproben aus 17 BHV1-positiven Betrieben und ermittelte einen Reagentenanteil von 41 %. Im darauf folgenden Jahr wurde im selben Zuchtgebiet durch **FREY; HIRCHERT et al. (1974)** ein Anteil von 40 % BHV1-positiver Antikörperträger von insgesamt 3.400 zufällig ausgewählten Tieren ermittelt. Davon entfiel ein geringer Reagentenanteil von 4 % auf 9 bis 16 Monate alte Jungrinder, den übrigen Anteil stellten ältere Reagenten dar.

In den Jahren 1983 bis 1985 arbeitete man intensiv an der Entwicklung eines sensitiven und spezifischen BHV1-Untersuchungsverfahrens. Im Ergebnis wurde ein Testverfahren entwickelt, das die Untersuchung mittels Tankmilchproben (pro Tankmilchprobe max. 50 Kühe) erlaubte (**FORSCHNER; BÜNGER et al., 1986**).

In einer weiteren Studie dokumentierte **WERNER (1985)** einen langsamen Anstieg der relativen Zahl der Antikörperträger bis zu einem Alter von acht Jahren. Dieses Ergebnis interpretierte sie damit, dass die Infektion häufig erst nach dem Wechsel aus dem negativen Jungtierstall in einen mehr oder weniger durchseuchten Kuhstall erfolgt.

Zur Impfthematik stellten **FORSCHNER; BÜNGER et al. (1987)** durch eine Auswertung von 38 Betrieben im Landkreis Harburg fest, dass BHV1-Immunisierungen mit Lebend- oder Totimpfstoffen eine Virusinfektion nicht generell verhindern können, jedoch vor einer ungemehrten Virusvermehrung und dadurch vor klinischen Ausbrüchen schützen.

Weitere flächendeckende Untersuchungen im selbigen Landkreis erfolgten von 1983/84 zu 1984/85 (**SCHRÖDER, 1986**). Hauptschwerpunkt war die Untersuchung der Reduzierung des Verseuchungsgrades und der zugrunde liegenden Einflussgrößen.

Einerseits spiegelten die Ergebnisse dieser Arbeiten erste Bemühungen zur BHV1-Bekämpfung wider, andererseits wuchs die Notwendigkeit einer Bekämpfungsstrategie.

In Anlehnung an Bundesleitlinien zur BHV1-Bekämpfung wurde 1986 in Niedersachsen ein freiwilliges Bekämpfungsverfahren initiiert (**FLEBBE, 1999**). Darauf aufbauend trat am 14. 10. 1988 die erste Richtlinie zur Sanierung der Rinderbestände von der BHV1-Infektion in Kraft. Im Zuge dieses freiwilligen amtlichen Verfahrens konnten im gleichen Jahr etwa 7 % der niedersächsischen Rinderbestände als amtlich BHV1-unverdächtig anerkannt werden (**GERDES, 2005**). Bis zum Inkrafttreten der BHV1-Bundesverordnung im Jahr 1997 stieg ihr Anteil lediglich auf ca. 20 % an (**GERDES, 2005**).

1998 wurde die BHV1-Statuserhebung in allen Rinderhaltenden Beständen Niedersachsens eingeleitet; die bestehenden Bekämpfungsmaßnahmen wurden überarbeitet (**FLEBBE, 1999**). Im Ergebnis folgte der Erlass der Hygienerichtlinie für Rinderhaltende Betriebe mit den Anlagen BHV1- und BVD-Bekämpfung vom 24. 01. 2000. Darauf aufbauend wurden erste BHV1-Schutzgebietsverordnungen in den Landkreisen Celle, Lüchow-Dannenberg,

Uelzen, Aurich, Holzminden und Wittmund erlassen. Durch das darin verankerte Weideverbot für nicht BHV1-freie bzw. nicht gegen BHV1 geimpfte Tiere wurde die BHV1-Sanierung insbesondere in diesen Regionen beschleunigt. Dennoch beteiligten sich niedersachsenweit bis zum Zeitpunkt der Einführung der Untersuchungspflicht im November 2001 durch die Erste Verordnung zur Änderung der BHV1-Verordnung etwa nur ein Drittel der Rinderhalter am BHV1-Sanierungsverfahren (**GERDES, 2005**). Insbesondere waren dies Zuchtbetriebe, die am internationalen Tierhandel teilhaben wollten. Mit der Neufassung der nationalen BHV1-Verordnung vom 3. November 2004 (BGBl. I, S. 159) wurde die verpflichtende Impfung und Nachimpfung der Reagenten eingeführt, sofern sie nicht unverzüglich aus dem Bestand entfernt werden können. Zudem wurde in der niedersächsischen BHV1-Verordnung vom 1. April 2005 (GVBl. 6/2005) geregelt, dass für Betriebe, die nicht dem BHV1-Sanierungsprogramm beigetreten sind bzw. die Impfpflicht nicht umsetzen, Weideverbot gilt.

Im Resümee der Historie der BHV1-Bekämpfungsmaßnahmen von 1988 bis 2004 kann nach **GERDES (2005)** folgender Entwicklungsstand in Niedersachsen verzeichnet werden:

- Der Anteil der BHV1-freien Bestände wuchs von 7 auf 60 % an.
- In der Kategorie "kontrollierter Impfbetrieb" konnte eine Steigerung von 1 auf 12 % erzielt werden.
- Der Anteil der Betriebe ohne gezielte Bekämpfungsmaßnahmen konnte von 90 auf 10 % reduziert werden.

Inzwischen sind mit Stand vom 31.12.2006 in Niedersachsen im Milch- und Mutterkuhbereich einschließlich des weiblichen Jungrinderbereiches

- 73,2 % der Bestände BHV1-frei anerkannt,
- 20,9 % der Bestände im Sanierungsverfahren und
- 5,9 % der Bestände waren der Kategorie "sonstige nicht BHV1-freie Bestände" zuzuordnen (**TEUFFERT, 2007**).

Um diese Ergebnisse auch weiterhin verbessern zu können, hält Niedersachsen an einer flächendeckenden und einheitlichen Vorgehensweise fest. Dabei steht die Intensivierung der Zusammenarbeit zwischen Rinderhaltern, Bestandstierärzten und Veterinärämtern im Vordergrund. Weitere Ansatzpunkte für eine erfolgreiche Forcierung der BHV1-Bekämpfung bilden die termingerechte Impfung, Dokumentation und Kennzeichnung von Reagenten sowie die Einhaltung von Hygienemaßnahmen.